UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

BRUNA LEONEL GONÇALVES

Avaliação da eficiência de bactérias ácido lácticas e *Saccharomyces cerevisiae* na redução da disponibilidade de aflatoxina M₁ em queijo Minas Frescal

**Pirassununga
2020**

BRUNA LEONEL GONÇALVES

Avaliação da eficiência de bactérias ácido lácticas e *Saccharomyces cerevisiae* na redução da disponibilidade de aflatoxina M₁ em queijo Minas Frescal

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Humberto Corassin.

Co-orientadora: Profa. Dra. Eliana Setsuko Kamimura.

**Pirassununga
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L635a Leonel Gonçalves, Bruna
Avaliação da eficiência de bactérias ácido
láticas e *Saccharomyces cerevisiae* na redução da
disponibilidade de aflatoxina M1 em queijo Minas
Frescal / Bruna Leonel Gonçalves ; orientador
Carlos Humberto Corassin ; coorientador Eliana
Setsuko Kamimura. -- Pirassununga, 2020.
100 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de Zootecnia
e Engenharia de Alimentos, Universidade de São
Paulo.

1. aflatoxinas. 2. microrganismos. 3. MEV. 4.
queijo. 5. redução . I. Corassin, Carlos Humberto,
orient. II. Setsuko Kamimura, Eliana, coorient.
III. Título.

AGRADECIMENTOS

Minha graditão maior é a Deus, que me deu forças e tornou tudo isto possível.

Agradeço também:

Aos meus Pais, Dauri & Maria Aparecida por todo apoio, âmparo e carinho.

Ao meu irmão Juliano por todo apoio e atenção.

Ao meu esposo Ramon por toda atenção, compreensão e apoio.

Ao meu orientador prof. Dr. Carlos Humberto Corassin por todos os ensinamentos, atenção, paciência e apoio.

A minha Co-orientadora profa. Dra. Eliana Setsuko Kamimura por todos os ensinamentos e apoio.

Ao prof. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira por todos os ensinamentos e atenção disponibilizados no laboratório

A Universidade Federal de Santa Catarina – instituição onde fiz a graduação e a minha primeira Orientadora Profa. Vildes Maria Scussel, que foi quem me apresentou o universo das micotoxinas.

A Fundação de Amparo Pesquisa do Estado de São Paulo -FAPESP (processo nº 2017/19683-1) pelo amparo financeiro.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - CAPES (001) pelo amparo financeiro.

A especialista Roice Eliana Rosim por todos os ensinamentos, paciência e atenção.

A minha amiga Carolina Coppa pela amizade, companheirismo, risadas e ajuda.

A Sarah Lee pela amizade e ajuda.

Ao Leonardo da empresa SACOO Brasil pela gentileza em doar-me as bactérias.

A todos os proprietários e/ou responsáveis dos laticínios pela paciência e gentileza em cooperar com a pesquisa.

A todas as pessoas que de alguma forma estiveram presentes ao longo desse tempo e que de alguma forma me auxiliaram.

“Você não é produto das circunstâncias, você é produto das
suas decisões”

Viktor Frankl

“Um pensador vê suas próprias ações como experiências e perguntas
– como tentativas de descobrir alguma coisa. Sucesso e fracasso são
para ele respostas, acima de tudo”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

GONÇALVES, B.L. **Avaliação da eficiência de bactérias ácido lácticas e *Saccharomyces cerevisiae* na redução da disponibilidade de aflatoxina M₁ em queijo Minas Frescal**. 2020. 101 p. Tese de Doutorado – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga/SP, Brazil, 2020.

O presente estudo teve como objetivo: a) avaliar a ocorrência de AFM₁ em sete diferentes laticínios, com inspeção oficial, que produzissem queijo Minas Frescal com ou sem adição de fermento lácteo e b) avaliar a eficiência de bactérias ácido lácticas e *Saccharomyces cerevisiae* na redução da disponibilidade de AFM₁ em queijo Minas Frescal. A determinação de AFM₁ da primeira e da segunda etapa foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE - Shimadzu®, 10VP, Kioto, Japão) com detector de fluorescência (RF-10AXL). Na etapa de ocorrência 34 amostras (40%, $n = 84$) apresentaram níveis detectáveis de AFM₁, incluindo 11 (39%), 15 (54%) e 8 (29%) amostras de leite cru, pasteurizado e queijo, respectivamente. Todas as amostras estavam dentro dos limites de tolerância adotados no Brasil para AFM₁ em leite (0,5 µg/L) e queijo (2,5 µg/kg). Na segunda etapa foi avaliada a capacidade de ligação de duas cepas de bactérias ácido lácticas (BAL): 1) *Lactobacillus rhamnosus* (LRB, SACCO, Cadorago, Itália) e 2) *Lactococcus lactis* (MWO, SACCO, Cadorago, Itália) e uma cepa de levedura, *Saccharomyces cerevisiae* (Fermentis K-97, SafALe, Bélgica) em reduzir a disponibilidade da AFM₁. Para isto, o queijo Minas Frescal foi produzido no Laticínio da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (Campus Fernando Costa) e no momento da adição da AFM₁, cultura starter ou *S. cerevisiae*, devido ao risco de contaminação do laticínio, a coalhada foi transferida para o Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos (LMMA) para finalizar a produção do queijo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial $2 \times 2 \times 2$, correspondendo a dois níveis de cultura starter de BAL (0 e *L. rhamnosus* 10^{10} células/g + *L. lactis* 10^{10} células/g), dois níveis de *S. cerevisiae* (0 e 10^{10} células de levedura/g) e dois níveis de AFM₁ (0 e 0,5 µg/kg) na coalhada de queijo, totalizando 8 tratamentos com três repetições por tratamento. A determinação de AFM₁ foi nos dias 2, 10, 20 e 30 após a produção do queijo. As análises físico químicas (pH, teor de gordura e porcentagem de proteína) e microbiológicas (*Staphylococcus* coagulase positiva, Coliformes a 45°C, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*) foram realizadas nos dias 2 e 30 após a produção do queijo. Apenas o pH diminuiu ($P < 0,05$) em todos os tratamentos do dia 2 para o dia 30 de armazenamento. Não houve presença de bactérias patogênicas no queijo Minas Frescal ao longo do período experimental e as contagens de Coliformes a 45°C estavam dentro do permitido pela legislação. Logo, o uso de BAL e *S. cerevisiae* para reduzir AFM₁ no queijo Minas Frescal não teve efeito negativo no prazo de validade deste queijo. A redução da AFM₁ variou de acordo com os microrganismos utilizados e a *S. cerevisiae* apresentou maior capacidade de ligar AFM₁. Na terceira etapa a interação entre os microrganismos utilizados e a AFM₁ foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura. As análises foram realizadas nos dias 2 e 30 após a produção do queijo. Um microscópio eletrônico de varredura (HITACHI, TM 3000) com um detector de elétrons retroespalhado foi usado a 15 kV para visualizar cada amostra com uma ampliação 5000x. A análise por microscopia eletrônica de varredura permitiu verificar a ligação tanto das BAL quanto da *S. cerevisiae* as partículas de AFM₁ no queijo Minas Frescal. A adição de

Saccharomyces cerevisiae ou células de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis* inativadas pelo calor, isoladamente ou em combinação, tem potencial para reduzir os níveis de AFM₁ no queijo Minas Frescal durante os 30 dias de armazenamento sem afetar a validade deste queijo.

Palavras chave: aflatoxinas, microrganismos, MEV, queijo, redução.

ABSTRACT

GONÇALVES, B.L. **Evaluation of the efficiency of lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in reducing the availability of aflatoxin M₁ in Minas Frescal cheese.** 2020. 101p. Phd Thesis - Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga / SP, Brazil, 2020.

The present study aimed to: a) evaluate the occurrence of AFM₁ in seven different dairy products, with official inspection, that produced Minas Frescal cheese with or without the addition of milk yeast and b) evaluate the efficiency of lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in reducing availability of AFM₁ in Minas Frescal cheese. The determination of AFM₁ of the first and second stages were performed by high performance liquid chromatography (HPLC - Shimadzu®, 10VP, Kyoto, Japan) with fluorescence detector (RF-10AXL). In the occurrence stage 34 samples (40%, n = 84) showed detectable levels of AFM₁, including 11 (39%), 15 (54%) and 8 (29%) samples of raw, pasteurized milk and cheese, respectively. All samples were within the tolerance limits adopted in Brazil for AFM₁ in milk (0.5 µg / L) and cheese (2.5 µg / kg). In the second stage, the binding capacity of two strains of lactic acid bacteria (BAL) was evaluated: 1) *Lactobacillus rhamnosus* (LRB, SACCO, Cadorago, Italy) and 2) *Lactococcus lactis* (MWO, SACCO, Cadorago, Italy) and one strain yeast, *Saccharomyces cerevisiae* (Fermentis K-97, SafALe, Belgium) to reduce the availability of AFM₁. For this, Minas Frescal cheese was produced at the Dairy of the Faculty of Animal Science and Food Engineering (Campus Fernando Costa) and at the time of the addition of AFM₁, starter culture or *S. cerevisiae*, due to the risk of contamination of the dairy, the curd was transferred to the Food Microbiology and Mycotoxicology Laboratory (LMMA) to finalize cheese production. The experimental design was completely randomized, in a 2 × 2 × 2 factorial scheme, corresponding to two levels of BAL starter culture (0 and *L. rhamnosus* 10¹⁰ cells/g + *L. lactis* 10¹⁰ cells/g), two levels of *S. cerevisiae* (0 and 10¹⁰ yeast cells/g) and two levels of AFM₁ (0 and 0.5 µg/kg) in the cheese curd, totaling 8 treatments with three replicates per treatment. AFM₁ was determined on days 2, 10, 20 and 30 after cheese production. The physical chemical (pH, fat content and protein percentage) and microbiological analyzes (*Staphylococcus* coagulase positive, Coliforms at 45 ° C, *Salmonella* sp. and *Listeria monocytogenes*) were performed on days 2 and 30 after cheese production. Only the pH decreased (*P* < 0.05) in all treatments from day 2 to day 30 of storage. There was no presence of pathogenic bacteria in Minas Frescal cheese over the experimental period and the Coliform counts at 45 ° C were within the limits of the legislation. Therefore, the use of BAL and *S. cerevisiae* to reduce AFM₁ in Minas Frescal cheese had no negative effect on the shelf life of this cheese. The AFM₁ reduction varied according to the microorganisms used and *S. cerevisiae* showed greater capacity to bind AFM₁. In the third stage, the interaction between the microorganisms used and AFM₁ was evaluated by scanning electron microscopy. Analyzes were performed on days 2 and 30 after cheese production. A scanning electron microscope (HITACHI, TM 3000) with a backscattered electron detector was used at 15 kV to view each sample at 5000x magnification. The analysis by scanning electron microscopy allowed to verify the binding of both BAL and *S. cerevisiae* to AFM₁ particles in Minas Frescal cheese. The addition of *Saccharomyces cerevisiae* or *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactococcus lactis* cells inactivated by heat, alone or in combination, has the potential to reduce the levels of AFM₁ in

Minas Frescal cheese during the 30 days of storage without affecting the validity of this cheese.

Keywords: aflatoxins, cheese, microorganisms, SEM, reduction.

FIGURAS

INTRODUÇÃO		15
Fig. 1 –	Estrutura química dos anéis furano cumarina presente nas aflatoxinas	16
Fig. 2 –	Estrutura química das principais aflatoxinas	17
Fig. 3 –	Processo de biotransformação da aflatoxina B ₁	19
Fig. 4 –	Porcentagem de queijo Minas Frescal produzido em relação ao total de queijos produzidos no Brasil.	24
CAPÍTULO IV:	Uso de microscopia eletrônica de varredura para avaliar a interação entre bactérias ácido lácticas, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e aflatoxina M ₁ adicionados ao queijo Minas Frescal	85
Fig. 1 –	Micrografias dos tratamentos 3 (imagens B dia 2 e B.1 dia 30) e 4 (imagens F dia 2 e F.1 dia 30) após 2 e 30 dias de armazenamento	92
Fig. 2 –	Micrografias dos tratamentos 5 (imagens D dia 2 e D.1 dia 30) e 6 (imagens H dia 2 e H.1 dia 30) após 2 e 30 dias de armazenamento	93
Fig. 3 –	Micrografias dos tratamentos 7 (imagens B dia 2 e B.1 dia 30) e 8 (imagens F dia 2 e F.1 dia 30) após 2 e 30 dias de armazenamento	94
Fig. 4 –	Micrografias de todos os tratamentos após 2 dias de armazenamento: A) tratamento 1; B) tratamento 3; C) tratamento 5; D) tratamento 7; E) tratamento 2; F) tratamento 4; G) tratamento 6 e H) tratamento 8. As variações A.1, B.1, C.1, D.1, E.1, F.1, G.1 e H.1 correspondem aos mesmos tratamentos, mas após 30 dias de armazenamento.	95

TABELAS

CAPÍTULO I:	Aflatoxina M ₁ : Métodos biológicos de redução de disponibilidade em leite e queijo	36
Tabela 1 –	Métodos biológicos de redução de disponibilidade em leite em diferentes países nos últimos 10 anos (2009 até o momento).	47
CAPÍTULO II:	Ocorrência de aflatoxina M ₁ durante o processamento de queijo Minas Frescal em laticínios Brasileiros	57
Tabela 1 –	Níveis de aflatoxina M ₁ em leite cru, leite pasteurizado e em queijo Minas Frescal fabricado com ou sem cultura <i>starter</i> em laticínios do estado de São Paulo.	62
CAPÍTULO III:	Redução da disponibilidade de aflatoxina M ₁ por células não viáveis de bactérias ácido lácticas e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em queijo Minas Frescal	69
Tabela 1 –	Parâmetros físico-químicos do queijo Minas Frescal produzido com ou sem adição de células inativadas de bactérias ácido lácticas e levedura e aflatoxina M ₁ nos dias 2 e 30 após armazenamento.	78
Tabela 2 –	Resultado das análises microbiológicas do queijo Minas Frescal produzido com ou sem adição de células inativadas de bactérias ácido lácticas e levedura e aflatoxina M ₁ após 2 e 30 dias de armazenamento.	79
Tabela 3 –	Concentrações e percentuais de redução de aflatoxina M ₁ no queijo Minas Frescal produzido com ou sem adição de aflatoxina M ₁ e células inativadas de bactérias ácido lácticas e levedura durante os 30 dias de armazenamento.	80

SUMÁRIO

1.APRESENTAÇÃO	14
2. INTRODUÇÃO	15
2.1 Micotoxinas	15
2.2 Aflatoxinas e efeitos tóxicos	16
2.3 Aflatoxinas em alimentos	19
2.4 Características gerais do queijo Fresco	23
2.5 Produção e consumo, nacional de queijos	24
2.6 Métodos de controle de aflatoxinas em leite e derivados	25
Referências	27
3. OBJETIVO	35
3.1 Geral	35
3.2 Específico	35
CAPÍTULO I - Aflatoxina M₁: Métodos biológicos de redução de disponibilidade em leite e queijo.....	36
I.1 Resumo.....	36
I.2 Introdução	37
I.2.1 Estratégia de pesquisa	38
I.2.1.1 Critério de inclusão e exclusão.....	38
I.2.1.2 Seleção de dados	38
I.3 Aflatoxina M₁ em leite, queijo e métodos de descontaminação	39
I.3.1 Síntese e excreção da aflatoxina M₁.....	39
I.3.2 Prevalência de aflatoxina M₁ em leite e queijo	40
I.3.3 Métodos de redução de disponibilidade	42
I.4 Desafios e implicações dos métodos de redução de disponibilidade de aflatoxina M₁ em leite e queijo.....	43
I.5 Conclusão.....	50
I. Referências.....	51
CAPÍTULO II: Ocorrência de aflatoxina M₁ durante o processamento de queijo Minas Frescal em laticínios Brasileiros.....	57
II. Resumo	57
II.1 Introdução	58

II.2 Material e métodos	59
II.2.1 Planejamento amostral	59
II.2.2 Reagentes e soluções.....	60
II.2.3 Instrumentos.....	60
II.2.4 Preparo das amostras.....	60
II.3 Resultado e discussão.....	61
II.4 Conclusão	65
II. Referências	66
CAPÍTULO III: Redução da disponibilidade de aflatoxina M₁ por células não viáveis de bactérias ácido lácticas e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em queijo Minas Frescal	69
III.1 Resumo.....	69
III.2 Introdução	70
III.3 Material e métodos.....	71
III.3.1 Cepas de bactérias ácido lácticas e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	71
III.3.2 Preparo do leite e design experimental.....	71
III.3.3 Preparo do queijo Minas Frescal	72
III.3.4 Determinação de aflatoxina M ₁ no queijo Minas Frescal.....	73
III.3.5 Análises físico-químicas e microbiológicas do queijo Minas Frescal.....	74
III.3.6 Análise estatística	74
III.4 Resultado e discussão.....	74
III.5 Conclusão.....	81
III.Referências	82
CAPÍTULO IV: Uso de microscopia eletrônica de varredura para avaliar a interação entre bactérias ácido lácticas, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e aflatoxina M₁ adicionados ao queijo Minas Frescal	85
IV.1. Resumo.....	85
IV.2. Introdução.....	86
IV.3. Material e métodos.....	87
IV.3.1 Material	87
IV.3.1.1 Produção do queijo Minas Frescal	87
IV.3.1.2 Ensaio de microscopia eletrônica de varredura	88
IV.3.1.3 Análise das imagens	88

IV.4. Resultado e discussão.....	88
IV.5. Conclusão	96
IV. Referências.....	97
4. CONCLUSÕES GERAIS	99
5. SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS	100

1. APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado teve como hipótese principal que 1) a ocorrência de aflatoxina M_1 (AFM₁) no Brasil é frequente, no entanto em baixos níveis e 2) bactérias ácido lácticas (BAL) e *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) podem ser utilizadas para a fabricação de queijo Minas Frescal como aditivos para reduzir os níveis de AFM₁ sem alterar o tempo de vida de prateleira deste queijo. Para isso foi realizada a avaliação da ocorrência de AFM₁ em leite e queijo Minas Frescal de diferentes laticínios localizados no estado de São Paulo, que utilizassem ou não BAL na produção do queijo Minas Frescal. Em uma segunda etapa foi realizada a produção do queijo Minas Frescal, dividido em oito tratamentos diferentes (queijo, queijo com BAL, queijo com Sc, queijo com BAL e Sc, queijo com AFM₁, queijo com AFM₁ e BAL, queijo com AFM₁ e Sc e queijo com AFM₁, BAL e Sc) para avaliar o efeito do uso destes aditivos biológicos na redução da AFM₁ e sobre o tempo de vida de prateleira. As análises (i) para quantificação de AFM₁ foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e avaliação do tempo de vida de prateleira foi realizada através de (ii) análises microbiológicas e (iii) físico-químicas. Também foi feita análise por (iv) microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar a ligação microrganismo-AFM₁, bem como a microestrutura do queijo. Os temas são discutidos nos capítulos deste documento, correspondem a artigos científicos submetidos para publicação em periódicos científicos.

2. INTRODUÇÃO

2.1 Micotoxinas

O termo micotoxina é originário de uma palavra grega “*mykes*” (fungo) e de uma palavra do latim “*toxicum*” (toxina ou veneno) (OLIVEIRA; CORASSIN, 2014). São metabólitos secundários, de baixo peso molecular, produzidos por fungos filamentosos (FREIRE et al., 2007; HUANG et al., 2014), considerados contaminantes naturais, podendo desenvolver-se em produtos alimentícios (SHEPHARD, 2008; TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009). A presença de micotoxinas em alimentos tem sido considerada generalizada, estudos estimam que cerca de 25% das culturas agrícolas do mundo estão contaminadas com estas toxinas (BENNET; KLICH, 2003). A maioria das micotoxinas estável e resiste aos métodos de processamento utilizados na indústria de alimentos (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007).

Segundo Bryden (2012) a presença de micotoxinas em alimentos acarreta em diversos efeitos tóxicos ao organismo, afetando principalmente os humanos. Em condições propícias de umidade e temperatura, os fungos toxigênicos podem contaminar alimentos em diferentes fases de produção e transformação, e produzir micotoxinas que quando ingeridas pelos animais, podem ser transferidas para a carne, leite e ovos (YIANNIKOURIS; JOUANY, 2002). Esta forma de contaminação pode acarretar em manifestações agudas ou crônicas de doenças podendo ser considerado um importante problema de saúde pública, (HUSSEIN; BRASEL, 2001; BARREIRA; ALVITO; ALMEIDA, 2010; WILD; GONG, 2010). As intoxicações decorrentes da ingestão das micotoxinas são denominadas micotoxicoses e acometem seres humanos e animais. A gravidade das micotoxicoses é principalmente dependente da toxicidade da micotoxina, do grau de exposição, da idade e do estado nutricional do indivíduo (PERAICA et al., 2000; SHEPHARD, 2008).

Lactentes e crianças são mais susceptíveis às micotoxinas do que os adultos, devido ao menor peso corporal, maior taxa metabólica, menor capacidade de desintoxicação e também em virtude do desenvolvimento incompleto de alguns órgãos e tecidos, tal como o sistema nervoso central (WHO, 2002). Além disso, o efeito das micotoxinas depende da dose e do período de tempo que a toxina é ingerida, podendo ser resultar em intoxicação aguda quando tem-se a ingestão de grande quantidade por curto período de tempo ou crônica quando há a ingestão de pequenas quantidades por longos períodos de tempo (MURPHY et al., 2006; NIERMAN et al., 2008) .

2.2 Aflatoxinas e efeitos tóxicos

De todas as micotoxinas conhecidas, um dos grupos mais conhecidos e amplamente distribuídos em alimentos, com propriedades tóxicas comprovadas são o das aflatoxinas (VARGA et al., 2015; CAMPAGNOLLO et al., 2016) que podem ser produzidas por aproximadamente vinte espécies de três diferentes espécies de *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. nidulantes* e *A. ochraceorosei*), sendo *Aspergillus flavus* o principal produtor de aflatoxinas (ELSANHOTY et al., 2014).

As aflatoxinas fazem parte de um grupo de compostos denominados furanocumarinas e todos os compostos pertencentes a esse grupo possuem um núcleo, cumarina, associado ao furano e à lactona (Figura 1) (ARAÚJO, 2012).

Figura 1- Estrutura química dos anéis furano cumarina presentes nas aflatoxinas

Fonte: Adaptado de: ARAÚJO, J. M. A. Aflatoxinas. In: _____. **Química de alimentos: teoria e prática**. 5. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2012. p. 340-352.

A descoberta das aflatoxinas ocorreu em 1960, na Inglaterra, devido à ocorrência de um surto causado por uma doença desconhecida (denominada doença x), que causou a morte de cerca de 100 mil perus (PERAICA et al., 2000; BHAT; RAI; KARIM, 2010). No ano de 1962 alguns estudos relataram a ingestão do amendoim contaminado com grande quantidade de hifas de *Aspergillus flavus* como o responsável pela doença. Logo, o fator tóxico, causador da doença, foi detectado por cromatografia em camada delgada (CCD) e denominado de aflatoxina. A denominação aflatoxina surgiu da combinação do gênero e da espécie causadora do surto, respectivamente, *Aspergillus* “a” e *flavus* “fla” adicionado da palavra toxina. A divisão nos grupos B e G deve-se a detecção sob luz ultravioleta (UV), onde são observados compostos com fluorescência azul (aflatoxina B - *Blue*) e verde (Aflatoxina G - *Green*) (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005).

Já foram identificados aproximadamente 18 diferentes tipos de aflatoxinas, sendo as de maior interesse médico-sanitário as aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁ (Figura 2) (SPINOSA;

GÓRNIAK; PALERMO-NETO, 2008; BHAT; RAI; KARIM, 2010). Dentre estas, a AFB₁ é a que tem recebido maior atenção, pois segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) esta aflatoxina é considerada um carcinógeno do Grupo 1, sendo responsável pela formação de carcinoma hepato-celular em humanos (BARKAI-GOLAN, 2008; ZAIN, 2011). A entrada das aflatoxinas no organismo ocorre principalmente pela via digestiva em decorrência de sua lipossolubilidade, sendo absorvidas no trato gastrointestinal e distribuídas a diferentes órgãos, tais como: músculos, rins, tecido adiposo e principalmente fígado, onde pode resultar em carcinoma hepato-celular (FORRESTER et al., 1990; SPINOSA; GÓRNIAK; PALERMO-NETO, 2008).

Após a ingestão, a aflatoxina B₁ é biotransformada no fígado (Figura 3) pelo sistema enzimático citocromo P450, este processo é complexo e envolve múltiplas vias tais como: epoxidação, O-desalquilação, que dá origem a AFP₁, redução que origina aflatoxicol e ainda a hidroxilação, formando AFM₁, AFQ₁ e AFB₂α (WU et al., 2009).

Figura 2 - Estrutura química das principais aflatoxinas

Fonte: INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY - ICHEM. **Environmental health criterial 11**. Geneve: ICHEM, 1979. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc011.htm>>. Acesso em: 20 set. 2019.

Para manifestar seus efeitos tóxicos, a AFB₁, precisa passar por ativação metabólica, originando sua forma ativada, composto denominado como AFB₁-8,9-óxido (CHU, 1991). Este composto é bastante eletrofílico sendo capaz de reagir rapidamente com macromoléculas, a exemplo do ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) e proteínas (LIN et al., 2006). A ligação covalente da AFB₁-8,9-óxido com o DNA modifica a estrutura deste desencadeando os efeitos mutagênicos e neoplásicos ocasionadas pela AFB₁ (LIN et al., 2006).

A aflatoxicose é o nome dado ao envenenamento resultante da ingestão de níveis moderados a altos de aflatoxinas através de alimentos contaminados. No que diz respeito à saúde animal, várias espécies são sensíveis aos efeitos agudos e crônicos das aflatoxinas (OSWEILER, 1990; TEIXEIRA, 2008; ANDRADE, 2012).

Os efeitos das micotoxinas são mais graves em animais monogástricos, uma vez que os ruminantes, devido à microbiota ruminal, tem a capacidade de biotransformar as micotoxinas em compostos, na maioria dos casos, menos tóxicos (GONÇALVES; CORASSIN; OLIVEIRA, 2015). Porém, quando vacas leiteiras consomem alimentos contaminados com aflatoxinas, parte destas, serão degradadas pelos microrganismos do rúmen, formando o metabólito aflatoxicol (KUILMAN et al., 1998). A fração não degradada é absorvida por difusão passiva e metabolizada no fígado onde ocorre a biotransformação para AFM₁ que é excretada no leite e na urina (FINK-GREMMELS, 2008). Cerca de 0,3% a 6,2% da AFB₁ ingerida através da ração, é transformada em AFM₁ no leite, existindo uma relação linear entre a AFB₁ consumida pelos animais e a quantidade de AFM₁ excretada no leite (GONÇALVES et al., 2017).

Evidências da exposição humana à AFM₁, através do consumo de leite e derivados, têm sido demonstradas por meio de pesquisas (OLIVEIRA; GERMANO, 1997; OLIVEIRA; FERRAZ, 2007; GHAZANI, 2009; SHUNDO et al., 2009; FERNANDES et al., 2012; BOVO et al., 2013; CORASSIN et al., 2013).

Campagnollo et al. (2016) publicaram uma revisão sobre a ocorrência de AFM₁ em leite e produtos lácteos, no mundo, e relataram que a incidência mundial de AFM₁ é alta, no entanto, os níveis encontrados são baixos.

Figura 3 - Processo de biotransformação da aflatoxina B₁

Fonte: INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY - ICHEM. **Environmental health criterial 11**. Geneve: ICHEM, 1979. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc011.htm>>. Acesso em: 20 set. 2019.

2.3 Aflatoxinas em alimentos

Há séculos é sabido que a atividade dos fungos proporciona alterações no sabor e na qualidade dos alimentos, podendo ocasionar alterações desejáveis (fabricação de queijo *Roquefort*) e indesejáveis, tais como o surgimento de sabores e odores desagradáveis nos alimentos (DINIZ, 2002).

A ocorrência das aflatoxinas em alimentos é quase inevitável e influenciada por diversos fatores ambientais (ABBAS, 2005). A extensão da contaminação por aflatoxinas não é

previsível, podendo variar com as práticas agrícolas e com a susceptibilidade do produto à invasão do fungo (ARAÚJO, 2012).

De acordo com Oliveira e Corassin (2014) o *Aspergillus* spp. cresce em uma ampla variedade de substratos, e a maioria dos alimentos e rações estão susceptíveis a invasão por cepas aflatoxigênicas, em qualquer estágio de produção, processamento ou estocagem. Neste contexto, as aflatoxinas podem ser encontradas como contaminantes naturais nos cereais (principalmente no milho, trigo, sorgo e arroz), subprodutos de cereais, bagaços de oleaginosas (algodão, amendoim, colza, coco e girassol), mandioca e todo um conjunto de alimentos para humanos tais como frutas secas, oleaginosas (nozes, amêndoas, castanha do Brasil), especiarias (pimenta, coentro, açafrão), leite e produtos lácteos (OLIVEIRA et al., 2009; BHAT; RAI; KARIM, 2010; CORASSIN et al., 2013; CAMPAGNOLLO et al., 2016).

Estas toxinas estão presentes no mundo inteiro, no entanto em maiores proporções nas áreas de clima tropical. Sua formação em produtos agrícolas ocorre em condições de tempo quente e úmido, e em instalações de armazenagem deficientes ou inadequadas (ABBAS, 2005).

Os fatores de maior influência sobre o crescimento e a produção de aflatoxinas são a umidade relativa do ar, que deve ser superior a 80%, e a temperatura, a qual deve estar entre 36 a 38 °C para um melhor crescimento do fungo e entre 25 a 27 °C para a produção máxima de toxina. Além disto, a produção desta toxina pode ser influenciada por alguns outros fatores tais como: composição de substrato, pH, teor de oxigênio e dióxido de carbono, competição microbiana, danos mecânicos, linhagem do fungo contaminante, estresse da planta e uso de fertilizantes ou fungicidas (MAGAN; OLSEN, 2006; BRYDEN, 2012; SCUSSEL et al., 2018).

A presença de AFM₁ em leite e produtos lácteos é uma preocupação global, uma que vez estes produtos são frequentemente consumidos, por um percentual da sociedade considerada mais vulnerável a exemplo dos idosos e por um percentual não imuno-competente como crianças e lactentes (PRANDINI et al., 2009; FALLAH, 2010; FERNANDES et al., 2012; BOVO et al., 2013). Evidências da exposição humana à AFM₁, através do consumo de leite têm sido demonstradas por meio de pesquisas. Ghanem e Orfi (2009) analisaram 74 amostras de leite cru, na Síria, e relataram 70% (52) das amostras estavam contaminadas com AFM₁ com níveis variando entre 0,02 µg e 0,765 µg de AFM₁/L de leite. Em Portugal, Martins, Guerra e Bernardo (2005) analisaram durante seis anos (1999-2005) 598 amostras de leite cru e relataram que 394 (65,8%) estavam contaminadas com níveis de AFM₁ que variaram de 0,041 µg/L a

0,05 µg/L. Em Marrocos, El Marnissi et al. (2012) realizaram um estudo entre os anos de 2009-2010, no qual analisaram 48 amostras de leite cru; relatando que 27% (13) das amostras estavam contaminadas com níveis de AFM₁ que variaram entre 0,01 µg/L a 0,1 µg/L. No Irã, Mohamadi Sani, Khezri e Moradnia (2012) analisaram 42 amostras de leite pasteurizado e relataram que somente 1 amostra estava livre de contaminação por AFM₁, os níveis de contaminação nas 41 amostras variaram de 0,006 a 0,071 µg/L, sendo que nenhuma amostra estava acima do limite permitido pela legislação iraniana (0,5 µg/L). Na Índia, Siddappa, Nanjegowda e Viswanath (2012) realizaram um estudo no qual analisaram 45 amostras de leite UHT e relataram que todas as amostras (100%) estavam contaminadas com AFM₁ e ressaltaram que 38% (17) estavam com níveis acima de 0,5 µg/kg, que é o limite máximo permitido pela legislação vigente em seu país. Na China, Guo, Yuan e Yue (2013) analisaram 233 amostras de leite e relataram que 48% (112) estavam contaminadas com níveis médios de AFM₁ de 0,215 µg/kg. Na Argentina, López et al. (2003) analisaram 56 amostras de leite cru e 16 amostras de leite pasteurizado e relataram que 6 amostras de leite cru estavam contaminadas níveis médios de AFM₁ de 0,016 µg/L e metade das amostras de leite pasteurizado (8) estavam contaminadas com níveis médios de AFM₁ de 0,013 µg/L.

Garrido et al. (2003), realizaram um estudo em Ribeirão Preto (SP), no qual analisaram 60 amostras de leite UHT e 79 de leite pasteurizado e relataram que 88% (53) das amostras de leite UHT e 73,4% (58) das amostras de leite pasteurizado estavam contaminadas com níveis de AFM₁ variando de 0,015 a 0,5 µg/L. González et al. (2005) coletaram 43 amostras de UHT de 27 municípios do estado de São Paulo e relataram que 39,5% (17) estavam contaminadas com AFM₁. Destas 17 amostras, 64,7% (11) estavam com níveis de AFM₁ acima do permitido pela legislação brasileira (0,5 µg/L). Pereira et al. (2005) realizaram um estudo no estado de Minas Gerais onde analisaram 36 amostras de leite cru, de duas propriedades diferentes, e relataram que 52,8% (19) das amostras estavam contaminadas com níveis de AFM₁ que variaram de traços a 0,741 µg/L. Sassahara, Pontes Netto e Yanaka (2005), em um estudo realizado no norte do Paraná, analisaram 42 amostras de leite cru e relataram que 24% (10) estavam contaminadas com AFM₁, e que destas, 3 apresentaram níveis acima do permitido pela legislação. Shundo et al. (2009) investigaram a presença de AFM₁ em amostras de leite em pó, leite pasteurizado e leite UHT na cidade de São Paulo. Das 125 amostras analisadas, 119 (95,2%) foram positivas para AFM₁, com níveis que variaram de 0,010 – 0,20 µg/kg de leite.

Oliveira et al. (2010) determinaram a incidência de AFB₁ em rações e AFM₁ no leite de propriedades do estado de São Paulo, cerca de 40% das rações continham AFB₁ e 36,7% das amostras de leite foram positivas para AFM₁, porém somente em uma amostra foi detectado um nível acima do limite permitido pela legislação. Picinin et al. (2013), em um estudo realizado em Minas Gerais, coletaram 129 amostras de leite cru e relataram que todas as amostras estavam contaminadas com AFM₁, sendo que 18 estavam acima do limite permitido pela legislação.

Estes estudos indicam claramente que a presença de AFM₁ em leite tem distribuição mundial. Devido às aflatoxinas serem estáveis à secagem e ao processamento térmico, precisam de temperaturas entre 237 e 306°C para serem degradadas (RUSTOM, 1997). Tratamentos térmicos usuais no leite, como a pasteurização rápida (92°C a 95°C por 1 a 3 minutos) não reduzem as concentrações de AFM₁ no leite (GOVARIS et al., 2002; JASUTIENE; GARMIENTE; KULIKAUSKIENE, 2006).

Outro fator importante da presença da AFM₁ em produtos lácteos é a distribuição não homogênea desta toxina, sendo que a maior parte da AFM₁ está presente na porção proteica devido seu caráter semi-polar (GALVANO; GALOFARO; GALVANO, 1996; PRANDINI et al., 2009). Derivados lácteos desidratados ou que sofram reduções no conteúdo de água durante o processamento, terão uma maior concentração dos níveis de AFM₁ (MIDIO; MARTINS, 2000).

Em relação a AFM₁ em queijos, de um modo geral, há diversos fatores a considerar: tipo de queijo, etapas de processamento, tipo de leite usado para produzir (cru ou pasteurizado), espécie animal do qual o leite foi obtido (bovino, caprino ou ovino), se há período de maturação, adição de ervas entre outros (CAMPAGNOLLO et al., 2016). Prado et al. (2001), contudo relataram que a principal ocorrência de AFM₁ em queijo é devido ao uso de leite contaminado. Estudos a respeito da presença de AFM₁ em queijos têm sido realizados em todo mundo: Fallah (2010), Tavakoli et al. (2012) e Mohajeri et al. (2013) realizaram um estudo no Irã; Iqbal e Asi (2013) realizaram estudo no Paquistão; Anfossi et al. (2012) e Santini et al. (2013) realizaram estudo na Itália. No Brasil, os estudos sobre incidência de AFM₁ em queijo são escassos se comparados a estudos de incidência desta toxina em leite. Prado et al. (2000), Oliveira et al. (2011), Iha et al. (2011) e Trombete et al. (2014) realizaram estudo no Brasil.

2.4 Características gerais do queijo Fresco

O queijo primitivo era apenas o leite coagulado, desprovido de soro e salgado. No século XIX aconteceu o grande boom no consumo do queijo, afinal, a sua produção que era artesanal passou para a ordem industrial, sendo o processo de pasteurização fundamental para esta etapa (CHALITA et al., 2009). Ao longo dos tempos, o queijo evoluiu até os que conhecemos hoje e a grande variação tipológica dos queijos está relacionada a adaptação deste produto aos diferentes gostos e costumes culturais (IEPHA, 2012). Neste contexto, os queijos, de um modo geral, podem ser definidos, segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) como produto fresco ou maturado obtido por separação parcial do soro de leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos, podendo ser coagulados por ação de enzimas, de ácidos orgânicos e por combinação de ambos, com ou sem agregação de substâncias alimentares e/ ou especiarias, condimentos, aditivos, corantes entre outros (BRASIL, 1996).

O queijo Minas Frescal, considerado o único genuinamente nacional, é um produto de grande aceitação no mercado, de elaboração simples e alto rendimento de fabricação, o que atrai o interesse de indústrias de pequeno, médio e grande porte. O queijo Minas tradicional é produzido no Brasil desde o período colonial, sua fabricação teve início com a vinda de famílias portuguesas para a região de Minas Gerais. Estas famílias trouxeram para a região seu hábito de produzir queijo a partir de leite fresco (FURTADO, 2005; PEREIRA, 2007).

De acordo com a legislação brasileira de 2004, define-se como queijo Minas Frescal, o queijo fresco obtido por meio da coagulação enzimática do leite com o coalho e/ou outras enzimas coagulantes. É um queijo semi-gordo, de alta umidade, a ser consumido fresco. Em sua composição os ingredientes obrigatórios são leite e/ou leite reconstituído, coalho ou outras enzimas coagulantes e os opcionais são cloreto de sódio, cloreto de cálcio e cultivo de bactérias lácticas específicas. Em relação à consistência, é branda e macia, apresenta cor esbranquiçada, sabor suave ou levemente ácido, odor suave e característico, forma cilíndrica e peso de 0,3 a 5,0 kg. Possui como característica no processo de elaboração a obtenção de uma massa coalhada, dessorada, não prensada e não maturada (BRASIL, 2004). O queijo pronto apresenta, em média, a seguinte composição: 55% a 58% de umidade; 17% a 19% de gordura; teor de sal variando entre 1,4% e 1,6%; e pH entre 5,0 e 5,3 (SILVA, 2005).

2.5 Produção e consumo, nacional de queijos

A produção Brasileira de queijos vem crescendo continuamente nos últimos anos, segundo o relatório da Mintel (Global Market Research & Market Insight), o mercado Brasileiro de queijos, cresceu em volume 9,4% ao ano e em faturamento total 7,7% ao ano no período de 2006 a 2013. Segundo estes mesmos autores, deverá aumentar seu ritmo de crescimento até 2017 (CARVALHO; VENTURINI; GALAN, 2015). Corroborando com estes dados, a Conab relata que no ano de 2005 a produção de queijos no Brasil era de 500.000 toneladas, no ano de 2008 a produção foi de 600.000 toneladas, em 2011 foi de 700.000 e em 2016 foi de cerca de 800.000 toneladas (CONAB, 2016). Segundo Cruz et al. (2017) em volume de produção, o Brasil, ocupa a sexta posição estando entre os maiores produtores mundiais de queijos, e os principais tipos de queijos produzidos em nosso país são mussarela, prato, requeijões, Petit Suisse e Minas Frescal. No entanto, devido à alta demanda em nosso país, é necessário importar queijo, cerca de 200.000 toneladas por ano. Em contraste com a alta demanda, o consumo de queijo por habitante, no Brasil (4 kg/ habitante/ ano) é pequeno se comparado a outros países, como exemplo a França (20 kg/ habitantes/ ano) (CRUZ et al., 2017).

De acordo com o reportado pelo site Milkpoint, em julho de 2019, o Brasil nos últimos anos vem mantendo a produção de queijo em torno de 800.000 toneladas por ano, considerando apenas as empresas que possuem Selo de Inspeção. Já o queijo Minas Frescal, segundo a Associação Brasileira de Indústrias de Queijo (ABIQ), vem tendo uma expansão em sua produção. Em 2008, eram produzidas 34.700 toneladas; em 2011, foram produzidas 46.090 toneladas; e em 2018 foram produzidas 69.698 toneladas, o que representa um aumento de 49.78% em uma década. Na Figura 4 é possível observar o quanto a produção de queijo Minas Frescal corresponde dentro do total de queijos produzidos no Brasil, em porcentagem.

Figura 4 – Porcentagem de queijo Minas Frescal produzido em relação ao total de queijos produzidos no Brasil.

Fonte: Própria Autoria (2019). Figura montada a partir dos dados fornecidos pela ABIQ.

2.6 Métodos de controle de aflatoxinas em leite e derivados

Para evitar a contaminação da dieta animal, por aflatoxinas, pode-se fazer uso de melhorias das práticas agrícolas (realização de rotação de culturas, uso de fertilizantes, época de plantio entre outros), agentes antifúngicos, engenharia genética (melhoramento genético e transgênicos) e técnicas de armazenamento (JOBIM; GONÇALVES; SANTOS, 2001; MUNKVOLD, 2003; MIEDANER et al., 2006; TROMBETE; FRAGA; SALDANHA, 2013). No entanto, uma vez que estes alimentos já estão contaminados, pode-se fazer uso de adsorventes na ração animal, com o intuito de reduzir a biodisponibilidade destas toxinas e assim, evitar a excreção da AFM₁ no leite, tal como descrito por Firmin et al. (2011), Queiroz et al. (2012) e Gonçalves et al. (2017).

Todavia, se a AFM₁ estiver presente no leite, de acordo com Fallah (2010), Manetta et al. (2009) e Trombete, Fraga e Saldanha (2013), estará presente também em seus derivados lácteos. Segundo estes mesmos autores isto ocorre porque a AFM₁ é estável as diversas etapas de processamento para fabricação dos derivados lácteos (como pasteurização, UHT, coagulação do leite, acidificação etc.) e também, porque a AFM₁ se liga a fração proteica do leite (CAMPAGNOLLO et al., 2016).

Neste contexto, diversos métodos têm sido utilizados para reduzir a disponibilidade de micotoxinas, principalmente as aflatoxinas, em alimentos destinados diretamente para humanos. De acordo com Bovo, Corassin e Oliveira (2010), estes métodos podem ser físicos, químicos ou biológicos.

Os métodos físicos utilizados para a redução da disponibilidade de micotoxinas envolvem procedimentos como inativação térmica, luz ultravioleta, radiação ionizante ou extração com solventes. Os métodos químicos utilizam agentes que degradam estruturalmente as micotoxinas, como o uso de cloração (hipoclorito de sódio e cloro gasoso), agentes antioxidantes (peróxido de hidrogênio, ozônio e bissulfito de sódio) ou agentes hidrolíticos (ácidos, álcalis e amônia) (EL-NEZAMI et al., 1998). No entanto, de acordo com Magan e Olsen (2006) ambos os métodos possuem desvantagens, seja por não reduzir a disponibilidade de maneira eficiente, deixarem resíduos no alimento ou por apresentarem custos elevados. Logo, a utilização de microrganismos para degradar micotoxinas, tornou-se uma alternativa atrativa para o controle ou redução da disponibilidade destas toxinas em alimentos (ALBERTS et al., 2006; FAZELI et al., 2009; CORASSIN et al., 2013; GONÇALVES et al., 2015)

Os métodos biológicos decorrem da atuação de microrganismos, quanto aos agentes podem ser: a) bactérias, b) leveduras e c) algas sobre as micotoxinas. Quanto aos mecanismos podem ser: a) competição por nutrientes, b) espaço, c) interação e d) antibiose (FAZELI et al., 2009). Os métodos de redução de disponibilidade biológicos vêm sendo bastante estudados, uma vez que apresentam uma boa eficiência e custo-benefício. Além disso, em muitos casos os microrganismos já são utilizados na produção de alimentos, tais como as bactérias ácido-láticas e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (CORASSIN et al., 2013; GONÇALVES; CORASSIN; OLIVEIRA, 2015).

Referências

- ABBAS, H. K. **Aflatoxin and food safety**. Boca Raton: CRC Press, 2005.
- ALBERTS, J. F.; ENGELBRECHT, Y.; STEYN, P. S.; HOLZAPFEL, W. H.; ZYL, W. H. Van. Biological degradation of aflatoxin B₁ by *Rhodococcus erythropolis* cultures. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 109, p. 121–126, 2006.
- ANDRADE, P. D. **Aflatoxinas e ocratoxina A na dieta de lactentes e adultos: desenvolvimento de metodologia e avaliação da exposição**. 2012. 116 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.
- ANFOSSI, L. et al. Occurrence of aflatoxin M₁ in Italian cheese: results of a survey conducted in 2010 and correlation with manufacturing, production season, milking animals, and maturation of cheese. **Food Control**, Kidlington, v. 25, p. 125-130, 2012.
- ARAÚJO, A. J. M. Aflatoxinas. In: **Química de alimentos: teoria e prática**. 5. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2012. p. 340–352.
- BARKAI-GOLAN, R. **Aspergillus mycotoxins**. In: _____. *Mycotoxins in fruits and vegetables*. San Diego: Academic Press, 2008.
- BARREIRA, M. J.; ALVITO, P. C.; ALMEIDA, C. M. M. Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal. **Food Chemistry**, Washington, v. 121, n. 3, p. 653–658, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.085>>.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria MAARA nº 183, de 21 de março de 1996. Regulamento Técnico MERCOSUL sobre seus limites máximos admissíveis no leite, amendoim e milho. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, de 25 de março de 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 4/2004. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Minas frescal**. Disponível em: <<http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=viewTextual&código=5974>>. Acesso em: 21 jun. 2017.
- BENNET, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v.16, n. 3, p. 497-516, 2003.
- BAHT, R.; RAI, R. V.; KARIM, A. A. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 9, p. 57-81, 2010.
- BOVO, F.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. Descontaminação de Aflatoxinas em Alimentos por Bactérias Ácido-Láticas. **UNOPAR Científica – Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 12, n. 2, p. 15–21, 2010.
- BOVO, F.; CORASSIN, C. H.; ROSIM, R. E.; DE OLIVEIRA, C. A. F. Efficiency of Lactic Acid Bacteria Strains for Decontamination of Aflatoxin M₁ in Phosphate Buffer Saline

Solution and in Skimmed Milk. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 6, n. 8, p. 2230–2234, 2013.

BRYDEN, W. L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: implications for animal productivity and feed security. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 173, p. 134–158, 2012.

BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1–2, p. 140–146, 2007.

CAMPAGNOLLO, F. B. et al. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M₁: a review. **Food Control**, Kidlington, v. 68, p. 310–329, 2016.

CARVALHO, M. P.; VENTURINI, C. E. P.; GALAN, V. B. **As grandes oportunidades do mercado de queijos no Brasil**. Milkpoint Mercado, fev. 2015. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/industria/radar-tecnico/mercado/as-grandes-oportunidades-do-mercado-de-queijos-no-brasil-93301n.aspx>>. Acesso em: 21 jun. 2017.

CHALITA, M. A. N.; SILVA, R. de O. P. e; PETTI, R. H. V.; SILVA, C. R. L. da. Algumas considerações sobre a fragilidade das concepções de qualidades no mercado de queijos no Brasil. **Informações Econômicas**, v. 39, n. 6, p. 78–88, 2009.

CHU, F. Mycotoxins : food contamination , mechanism , carcinogenic potential and preventive measures. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 259, p. 291–306, 1991.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Leite e Derivados. **Conjuntura Mensal**, Brasília, abril 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_05_04_17_33_34_leite_abril_2016.pdf>. Acesso em: 21 jun. 2017.

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

CRUZ, A. G. et al. **Processamento de produtos lácteos**: queijos, leites fermentados, bebidas lácteas, sorvete, manteiga, creme de leite, doce de leite, soro em pó e lácteos funcionais. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. (Coleção Lácteos, v. 3).

DINIZ, S. P. S. S. **Micotoxinas**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2002.

EL-NEZAMI, H. et al. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B₁. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 36, p. 321–326, 1998.

EL-MARNISSI, B. et al. Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk collected from traditional dairies in Morocco. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, p. 2819–2821. 2012.

ELSANHOTY, R. M. et al. Detoxification of aflatoxin M₁ in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria. **Food Control**, Kidlington, v. 43, p. 129–134, 2014.

FALLAH, A. A. Assessment of aflatoxin M₁ contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 3, p. 988–991, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.01.014>>.

FAZELI, M. R. et al. Aflatoxin B₁ binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 1, p. 189-192, 2009.

FERNANDES, A. M. et al. Distribution and stability of aflatoxin M₁ during processing and storage of Minas Frescal cheese. **Food Control**, Kidlington, v. 24, n. 1–2, p. 104–108, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.010>>.

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

FIRMIN, S. et al. Effectiveness of modified yeast cell wall extracts to reduce aflatoxin B₁ absorption in dairy ewes. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 11, p. 5611-5619, 2011.

FORRESTER, L. M. et al. Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B₁ metabolism in human liver. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v. 87, p. 8306-8310. 1990.

FREIRE, F. C. O. et al. **Micotoxinas**: importância na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007.

FRITZEN-FREIRE, C. B. et al. The influence of Bifidobacterium Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 4, p. 621–627, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.09.010>>.

FURTADO, M.M. **Principais problemas dos queijos**: causas e prevenção. São Paulo: Fonte Comunicação e Editora, 2005.

GALVANO, F.; GALOFARO, V.; GALVANO, G. Occurrence and Stability of Aflatoxin M₁ in Milk and Milk Products: A Worldwide Review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 10, p. 1079–1090, 1996.

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

GHANEM, I.; ORFI, M. Aflatoxin M₁ in raw, pasteurized and powdered milk available in the Syrian market. **Food Control**, Kidlington, v. 20, n. 6, p. 603–605, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.08.018>>.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.04.011>>.

GONÇALEZ, G. et al. Ocorrência de aflatoxina M₁ em leite bovino comercializado em

alguns municípios do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, p. 435-438, 2005.

GONÇALVES, B. L. et al. Effects of different sources of *Saccharomyces cerevisiae* biomass on milk production, composition and aflatoxin M₁ excretion in milk from dairy cows fed aflatoxin B₁. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.100, p. 5701-5708, 2017.

GONÇALVES, B. L.; CORASSIN, C. .; OLIVEIRA, C. A. F. Mycotoxicoses in dairy cattle: a review. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 10, p. 752–760, 2015.

GONÇALVES, B. L. et al. The invitro ability of different *Saccharomyces cerevisiae* - based products to bind aflatoxin B₁. **Food Control**, Kidlington, v. 47, 2015.

GOVARIS, A. et al. Distribution and stability of aflatoxin M₁ during production and storage of yoghurt. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 19, p.1043-1050, 2002.

GUO, Y.; YUAN, Y.; YUE, T. Aflatoxin M₁ in Milk Products in China and Dietary Risk Assessment. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 76, n. 5, p. 849–853, 2013.
Disponível em: <<http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X.JFP-12-419>>.

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

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

INSTITUTO ESTADUAL DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO DE MINAS GERAIS - IEPHA. **História do queijo**. 2012. Disponível em: <<http://www.iepha.mg.gov.br>>. Acesso em: 21 jun. 2017.

IHA, M. H. et al. Occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products in Brazil. **Food Control**, Kidlington, v. 22, n. 12, p. 1971–1974, 2011.

IQBAL, S. Z.; ASI, M. R. Assessment of aflatoxin M₁ in milk and milk products from Punjab, Pakistan. **Food Control**, Kidlington, v. 30, n. 1, p. 235–239, 2013.

JASUTIENE, I.; GARMINE, G.; KULIKAUSKIENE, M. Pasteurisation and fermentation effects on Aflatoxin M₁ stability. **Milchwissenschaft**, Kempten, v. 61, p. 75-79, 2006.

JOBIM, C. C.; GONÇALVES, G. D.; SANTOS, G. T. Qualidade sanitária de grãos e de forragens conservadas versus desempenho animal e qualidade de seus produtos. In: Simpósio sobre produção e utilização de forragens conservadas, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM, 2001.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 12, p. 937-947, 2005.

- KUILMAN, M. E. M. et al. Bovine hepatic metabolism of aflatoxin B₁. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 2707-2713, 1998.
- LIN, W. C. et al. Inhibitory effect of CDA-II, a urinary preparation, on aflatoxin B₁-induced oxidative stress and DNA damage in primary cultured rat hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 44, p. 546-551, 2006.
- LÓPEZ, C. E. et al. Presence of aflatoxin M₁ in milk for human consumption in Argentina. **Food Control**, Kidlington, v.14, p. 31-34, 2003.
- MAGAN, N.; OLSEN, M. **Mycotoxins in food: detection and control**. Boca Raton: CRC Press, 2006.
- MANETTA, A. C. et al. Distribution of aflatoxin M₁ during Grana Padano cheese production from naturally contaminated milk. **Food Chemistry**, Washington, v. 113, n. 2, p. 595-599, 2009.
- MARTINS, H. M.; GUERRA, M. M.; BERNARDO, F. A six year survey (1999-2004) of the occurrence of aflatoxin M₁ in daily products produced in Portugal. **Mycotoxin Research**, Heidelberg, v. 21, p. 192-195, 2005.
- MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000.
- MIEDANER, T. et al. Stacking quantitative trait loci (QLT) for Fusarium head blight resistance from non-adapted sources in European elite spring wheat background and assessing their effects on deoxynivalenol (DON) content and disease severity. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 112, p. 562-569, 2006.
- MOHAJERI, F. A. et al. Aflatoxin M₁ contamination in white and Lighvan cheese marketed in Rafsanjan, Iran. **Food Control**, Kidlington, v. 33, n. 2, p. 525-527, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.002>>.
- MOHAMADI-SANI, A. et al. Determination of aflatoxin M₁ in milk by ELISA technique in Mashad (Northeast of Iran). **International Scholarly Research Notices: Toxicology**, New York, p. 1-4, 2012.
- MUNKVOLD, G. P. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 99-116, 2003.
- MURPHY, P. A. et al. Food mycotoxins: an update. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 71, n. 5, p. 51-65, 2006.
- NIERMAN, W. C. et al. Mycotoxin production and prevention of aflatoxin contamination in food and feed. In: GOLDMAN, G. H.; OSMANI, S. A. **The aspergilli genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods**. New York: CRC Press, 2008. cap. 27, p. 457-472.
- OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 4, 1997.

- OLIVEIRA, C. A. F.; FERRAZ, J. C. O. Occurrence of aflatoxin M₁ in pasteurised, UHT milk and milk powder from goat origin. **Food Control**, Kidlington, v. 18, n. 4, p. 375–378,
- OLIVEIRA, C. A. F. et al. Determination of aflatoxins in peanut products in the northeast region of São Paulo, Brazil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 1, p. 174–183, 2009.
- OLIVEIRA, C. A. F. et al. Determinação de aflatoxina B₁ em rações e aflatoxina M₁ no leite de propriedades do estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, p. 221-225, 2010.
- OLIVEIRA, C. A. F. et al. M. Survey of aflatoxin M₁ in cheese from the North-east region of São Paulo, Brazil. **Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance**, London, v. 4, n. 1, p. 57–60, 2011.
- OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H. Aflatoxins. In: DUARTE, S. C.; PENA, A. L. S.; LINO, C. M. (Orgs.). **Mycotoxins and their implications in food safety**. London: Future Science Ltd, 2014. v. 1, p. 6-19.
- OSWEILER, G. D. Mycotoxins and livestock: What role do fungal toxins play in illness and production losses? **Veterinary Medicine**, Lenexa, v. 85, p. 89-94, 1990.
- PERAICA, M. et al. Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. **Boletim de la Organización Mundial de Salud**, Genebra, n. 2, p. 80-92, 2000.
- PEREIRA, M. M. G. et al. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais - Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 106–112, 2005.
- PEREIRA, R. B. **Caracterização microbiológica de alguns tipos regionais de queijos brasileiros**. 2007. 31 f. Monografia (Conclusão do curso) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, 2007.
- PICININ, L. C. A. et al. Influence of climate conditions on aflatoxin M₁ contamination in raw milk from Minas Gerais State, Brazil. **Food Control**, Kidlington, v. 31, n. 2, p. 419–424, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.10.024>>.
- PRADO, G. et al. Aflatoxina M₁ em queijo prato e parmesão determinada por coluna de imunoafinidade e cromatografia líquida. **Rev Inst Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 60, p. 147–151, 2001.
- PRADO, G. et al. 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, 2000.
- PRANDINI, A. et al. On the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, p. 984-991, 2009.

QUEIROZ, O. C. M. et al. Effect of adding a mycotoxin-sequestering agent on milk aflatoxin M₁ concentration and the performance and immune response of dairy cattle fed an aflatoxin B₁-contaminated diet. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, p. 5901-5908, 2012.

RUSTOM, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, Kidlington, v. 59, n. 1, p. 57–67, 1997.

SANTINI, A. et al. Aflatoxin M₁ in raw, UHT milk and dairy products in Sicily (Italy). **Food Additives and Contaminants: Part B**, London, v. 6, n. 3, p. 181–186, 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19393210.2013.780186>>.

SASSAHARA, M.; PONTES NETTO, D.; YANAKA, E. K. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M₁ in raw milk in the North of Paraná state. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 43, n. 6, p. 981–984, 2005.

SCUSSEL, M.V. et al. Armazenagem de Grãos. Jundiaí, São Paulo: IBG, 2018.

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

SHUNDO, L. et al. Estimate of aflatoxin M₁ exposure in milk and occurrence in Brazil. **Food Control**, Kidlington, v. 20, n. 7, p. 655–657, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.09.019>>.

SIDDAPPA, V.; NANJEGOWDA, D. K.; VISWANATH, P. Occurrence of aflatoxin M₁ in some samples of UHT, raw & pasteurized milk from Indian states of Karnataka and Tamilnadu. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, n. 11, p. 4158–4162, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.034>>.

SILVA, F. T. **Queijo Minas frescal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/11884/2/00076200.pdf>>. Acesso em: 19 jun. 2017.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. Barueri: Manole, 2008.

TAVAKOLI, H. R. et al. Occurrence of aflatoxin M₁ in white cheese samples from Tehran, Iran. **Food Control**, Kidlington, v. 23, n. 1, p. 293–295, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.07.024>>.

TEIXEIRA, A. S. **Adequação e apresentação de parâmetros de validação intralaboratorial de um ensaio para a quantificação de aflatoxinas em Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K) através de cromatografia líquida de alta eficiência**. 2008. 57 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.

TROMBETE, F. et al. Aflatoxin M₁ contamination in grated parmesan cheese marketed in

Rio de Janeiro – Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 57, p. 269-273, 2014.

TROMBETE, F. M.; FRAGA, M. E.; SALDANHA, T. Contaminação de queijos por aflatoxina M₁: uma abordagem sobre a ocorrência e prevenção. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 68, n. 392, p. 40-48, 2013.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 632, n. 2, p. 168-180, 2009.

VARGA, E. et al. New tricks of an old enemy: isolates of *Fusarium graminearum* produce a type A trichothecene mycotoxin. **Environmental microbiology**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 2588-2600, 2015.

WILD, C. P.; GONG, Y. Y. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. **Carcinogenesis**, New York, v. 31, n. 1, p. 71-82, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **The world health report 2002 - reducing risks, promoting healthy life**. Geneve: WHO, 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/whr/2002/en/>>. Acesso em: 05 jan. 2017

WU, Q. et al. Biological degradation of aflatoxins. **Drug Metabolism Reviews**, New York, v. 41, n. 1, p. 1-17, 2009.

YIANNIKOURIS, A.; JOUANY, J. Review article Mycotoxins in feeds and their fate in animals : a review. **Animal Research**, Les Ulis, v. 51, p. 81–99, 2002.

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

3. OBJETIVO

3.1 Geral

O principal objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência de duas cepas de bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis*) e uma cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* na redução da disponibilidade de AFM₁ em queijo Minas Frescal produzido a partir de leite contaminado com AFM₁. Além disso, avaliar a ocorrência de AFM₁ no leite utilizado para produção de queijo Minas Frescal de 7 diferentes laticínios do estado de São Paulo.

3.2 Específico

Para atingir o objetivo geral foram desenvolvidas as seguintes atividades:

- 1) Coletar leite e queijo Minas frescal de 7 diferentes laticínios localizados no estado de São Paulo, avaliando a ocorrência de AFM₁ nestes produtos.
- 2) Produzir o queijo Minas Frescal para:
 - a. Verificar a redução de disponibilidade de AFM₁ com uso de bactérias ácido lácticas e *Saccharomyces cerevisiae*;
 - b. Avaliar os efeitos da adição de bactérias ácido lácticas e *Saccharomyces cerevisiae* sobre o tempo de vida de prateleira dos queijos Minas Frescal (parâmetros físico-químicos e microbiológicos).
 - c. Avaliar a ligação entre os microrganismos utilizados e AFM₁, bem como a estrutura do queijo Minas Frescal através de microscopia eletrônica de varredura.

CAPÍTULO I - Aflatoxina M₁: Métodos biológicos de redução de disponibilidade em leite e queijo

I.1 Resumo

As vacas leiteiras quando alimentadas com dietas contaminadas com aflatoxina B₁ (AFB₁) podem excretar aflatoxina M₁ (AFM₁) no leite como consequência da exposição alimentar. Uma vez que a AFM₁ é excretada no leite, ela estará presente em produtos lácteos, como queijo, iogurte, entre outros. Esta micotoxina é bastante resistente à temperatura, portanto, tratamentos térmicos como pasteurização e pasteurização à ultra-alta temperatura não são suficientes para inativá-la. Nesse contexto, este artigo fornece uma visão geral dos métodos de descontaminação biológica do leite e queijo estudados na última década, como uma contribuição para avaliar a evolução dessa estratégia e sua eficiência. Estudos relevantes publicados entre janeiro de 2009 e maio de 2019 foram selecionados após uma pesquisa sistemática da literatura nas bases de dados *PubMed*, *Science direct* e *Google Scholar*. De acordo com esta pesquisa na última década poucos estudos ($n = 11$) foram publicados sobre esses métodos e nenhum dos estudos publicados apresentou aplicabilidade em queijos. Ao longo da pesquisa, foram encontrados muitos estudos sobre métodos de redução de disponibilidade, no entanto, em solução tampão fosfato salina (PBS) ou em meio de cultura. Estudos adicionais sobre métodos de redução de disponibilidade biológicos em leite e principalmente em queijos e derivados lácteos são necessários para que essa técnica seja melhor desenvolvida e possa ser aplicada em larga escala nas indústrias.

Palavras-chave: Aflatoxina; leite; queijo; redução de disponibilidade biológica; revisão sistemática.

I.2 Introdução

As aflatoxinas são as micotoxinas mais conhecidas e distribuídas em alimentos e rações (WOCHNER et al., 2018). Dentre as aflatoxinas, principalmente a aflatoxina B₁ (AFB₁), é considerada potente agente carcinogênico, teratogênico e mutagênico. Quando os animais em lactação são alimentados com ração contendo aflatoxina AFB₁, esta é biotransformada, resultando em um novo composto denominado aflatoxina M₁ (AFM₁), que é solúvel e excretado no leite desses animais (FINK-GREMMELS, 2008; GONÇALVES; CORASSIN; OLIVEIRA, 2015). De acordo com *World Health Organization* e a *International Agency for Research on Cancer*, a AFB₁ e a AFM₁ são classificados como pertencentes ao grupo 1, cancerígenos para seres humanos (WHO, 2002).

Vários estudos evidenciaram a exposição humana à aflatoxina M₁ devido ao consumo de leite e derivados lácteos contaminados (SHUNDO et al., 2009; FERNANDES et al., 2012; BOVO et al., 2013; CORASSIN et al., 2013; TROMBETE; FRAGA; SALDANHA, 2013; CAMPAGNOLLO et al., 2016; WOMACK; SPARKS; BROWN, 2016).

Uma vez no leite, a AFM₁ não é degradada e pode resistir a diferentes tratamentos industriais, incluindo a esterilização do leite ou a qualquer outro tratamento térmico (CAMPAGNOLLO et al., 2016; ASSAF et al., 2018a). O leite e os produtos lácteos são frequentemente consumidos por uma parcela da população considerada vulnerável, como crianças e idosos (FALLAH et al., 2009; PRANDINI et al., 2009). Pelas razões mencionadas acima, a contaminação com AFM₁ é um sério problema de saúde.

Os conhecimentos sobre os impactos negativos das aflatoxinas na economia e na saúde levaram a investigações de estratégias para prevenir sua formação em alimentos, além de eliminar, inativar ou reduzir a biodisponibilidade dessas toxinas em produtos contaminados (CORASSIN et al., 2013; GONÇALVES; CORASSIN; OLIVEIRA, 2015). Melhorias nas práticas agrícolas, agentes antifúngicos e engenharia genética podem ser utilizadas como meio de prevenção (GONÇALEZ et al., 2005). A eliminação ou inativação da aflatoxina pode ser alcançada por métodos físicos, químicos e biológicos (CORASSIN et al., 2013).

Métodos físicos e químicos não são os mais adequados em termos de segurança, economia e qualidade do produto, porque não são eficazes na remoção de contaminantes, possuem altos custos e causam danos nutricionais e sensoriais ao produto (STOEV, 2013; WOCHNER et al., 2018). Assim, os métodos biológicos surgiram e ganharam popularidade

devido à serem mais seguros e menos agressivos ao meio ambiente e a saúde (PENG et al., 2018).

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi revisar os métodos biológicos de descontaminação de aflatoxina M_1 em leite e queijo publicados na última década como contribuição para avaliar a evolução dessa estratégia e sua eficiência, de acordo com seus autores.

1.2.1 Estratégia de pesquisa

A pesquisa bibliográfica, os critérios de inclusão e exclusão e a coleta de dados foram realizados com base no protocolo *Cochrane* (HIGGINS, 2011). Estudos relevantes publicados entre janeiro de 2009 e maio de 2019 foram selecionados após uma pesquisa sistemática nos seguintes bancos de dados *PubMed*, *Science Direct* e *Google Scholar*, usando palavras-chave como: “Aflatoxin M_1 ”, *probiotics and lactic acid bacteria binding* OU “Aflatoxin M_1 in milk”, *probiotics and lactic acid bacteria binding* OU “biological degradation”, *aflatoxin M_1 in dairy products* OU “biological binding”, *aflatoxin M_1 in milk*.

1.2.1.1 Critério de inclusão e exclusão

Durante a primeira triagem, os textos completos dos artigos potencialmente elegíveis foram baixados. Em seguida, as citações transferidas foram examinadas duas vezes para critérios de inclusão e elegibilidade final. Os critérios de inclusão foram: (1) dados descritivos transversais, (2) artigo com texto completo disponível (3) pesquisas originais, (4) método de descontaminação utilizado e (5) tipo de produto examinado (leite ou queijo). Além disso, para evitar qualquer erro no processo de tradução e também a clareza da expressão dos dados, com base em estudos de metanálise publicados anteriormente em *Ciência dos Alimentos* (CHERKANI-HASSANI; MOJEMMI; MOUANE, 2016; KHANEGHAH et al., 2018), apenas artigos publicados em inglês foram incluídos. As citações que não atendiam a esses critérios foram excluídas.

1.2.1.2 Seleção de dados

Após a triagem, 404 artigos foram selecionados e avaliados quanto à elegibilidade. 393 artigos foram excluídos na avaliação inicial devido a duplicidade com base no título e no conteúdo do resumo. Por fim, 11 artigos atenderam aos critérios de inclusão e foram incluídos na revisão.

I.3 Aflatoxina M₁ em leite, queijo e métodos de descontaminação

I.3.1 Síntese e excreção da aflatoxina M₁

Um dos grupos de micotoxinas mais conhecidos e amplamente distribuídos nos alimentos, com propriedades tóxicas comprovadas, são as aflatoxinas (VARGA et al., 2015; CAMPAGNOLLO et al., 2016) podem ser produzidas por aproximadamente vinte espécies, três espécies diferentes do gênero *Aspergillus*, sendo *Aspergillus flavus* o principal produtor de aflatoxinas (ELSANHOTY et al., 2014).

A ocorrência de aflatoxinas nos alimentos é inevitável e influenciada por fatores ambientais. A extensão de sua contaminação não é previsível e pode variar de acordo com as práticas agrônômicas e a suscetibilidade do produto à invasão de fungos durante as etapas de pré-colheita, armazenamento e processamento (ARAÚJO, 2012). O *Aspergillus spp.* cresce em uma ampla variedade de substratos, e a maioria dos alimentos e rações é suscetível à invasão por cepas aflatoxigênicas em qualquer estágio de produção, processamento ou armazenamento (OLIVEIRA; CORASSIN, 2014). Nesse contexto, as aflatoxinas podem ser encontradas como contaminantes naturais em cereais, subprodutos de cereais, sementes oleaginosas, mandioca e todo um conjunto de alimentos para humanos, como frutas secas, especiarias, sementes oleaginosas, leite e produtos lácteos (BHAT; RAI; KARIM, 2010; GONÇALVES; CORASSIN; OLIVEIRA, 2015).

As aflatoxinas estão presentes em todo o mundo, mas principalmente em áreas de clima tropical. Sua ocorrência em produtos agrícolas acontece em condições de clima quente e úmido e em instalações de armazenamento ruins ou inadequadas. Os fatores mais influentes no crescimento e produção de aflatoxinas são a umidade e a temperatura do ar, sendo a umidade ideal acima de 80% e a temperatura máxima de produção de toxinas entre 25 e 27 °C (ABBAS, 2005; SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008). A produção de aflatoxina pode ser influenciada por alguns outros fatores, tais como: composição do substrato, pH, conteúdo de oxigênio e dióxido de carbono, competição microbiana, dano mecânico, linhagem de fungos contaminantes, estresse das plantas e uso de fungicidas (HUSSEIN; BRASEL, 2001; MAGAN; OLSEN, 2006).

A nutrição é um dos fatores mais importantes na produção leiteira, representando o principal custo dessa atividade. As necessidades nutricionais das vacas leiteiras variam de acordo com o estágio da prenhez e lactação. Os nutrientes requeridos pelas vacas leiteiras são energia, fibra, proteína, água, vitaminas e minerais. A pastagem fornece uma fonte equilibrada

de ração, no entanto, não é suficiente para suprir as necessidades nutricionais das vacas leiteiras de alta produção. A energia é o fator decisivo na produção de leite: determina a produção e composição do leite, bem como o peso corporal. As principais fontes de energia na alimentação das vacas leiteiras são carboidratos e fibras (silagem de milho, milho moído, semente de algodão integral, milho sem casca com alta umidade, farelo de glúten de milho, casca de soja e farelo). Proteínas e gorduras em alimentos para animais também podem ser usadas como fontes de energia (GONÇALVES; CORASSIN; OLIVEIRA, 2015).

A alimentação de gado leiteiro pode ser naturalmente e simultaneamente contaminada por vários fungos capazes de produzir diferentes toxinas. De acordo com Alonso et al. (2013) a maior parte da silagem é composta de culturas anuais. Portanto, a concentração de micotoxinas na ração pode variar anualmente. Várias espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Claviceps* e outras compõem a microbiota de armazenamento e são responsáveis pela produção de micotoxinas encontradas em grãos e forragens (GONÇALVES; CORASSIN; OLIVEIRA, 2015).

O gado leiteiro é altamente exposto à ação das micotoxinas devido à dependência de concentrados e volumosos armazenados, como feno ou silagem (JOBIM; GONÇALVES; SANTOS, 2001). Os ruminantes são menos suscetíveis aos efeitos das micotoxinas, porque o rúmen é composto por microrganismos (fungos, bactérias e protozoários). Entre esses, os protozoários são os principais microrganismos responsáveis pela desintoxicação das micotoxinas (GONÇALVES; CORASSIN; OLIVEIRA, 2015). Esse processo, no entanto, nem sempre é eficiente e alguns metabólitos tóxicos podem ser excretados no leite (EFSA, 2004; JOUANY; DIAZ, 2005).

Quando o gado leiteiro ingere alimentos que contêm aflatoxinas (principalmente AFB₁), parte é degradada por microrganismos do rúmen, resultando no metabólito aflatoxicol (KUILMAN et al., 1998). A fração restante, não degradada, é absorvida por difusão passiva (FINK-GREMMELS, 2008) e metabolizada no fígado, onde ocorre a biotransformação em AFM₁, podendo ser excretada no leite e na urina (OATLEY et al., 2000; MURPHY et al., 2006).

1.3.2 Prevalência de aflatoxina M₁ em leite e queijo

O leite é o produto da ordenha completa e ininterrupta de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. É o primeiro alimento consumido pelo homem e um dos mais completos. O leite possui elementos essenciais, micronutrientes, aminoácidos e ácidos graxos em porções maiores do que em qualquer outro produto. Além disso, contém proteínas de alta qualidade, alta

porcentagem de cálcio e algumas substâncias bioativas como enzimas, hormônios e citocinas (FAO, 2019).

O queijo é um dos alimentos mais antigos registrados em toda a história da humanidade. Os egípcios estão entre os primeiros a domesticar cabras e ovelhas, sendo também um dos primeiros a usar leite e queijo como fonte de alimento (CRUZ et al., 2017). O queijo primitivo era apenas leite coagulado, desprovido de soro de leite e salgado. No século XIX, o grande boom ocorreu no consumo de queijo, afinal, sua produção passou da escala industrial artesanal, e o processo de pasteurização é fundamental para essa mudança (CHALITA et al., 2009). Ao longo dos tempos, o queijo evoluiu para o que é conhecido hoje e a grande variação tipológica dos queijos está relacionada à adaptação deste produto aos diferentes gostos e costumes culturais (IEPHA, 2012).

A ocorrência de aflatoxina M₁ no queijo produzido a partir de leite contaminado com essa toxina é uma realidade já descrita por vários autores (MANETTA et al., 2009; IHA et al., 2011; KAV; COL; KAAAN TEKINSEN, 2011; FERNANDES et al., 2012; KOLUAÇIK; TIRPANCİ SIVRI; KAPTAN, 2015; ARMORINI et al., 2016; CAMPAGNOLLO et al., 2016; SHAHBAZI; NIKOUSEFAT; KARAMI, 2017; LI et al., 2017; XIONG et al., 2018; HASSAN et al., 2018; YILMAZ; ALTINCI, 2019). Em relação à presença de AFM₁ nos queijos, além da presença da toxina no leite, outros fatores devem ser considerados, como: tipo de queijo, etapas de processamento, tipo de leite utilizado na produção (cru ou pasteurizado), se houver período de maturação, adição de ervas entre outras (CAMPAGNOLLO et al., 2016).

A preocupação com os impactos negativos das aflatoxinas na saúde e na economia levou à investigação de estratégias para impedir sua formação em alimentos (principalmente rações para animais), além de eliminar, inativar ou reduzir a disponibilidade dessas micotoxinas em produtos contaminados (BOVO; CORASSIN; OLIVEIRA, 2010; CORASSIN et al., 2013; GONÇALVES et al., 2015, 2017).

A contaminação pode ser evitada por boas práticas agrícolas, agentes antifúngicos, engenharia genética e controle de armazenamento. A eliminação ou inativação de micotoxinas pode ser alcançada por métodos físicos, químicos e biológicos (CORASSIN et al., 2013; TROMBETE; FRAGA; SALDANHA, 2013). No entanto, como esses alimentos já estão contaminados, os adsorventes podem ser usados na alimentação animal, a fim de reduzir a biodisponibilidade dessas micotoxinas e, assim, evitar a excreção de AFM₁ no leite, conforme descrito por (FIRMIN et al., 2011; GONÇALVES et al., 2017).

Se os métodos mencionados anteriormente não forem aplicados e a AFM₁ estiver presente no leite, segundo Fallah (2010), Manetta et al. (2009) e Trombete, Fraga e Saldanha (2013), também estará presente em seus derivados lácteos (queijo, iogurtes etc.). Segundo os mesmos autores e Campagnollo et al. (2016) isso ocorre porque a AFM₁ é estável nas várias etapas do processamento para a fabricação de produtos lácteos, como pasteurização, UHT, coagulação do leite, acidificação, etc. Além disso, Ardic et al. (2009) enfatizaram que o queijo é uma fonte potencial de AFM₁ quando comparado a outros produtos lácteos, porque a AFM₁ está associada à caseína, que é altamente concentrada durante sua produção.

1.3.3 Métodos de redução de disponibilidade

Vários métodos têm sido utilizados para reduzir a disponibilidade de micotoxinas, especialmente aflatoxinas, em alimentos destinados ao ser humano. Esses métodos podem ser físicos, químicos ou biológicos (BOVO; CORASSIN; OLIVEIRA, 2010).

Os principais métodos físicos usados para reduzir a disponibilidade de micotoxinas são inativação térmica, luz ultravioleta, radiação ionizante ou extração com solventes. Os métodos químicos incluem cloração e agentes oxidantes ou hidrolíticos (EL-NEZAMI et al., 1998; OLIVEIRA; CORASSIN, 2014). Entretanto, os métodos físicos e químicos têm vantagens e desvantagens, pois não removem completamente a toxina, são caros e causam perdas nutricionais e organolépticas aos produtos (MAGAN; OLSEN, 2006). Portanto, o uso de microrganismos para degradar micotoxinas tornou-se uma alternativa atraente para controle ou redução da biodisponibilidade dessas toxinas nos alimentos (FAZELI et al., 2009; CORASSIN et al., 2013; GONÇALVES; CORASSIN; OLIVEIRA, 2015).

Os métodos biológicos são baseados na ação de microrganismos como leveduras, fungos, bactérias e algas sobre as micotoxinas, através da competição por nutrientes e espaço, interação e antibiose (FAZELI et al., 2009). Esses métodos de redução de disponibilidade têm sido bem estudados pois, são eficientes, econômicos e, em muitos casos, os microrganismos já são utilizados na produção de alimentos, como as bactérias ácido lácticas e a *Saccharomyces cerevisiae* (CORASSIN et al., 2013; GONÇALVES et al., 2015). De acordo com os critérios de inclusão e exclusão da pesquisa, foram selecionados onze artigos, publicados na última década, sobre métodos biológicos de descontaminação em leite e queijo, apresentados na Tabela 1.

I.4 Desafios e implicações dos métodos de redução de disponibilidade de aflatoxina M₁ em leite e queijo

Embora a ocorrência de aflatoxinas no leite e produtos lácteos tenha sido frequentemente relatada, há poucas informações sobre a redução de disponibilidade biológica nesses produtos. Na última década, alguns estudos em todo o mundo utilizaram a redução da disponibilidade através do uso de microrganismos sobre a aflatoxina M₁ como a estratégia mais promissora devido à sua eficácia, especificidade e comportamento ecológico para reduzir ou eliminar a possível contaminação por aflatoxinas (ISMAIL et al., 2016).

A principal preocupação com a exposição à aflatoxina M₁ e o consumo de produtos lácteos é a exposição de crianças e idosos (FALLAH, 2010). Os procedimentos de descontaminação podem ser físicos, químicos e biológicos, não devem modificar as propriedades nutricionais ou tecnológicas do leite e produtos lácteos e devem ser acessíveis e fáceis de usar (LEE; HER; LEE, 2015). Os métodos físicos e químicos não são os mais adequados em relação à segurança, economia, qualidade dos produtos tratados e altos custos ou resultam em danos nutricionais e sensoriais ao produto (WOCHNER et al., 2018). Nesse contexto, a proposta dos métodos biológicos de redução de disponibilidade, para aflatoxinas ou micotoxinas em geral, é melhorar a qualidade e a segurança dos produtos.

A aplicação de métodos biológicos para redução de disponibilidade de aflatoxinas tem sido perceptível nos últimos anos, resultando em novos dados conforme os estudos relatados na Tabela 1.

Foroughi e Sarabi (2019) testaram a descontaminação de amostras de leite contaminadas com diferentes concentrações de AFM₁ (0,08; 0,13; 0,18; 0,23 µg/L) usando *S. cerevisiae* 10⁸ (UFC/mL) imobilizada com perlita. As amostras de leite foram passadas por um biofiltro em três momentos diferentes do tratamento (20, 40 e 80 minutos). Para a amostra de leite com menor concentração de AFM₁ (0,08 µg/L), 40 minutos de tratamento foram suficientes para eliminar toda a toxina. Entretanto, na amostra com maior concentração (0,23 µg/L), o melhor resultado 81,3% foi obtido apenas no maior tempo de circulação. Segundo os autores, a quantidade de AFM₁ removida está relacionada à concentração inicial de toxina e ao tempo de circulação, em geral quanto maior o tratamento, menor a concentração de resíduo de AFM₁ presente no leite. Além disso, os autores relatam que o processamento influenciou a carga microbiana do leite, que aumentou linearmente com o aumento do tempo de circulação ($P < 0,05$); concluindo que o menor tempo de circulação seria o mais desejável. Apesar do aumento

da carga microbiana, as propriedades físico-químicas do leite não sofreram alterações. Os autores concluíram que o uso de *S. cerevisiae* imobilizada com perlita pode ser uma solução prática para resolver o problema de contaminação de aflatoxinas em produtos lácteos.

Kuharic et al. (2018) selecionaram, isolaram e identificaram dez espécies de bactérias ácido lácticas do leite e produtos lácteos, com o objetivo de selecionar uma cepa que se ligasse mais de maneira mais efetiva à AFM₁. Além disso, eles avaliaram se o tratamento térmico da BAL afetaria a capacidade de ligação. Para isso, os autores selecionaram 10 espécies de BAL, que poderiam ser utilizadas viáveis ou tratadas na concentração de 10⁸ (UFC/mL). Essas BALs foram adicionadas ao leite contendo AFM₁ (0,05 µg/L) e a capacidade de ligação foi avaliada após 2, 4 e 24 horas. Os autores relataram que a eficiência da ligação variou de 21 a 92% para células viáveis e de 26 a 94,5 % para células tratadas termicamente. De acordo com Kuharic et al. (2018), embora os mecanismos de ação das bactérias ácido lácticas sobre as aflatoxinas ainda não tenham sido totalmente elucidado, alguns estudos sugerem que as moléculas de AFM₁ ligam-se fisicamente aos componentes da parede celular, principalmente polissacarídeos e peptidoglicanos, em vez de criar ligações covalentes ou serem metabolizadas pelas bactérias ácido lácticas. Além disso, eles enfatizam que o tratamento térmico parece aumentar a superfície de ligação da AFM₁, fornecendo não apenas a parede da célula de BAL, mas também outros componentes. Finalmente, esses autores concluem que a ligação entre AFM₁-BAL é reversível e que a porcentagem de reversibilidade é maior em células não tratadas.

Ismail et al. (2017) avaliaram três linhagens de bactérias ácido lácticas, uma linhagem de *S. cerevisiae* e uma combinação de todas, em relação à capacidade de reduzir AFM₁ no leite. As amostras foram contaminadas com diferentes concentrações de AFM₁ (0,05 e 0,01 µg/L) e quatro diferentes concentrações de microrganismos foram testadas (10⁷, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰ UFC/mL). Os autores relataram que diferenças significativas foram observadas em relação à capacidade de ligação das diferentes concentrações de microrganismos nas diferentes concentrações de AFM₁. Eles observaram que a capacidade de ligação de cada microrganismo é diretamente proporcional à sua concentração, ou seja, a capacidade máxima de ligação foi registrada em 10¹⁰ UFC/mL e mínima em 10⁷ UFC/mL. Os autores também relataram que a tendência geral de ligação por microrganismos foi encontrada na seguinte ordem *S. cerevisiae* > combinação de microrganismos > *Lactobacillus helveticus* > *Lactobacillus plantarum* > *Lactococcus lactis*. Finalmente, os autores concluíram que a concentração de 10¹⁰ UFC/mL pode ser usada com eficiência para reduzir os níveis de AFM₁ até o limite considerado seguro

pela legislação; a ligação AFM₁-BAL é um processo reversível, uma vez que a lavagem do complexo resulta na liberação da AFM₁. Da mesma forma, Corassin et al. (2013) avaliaram a capacidade da *S. cerevisiae* e de uma combinação de três diferentes bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* e *Bifidobacterium lactis*) isoladamente ou em combinação para ligar AFM₁ em leite UHT com 0,5 µg de AFM₁/L. Todas as células de bactérias ácido lácticas (10¹⁰ UFC/mL) e *S. cerevisiae* (10⁹ UFC/mL) foram inativadas pelo calor (100 °C, 60 minutos) e depois utilizadas para verificar o efeito do tempo de contato (30 ou 60 minutos). Esses autores relataram que a *S. cerevisiae* apresentou maior capacidade de ligar-se a AFM₁ no leite que a combinação de bactérias ácido lácticas e, o uso da combinação de BAL e *S. cerevisiae*, resultou em um aumento significativo na porcentagem de AFM₁ ligada. Corroborando com estes resultados, Abdelmotilib et al. (2018) relataram que bactérias ácido lácticas e cepas de leveduras podem desintoxicar AFM₁ em leite contaminado. No entanto, uma combinação de BALs e leveduras poderia ser melhor para remoção e eliminação da AFM₁ no leite. Além disso, esses autores enfatizam que bactérias e leveduras podem ser usadas como aditivos alimentares para reduzir a biodisponibilidade das aflatoxinas em produtos lácteos.

El Khoury, Atoui e Yaghi (2011) relataram que quando comparadas culturas de bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) em PBS e leite desnatado, a ligação foi muito maior no leite. Segundo esses autores, o principal motivo disso ter ocorrido pode ser devido às propriedades de ligação da AFM₁ à caseína do leite. Além disso, enfatizaram que o nível de ligação de AFM₁ por *L. bulgaricus* aumentou com o tempo e, como eles esperavam, *S. thermophilus* mostrou uma menor capacidade de ligação para remover a AFM₁ em comparação com *L. bulgaricus*. Em conclusão, os autores relataram que BALs parecem desempenhar um papel crucial na remoção da AFM₁.

Bovo et al. (2013) compararam tratamentos para a ligação de AFM₁ no leite desnatado em duas temperaturas diferentes de 4 e 37 °C (no último T °C, os resultados são mostrados na Tabela 1. A porcentagem de ligação de AFM₁ no leite UHT desnatado a 4 °C foi 13,51; 19,7 e 37,75% para *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus* e *B. lactis*, respectivamente. Estes autores relataram que a temperatura não apresenta diferença significativa para *L. rhamnosus* e *B. lactis*, apenas para *L. bulgaricus* a 37 °C. Além disso, Bovo et al. (2013) enfatizam que o complexo BAL/AFM₁ era instável e a quantidade de toxina liberada na solução variou amplamente de cepa para cepa. Corroborando com estes resultados Serrano-Niño et al. (2013) relataram que a

capacidade de ligar-se a AFM₁ era um processo reversível, uma vez que todas as cepas testadas liberaram uma pequena porção da AFM₁ ligado após uma única lavagem com PBS. Além disso, esses autores enfatizaram que variações nas habilidades de ligação entre as cepas sugerem que diferentes locais de ligação podem estar presentes em diferentes linhagens e pode haver diferenças entre os locais em cada bactéria.

Tabela 1 - Métodos biológicos de redução de disponibilidade em leite em diferentes países nos últimos 10 anos (2009 até o momento).

Tipo de amostra analisada	Concentração inicial e final da toxina (µg/L ¹ ou µg/kg ²)	Porcentagem de descontaminação (%)	Tempo de Contato (minutos)	Método biológico e concentração	Referências
Leite	0,08- 0 ¹	100	40	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> immobilizated com perlita 10 ⁸ UFC/mL	Foroughi e Sarabi (2019)
	0,23- 0,043 ¹	81,3	80		
Leite desnatado	150-121,8 ¹	18,8	960	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10 ¹⁰ UFC/mL	Abdallah et al. (2018)
	150-110,1 ¹	26,6		<i>Lactobacillus rhamnosus</i> tratado termicamente 10 ¹⁰ UFC/mL	
Leite desnatado	50-9,72 ¹	80,5	720	Combinação de microrganismos tratados termicamente ^c 10 ⁹ UFC/mL	Abdelmotilib et al. (2018)
	50-6,68 ¹	86,6	1440		
	50-5,70 ¹	88,6	2880		
	50-4,56 ¹	90,9	4320		
Leite	0,05 – 0,0028 ²	94,5	120	<i>Lactobacillus plantarum</i> tratados termicamente 10 ⁸ UFC/mL	Kuharic et al. (2018)
Leite	0,05- 0 ¹	100	60	<i>Lactobacillus helveticus</i> 10 ¹⁰ UFC/mL	Ismail et al. (2017)
				Combinação de microrganismos ^a	
	0,01- 0,0008 ¹	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 10 ¹⁰ UFC/mL			
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 10 ¹⁰ UFC/mL			
		0,01-0,0013 ¹		87,0	

Leite	0,050-0,030	30,9	1440	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 10 ⁸ UFC/mL	El-Kest et al. (2016)
	0,050-0,010	78,3	2880		
	0,050 – 0,022	54,8	1440	<i>Bifidobacterium lactis</i> 10 ⁸ UFC/mL	
	0,050 – 0,019	62,5	2880		
	0,050 – 0,004	91,4	1440	<i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium lactis</i> 10 ⁶ UFC/mL	
	0,050 – 0,002	96,2	2880		
Leite desnatado	200 – 61,8	69,1	360	<i>Lactobacillus plantarum</i> 10 ⁸ UFC/mL	Abbès et al. (2013)
	200- 46,2	76,9	1440		
	200- 28,2	85,9	360	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10 ⁸ UFC/mL	
	200- 9,8	95,1	1440		
Leite UHT desnatado	0,5- 0,048 ¹	90,3	30	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>heat-treated</i> 10 ⁹ UFC/mL	Corassin et al. (2013)
	0,5- 0,037 ¹	92,7	60		
	0,5- 0,443 ¹	11,5	30	Combinação de bactérias ácido lácticas tratadas termicamente ^b 10 ¹⁰ UFC/mL	
	0,5-0,441	11,7	60		
	0,5-0 ¹	100	60	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> e combinação de bactérias ácido lácticas tratadas termicamente ^b 10 ¹⁰ UFC/mL	
Leite	10- 5,48 ¹	45,17	180	<i>Bifidobacterium bifidum</i> 10 ⁹ UFC/mL	Serrano-Niño et al. (2013)
	10- 6,78 ¹	32,20		<i>Lactobacillus johnsonii</i> 10 ⁹ UFC/mL	
	10-7,35 ¹	26,50		<i>Lactobacillus reuteri</i> 10 ⁹ UFC/mL	
	10-7,55 ¹	24,54		<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10 ¹⁰ UFC/mL	

Leite UHT desnatado	0,5 – 0,31	37,75	15	<i>Bifidobacterium lactis</i> tratadas termicamente 10 ¹⁰ UFC/mL	Bovo et al. (2013)
	0,5- 0,33	32,24		<i>Lactobacillus bulgaricus</i> tratadas termicamente 10 ¹⁰ UFC/mL	
	0,5- 0,37	24,46		<i>Lactobacillus bulgaricus</i> tratadas termicamente 10 ¹⁰ UFC/mL	
Leite Desnatado	50- 26,9 ¹	46,1	120	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> 10 ⁶ UFC/mL	El Khoury, Atoui e Yaghi (2011)
	50- 20,8 ¹	58,5	360		
	50- 38,7 ¹	22,6	120	<i>Streptococcus thermophilus</i> 10 ⁶ UFC/mL	
	50- 31,2 ¹	37,7	360		

^a*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis* e *Saccharomyces cerevisiae* (2:1:1:1). ^b*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *Bulgaricus* and *Bifidobacterium lactis*. ^c*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*.

1.5 Conclusão

A contaminação mundial de leite e queijo com aflatoxina M₁ é uma questão crucial, que se torna mais crítica principalmente devido à potencial exposição da dieta de crianças e idosos. O método mais eficaz para evitar micotoxinas em alimentos é prevenir a sua formação, principalmente através de melhorias agrícolas (melhoramento genético, rotação de culturas, técnicas de armazenamento entre outros). Uma vez que as aflatoxinas estão presentes nos alimentos, os métodos mais seguros de redução de disponibilidade, segundo alguns estudos em todo o mundo, é a utilização de microrganismos.

A redução de disponibilidade através do uso de microrganismos é uma estratégia promissora devido à sua eficácia e seu comportamento amigável com o meio ambiente.

O presente estudo revisou métodos biológicos para redução de disponibilidade da aflatoxina M₁ em leite e em queijo, bem como desafios e implicações nesses métodos. Observamos que, na última década, poucos estudos foram publicados sobre esses métodos e nenhum dos estudos publicados testou esses métodos no queijo. Ao longo da pesquisa, foram encontrados muitos estudos sobre métodos de redução de disponibilidade, porém em solução tampão fosfato salina ou em meio de cultura. Mais estudos sobre métodos de redução de disponibilidade biológicos em leite e principalmente em queijos e derivados lácteos são necessários para que essa técnica seja melhor desenvolvida e aplicada às indústrias.

I. Referências

ABBAS, H. K. **Aflatoxin and food safety**. Boca Raton: CR, 2005.

ABBÈS, S. et al. Ability of *Lactobacillus rhamnosus* GAF01 to remove AFM₁ in vitro and to counteract AFM₁ immunotoxicity in vivo bility of *Lactobacillus rhamnosus* GAF01 to remove AFM₁. **Journal of Immunotoxicology**, v. 10(3), 279-286.
<https://doi.org/10.3109/1547691X.2012.718810>

ABDALLAH, M. F. et al. Biological Control Control of of Mycotoxigenic Mycotoxigenic Fungi Fungi and and Their Their Toxins : An Update Update for for the the Pre-Harvest Pre-Harvest Approach Approach Mohamed. In: **Fungi and Mycotoxins - Their Occurrence, Impact and Health and Economy...** [s.l: s.n.]

ABDELMOTILIB, N. et al. Aflatoxin M₁ Reduction in Milk by a Novel Combination of Probiotic Bacterial and Yeast Strains. **European Journal of Nutrition & Food Safety**, v. 8, n. 2, p. 83–99, 2018. <https://doi.org/10.9734/ejnfs/2018/39486>

ALONSO, V. A. et al. Fungi and mycotoxins in silage: An overview. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 115, n. 3, p. 637–643, 2013. <https://doi.org/10.1111/jam.12178>

ARAÚJO, J. M. A. Aflatoxinas. In: _____. **Química de alimentos: teoria e prática**. 5. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2012. p. 340-352.

ARDIC, M. et al. Aflatoxin M₁ levels of Turkish white brined cheese. **Food Control**, Kidlington, v. 20, n. 3, p. 196–199, 2009. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.04.003>>.

ARMORINI, S. et al. Occurrence of aflatoxin M₁ in conventional and organic milk offered for sale in Italy. **Mycotoxin Research**, Heidelberg, v. 32, n. 4, p. 237–246, 2016. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1007/s12550-016-0256-8>>.

ASSAF, J. C. et al. A comparative study of procedures for binding of aflatoxin M₁ to *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 120–127, 2018a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2017.05.003>>.

ASSAF, J. C. et al. A novel technique for aflatoxin M₁ detoxification using chitin or treated shrimp shells: in vitro effect of physical and kinetic parameters on the binding stability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 102, n. 15, p. 6687–6697, 2018b. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12578>

BHAT, R.; RAI, R. V.; KARIM, A. A. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago. v. 9, p. 57-81, 2010.

BOVO, F. et al. Efficiency of Lactic Acid Bacteria Strains for Decontamination of Aflatoxin M₁ in Phosphate Buffer Saline Solution and in Skimmed Milk. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 6, n. 8, p. 2230–2234, 2013.

BOVO, F.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. De. Descontaminação de Aflatoxinas em Alimentos por Bactérias Ácido-Láticas. **UNOPAR Científica – Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina**, v. 12, n. 2, p. 15–21, 2010.

CAMPAGNOLLO, F. B. et al. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M₁: A review. **Food Control**, Kidlington, v. 68, p. 310–329, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.007>

CHALITA, M. A. N. et al. Algumas considerações sobre a fragilidade das concepções de qualidade no mercado de queijos no Brasil. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 39, p. 77-88, 2009.

CHERKANI-HASSANI, A.; MOJEMMI, B.; MOUANE, N. Occurrence and levels of mycotoxins and their metabolites in human breast milk associated to dietary habits and other factors: A systematic literature review, 1984-2015. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 50, p. 56–69, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.024>>.

CORASSIN, C. H. et al. Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M₁ in UHT skim milk. **Food Control**, Kidlington, v. 31, n. 1, p. 80–83, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.033>>.

CRUZ, A. G. et al. **Processamento de produtos lácteos**: queijos, leites fermentados, bebidas lácteas, sorvete, manteiga, creme de leite, doce de leite, soro em pó e lácteos funcionais. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. (Coleção Lácteos, v. 3).

EL-KEST, M. M. et al. Studies on Contamination of Dairy Products by Aflatoxin M₁ and Its Control by Probiotics. **Journal of Global Bioscience**, v.4(1), 1294-1312

EL-NEZAMI, H. et al. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B₁. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 321–326, 1998.

EL KHOURY, A.; ATOUI, A.; YAGHI, J. Analysis of aflatoxin M₁ in milk and yogurt and AFM₁ reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. **Food Control**, Kidlington, v. 22, n. 10, p. 1695–1699, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.04.001>>.

ELSANHOTY, R. M. et al. Detoxification of aflatoxin M₁ in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria. **Food Control**, Kidlington, v. 43, p. 129–134, 2014.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on request from the Commission related to Aflatoxin B₁ as undesirable substance in animal feed (2004). Italy. **EFSA Journal**.

FALLAH, A. A. et al. Determination of aflatoxin M₁ levels in Iranian white and cream cheese. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 8, p. 1872–1875, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.04.042>>.

FALLAH, A. A. Aflatoxin M₁ contamination in dairy products marketed in Iran during winter and summer. **Food Control**, Kidlington, v. 21, n. 11, p. 1478–1481, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.04.017>>.

FAO. Milk. In: **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. [s.l.] Food and Agriculture Organization, 2019.

FAZELI, M. R. et al. Aflatoxin B₁ binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 1, p. 189-192, 2009.

FERNANDES, A. M. et al. Distribution and stability of aflatoxin M₁ during processing and storage of Minas Frescal cheese. **Food Control**, Kidlington, v. 24, n. 1–2, p. 104–108, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.010>>.

FINK-GREMMEIS, J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. **Food Additives and Contaminants**, Abingdon, v. 25, n. 2, p. 172-180, 2008.

FIRMIN, S. et al. Effectiveness of modified yeast cell wall extracts to reduce aflatoxin B₁ absorption in dairy ewes. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 11, p. 5611-5619, 2011.

FOROUGHI, M.; SARABI, M. The use of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on activated alumina, and alumina silicate beads for the reduction of Aflatoxin M₁ in vitro. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, p. 1–7, 2019.

GONÇALVES, B. L.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. Mycotoxicoses in dairy cattle: A review. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 10, n. 11, 2015.

GONÇALVES, B. L. et al. The invitro ability of different *Saccharomyces cerevisiae* - based products to bind aflatoxin B₁. **Food Control**, Kidlington, v.47, p. 298-300, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.024>

GONÇALVES, B. L. et al. Effects of different sources of *Saccharomyces cerevisiae* biomass on milk production, composition, and aflatoxin M₁ excretion in milk from dairy cows fed aflatoxin B₁. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 100, n. 7, 2017.

GONÇALEZ, G. et al. Ocorrência de aflatoxina M₁ em leite bovino comercializado em alguns municípios do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, p. 435-438, 2005.

HASSAN, H. F.; KASSAIFY, Z. The risks associated with aflatoxins M₁ occurrence in Lebanese dairy products. **Food Control**, Kidlington, v. 37, n. 1, p. 68–72, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.022>>.

HASSAN, Z. U. et al. Evidence of low levels of aflatoxin M₁ in milk and dairy products marketed in Qatar. **Food Control**, Kidlington, v. 92, p. 25–29, 2018.

- HIGGINS, J. P. **Cochrane Handbook for conducting Systematic Reviews**. [s.l.] G.S, 2011.
- HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, Shannon, v. 167, p. 101-134, 2001.
- INSTITUTO ESTADUAL DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO DE MINAS GERAIS - IEPHA. **História do queijo**. 2012. Disponível em: <<http://www.iepha.mg.gov.br>>. Acesso em: 21 jun. 2017.
- IHA, M. H. et al. Occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products in Brazil. **Food Control**, Kidlington, v. 22, n. 12, p. 1971–1974, 1 dez. 2011.
- ISMAIL, A. et al. Aflatoxin M₁: Prevalence and decontamination strategies in milk and milk products. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 42, n. 3, p. 418–427, 2016.
- ISMAIL, A. et al. Effect of different microbial concentrations on binding of aflatoxin M₁ and stability testing. **Food Control**, Kidlington, v. 73, p. 492–496, 2017.
- JOBIM, C. C.; GONÇALVES, G. D.; SANTOS, G. T. Qualidade sanitária de grãos e de forragens conservadas versus desempenho animal e qualidade de seus produtos. In: Simpósio sobre produção e utilização de forragens conservadas, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM, 2001.
- JOUANY, J. P.; DIAZ, D. E. Effects of mycotoxins in ruminants. In: DIAZ, D. (Ed.). **The mycotoxins blue book**. Nottingham: University Press., 2005. p. 295–321.
- KAV, K.; COL, R.; KAAN TEKINSEN, K. Detection of aflatoxin M₁ levels by ELISA in white-brined Urfa cheese consumed in Turkey. **Food Control**, Kidlington, v. 22, n. 12, p. 1883–1886, 1 dez. 2011.
- KHANEGHAH, A. M. et al. Prevalence and concentration of ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol and total aflatoxin in cereal-based products : A systematic review and meta-analysis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.118, p. 830–848. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.037>
- KOLUAÇIK, A.; TIRPANCİ SIVRI, G.; KAPTAN, B. Aflatoxin M₁ Determination in Traditional Küp Cheese Samples of Turkey Using Immunoaffinity Column and High-Performance Liquid Chromatography. **Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology**, v. 3, n. 12, p. 916, 2015.
- KUHARIC, Z. et al. Removing aflatoxin M₁ from milk with native lactic acid bacteria, centrifugation and filtration. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 69, p. 334–339, 2018.
- KUILMAN, M. E. M. et al. Bovine hepatic metabolism of aflatoxin B₁. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 2707-2713, 1998.
- LEE, J.; HER, J. Y.; LEE, K. G. Reduction of aflatoxins (B₁, B₂, G₁, and G₂) in soybean-

based model systems. **Food Chemistry**, Washington, v. 189, p. 45–51, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.013>>.

LI, S. et al. Aflatoxin M₁ contamination in raw milk from major milk-producing areas of China during four seasons of 2016. **Food Control**, Kidlington, v. 82, p. 121–125, 1 dez. 2017.

MAGAN, N.; OLSEN, M. **Mycotoxins in food: detection and control**. Boca Raton: CRC Press, 2006.

MANETTA, A. C. et al. Distribution of aflatoxin M₁ during Grana Padano cheese production from naturally contaminated milk. **Food Chemistry**, Washington, v. 113, n. 2, p. 595–599, 2009.

MURPHY, P. A. et al. Food mycotoxins: an update. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 71, n. 5, p. 51–65, 2006.

OATLEY, J. T. et al. Binding of aflatoxin B₁ to bifidobacteria in vitro. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 8, p. 1133–1136, 2000.

OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H. Aflatoxins. In: DUARTE, S. C.; PENA, A. L. S.; LINO, C. M. (Org.). **Mycotoxins and their implications in food safety**. London: Future Science, 2014. v. 1, p. 6–19.

PENG, Z. et al. Current major degradation methods for aflatoxins: A review. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 80, n. August, p. 155–166, 2018.

PRANDINI, A. et al. On the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 984–991, 2009.

SERRANO-NIÑO, J. C. et al. Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of aflatoxin M₁ in artificially contaminated milk using an in vitro digestive model. **Food Control**, Kidlington, v. 31, n. 1, p. 202–207, 2013.

SHAHBAZI, Y.; NIKOUSEFAT, Z.; KARAMI, N. Occurrence, seasonal variation and risk assessment of exposure to aflatoxin M₁ in Iranian traditional cheeses. **Food Control**, Kidlington, v. 79, p. 356–362, 2017.

SHUNDO, L. et al. Estimate of aflatoxin M₁ exposure in milk and occurrence in Brazil. **Food Control**, Kidlington, v. 20, n. 7, p. 655–657, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.09.019>>.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. Barueri, SP: Manole, 2008.

STOEV, S. D. Food Safety and Increasing Hazard of Mycotoxin Occurrence in Foods and Feeds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 53, n. 9, p. 887–901, 2013.

TROMBETE, F. M.; FRAGA, M. E.; SALDANHA, T. Contaminação de queijos por aflatoxina M₁: uma abordagem sobre a ocorrência e prevenção. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 68, n. 392, p. 40-48, 2013.

VARGA, E. et al. New tricks of an old enemy: isolates of *Fusarium graminearum* produce a type A trichothecene mycotoxin. **Environmental microbiology**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 2588-2600, 2015.

WOCHNER, K. F. et al. The action of probiotic microorganisms on chemical contaminants in milk. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 44, n. 1, p. 112–123, 2018.

WOMACK, E. D.; SPARKS, D. L.; BROWN, A. E. Aflatoxin M₁ in milk and milk products: a short review. **World Mycotoxin Journal**, Wageningen, v. 9, n. 2, p. 305–315, 2016. Disponível em: <<http://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/WMJ2014.1867>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **The world health report 2002 - reducing risks, promoting healthy life**. Geneve: WHO, 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/whr/2002/en/>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

XIONG, J. et al. Occurrence of aflatoxin B₁ in dairy cow feedstuff and aflatoxin M₁ in UHT and pasteurized milk in central China. **Food Control**, Kidlington, v. 92, p. 386–390, 1 out. 2018.

YILMAZ, S.O; ALTINCI, A. Incidence of aflatoxin M₁ contamination in milk, white cheese, kashar and butter from Sakarya, Turkey. **Food Science and Technology**, London, v. 39, n. suppl 1, p. 190–194, 2019.

CAPÍTULO II: Ocorrência de aflatoxina M₁ durante o processamento de queijo Minas Frescal em laticínios Brasileiros

II. Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de aflatoxina M₁ (AFM₁) em amostras de leite cru a granel, leite pasteurizado e queijo Minas Frescal produzido a partir destes leites (n = 28 para cada tipo de produto) em 7 fábricas de processamento de queijo localizadas no estado de São Paulo, Brasil. Os procedimentos de amostragem foram realizados de maio a setembro de 2018 e a AFM₁ foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu® 10 VP, Kioto, Japão) composto por detector de fluorescência (10 RF-AXL). Os limites de detecção para leite e queijo foram de 0,0025 µg/L e 0,0017 µg/Kg. No geral, 34 amostras (40%, n = 84) apresentaram níveis detectáveis de AFM₁, incluindo 11 (39%), 15 (54%) e 8 (29%) amostras de leite cru, pasteurizado e queijo, respectivamente. Os níveis de AFM₁ variaram de 0,003 a 0,140 e 0,003 a 0,081 µg/L nos leites cru e pasteurizado, respectivamente, enquanto as amostras de queijo Minas Frescal apresentaram níveis variando de 0,026 a 0,616 µg/kg. Todas as amostras estavam dentro dos limites de tolerância adotados no Brasil para AFM₁ em leite (0,5 µg/L) e queijo (2,5 µg/kg). No entanto, duas amostras (7%) de leite pasteurizado e uma amostra (4%) de queijo Minas Frescal apresentaram níveis de AFM₁ que excederam os limites da União Europeia de 0,05 µg/L e 0,25 µg/kg para leite e queijo, respectivamente. Este estudo traz como inovação o fato de que é um estudo da incidência de AFM₁ em leite e queijo Minas Frescal que compara o efeito do uso de cultura *starter* na incidência de AFM₁ em queijo Minas Frescal. No presente estudo, houve uma baixa incidência de AFM₁ no queijo Minas Frescal, e essa toxina foi detectada apenas em queijos que não receberam cultura *starter*. A comparação dos nossos resultados com o de estudos anteriores é difícil pois, além dos estudos sobre a incidência de AFM₁ em queijo Minas Frescal serem escassos, os poucos estudos existentes não relatam o uso ou não da cultura *starter*.

Palavras-chave: AFM₁, leite, queijo Minas Frescal, ocorrência.

II.1 Introdução

As aflatoxinas são metabólitos secundários mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos, produzidos por espécies de fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, principalmente *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (OLIVEIRA; CORASSIN, 2014). A aflatoxina B₁ (AFB₁) é o principal metabólito tóxico produzido pelos fungos em cereais naturalmente contaminados e em outros produtos alimentícios, além de alimentos para animais. A alimentação de vacas leiteiras com forragem ou qualquer ingrediente contaminado com AFB₁ resulta na conversão metabólica da AFB₁ em aflatoxina M₁ (AFM₁), que é excretada no leite e pode estar presente em produtos lácteos, apesar dos tratamentos térmicos, isto ocorre devido à toxina ser altamente resistente ao calor (FINK-GREMMELS, 2008; CAMPAGNOLLO et al., 2016). A *International Agency for Research on Cancer* (2002) classificou a AFB₁ e a AFM₁ no Grupo 1 (carcinógenos humanos). Considerando os efeitos tóxicos da AFM₁, a União Europeia adotou limites máximos admissíveis de 0,05 µg/L e 0,25 µg/kg para leite e queijo, respectivamente (EUROPEAN COMMISSION, 2006). No Brasil, os limites de tolerância para leite e queijo são dez vezes superiores aos níveis da União Europeia, 0,5 µg/L e 2,5 µg/kg, respectivamente (BRASIL, 2011).

Leite e produtos lácteos são componentes essenciais da dieta humana sendo consumidos concomitantemente por pessoas de diferentes faixas etárias, principalmente crianças e idosos (FALLAH et al., 2009; PRANDINI et al., 2009; CAMPAGNOLLO et al., 2016). Por exemplo, há relatos de que o consumo de derivados lácteos representa cerca de 80% dos hábitos e ingestão alimentar de crianças em todo o mundo (SILVA et al., 2007). Portanto, a ocorrência de AFM₁ em leite e produtos lácteos torna-se um grave problema de saúde pública, pois vários estudos evidenciaram a exposição humana a AFM₁ associada ao consumo de leite e derivados (FERNANDES et al., 2012; CORASSIN et al., 2013; TROMBETE; FRAGA; SALDANHA, 2013; HASSAN; KASSAIFY, 2014; CAMPAGNOLLO et al., 2016; WOMACK; SPARKS; BROWN, 2016). No Brasil, os estudos disponíveis realizados na última década relataram altas incidências de AFM₁ em leite fluido, variando de 63% a 100%, com níveis variando de 0,0002 a 0,106 µg/L (SHUNDO et al., 2009, 2016; IHA et al., 2013; PICININ et al., 2013). Em relação à ocorrência de AFM₁ em queijos brasileiros, as porcentagens de amostras positivas variaram de 25 a 100% com níveis variando de 0,01 a 6,92 µg/kg (PRADO et al., 2000; IHA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; JAGER et al., 2013).

O queijo Minas Frescal é um queijo típico do Brasil, obtido por coagulação enzimática do leite com coalho, com ou sem adição de culturas *starter*, que contêm aproximadamente 62% de umidade e 19% de gordura, sendo amplamente consumido no Brasil (IHA et al., 2011). A transferência de AFM₁ do leite para o queijo Minas Frescal em condições experimentais varia de 31 a 42% (FERNANDES et al., 2012). No entanto, não existem estudos descrevendo a ocorrência de AFM₁ durante a fabricação de queijos Minas Frescal. Existem evidências de que várias espécies de bactérias ácido lácticas (BAL) comumente usadas como culturas *starter* na fabricação de queijos têm a capacidade de adsorver e/ou inativar a AFM₁ (PIERIDES et al., 2000; CORASSIN et al., 2013), embora a redução potencial no queijo ainda seja controversa (ORUC et al., 2007; FERNANDES et al., 2012). Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de AFM₁ durante o processo de fabricação de queijo Minas Frescal produzido com ou sem a adição de culturas *starter* de BAL em indústrias brasileiras de fabricação de queijo.

II.2 Material e métodos

II.2.1 Planejamento amostral

Este estudo foi realizado em sete indústrias produtoras de queijo localizadas na região nordeste do estado de São Paulo, Brasil. Foram coletadas 84 amostras de leite cru de tanque, leite pasteurizado e de queijo Minas Frescal ($N = 28$ por cada tipo de produto) entre maio e setembro de 2018. Em cada planta, foram amostrados quatro lotes de produção de queijo, totalizando 28 lotes de queijo Minas Frescal avaliados no estudo. No geral, os laticínios fabricaram o queijo Minas Frescal de acordo com os procedimentos descritos por Cruz et al. (2017), com algumas variações nos parâmetros de coagulação e tratamentos de coalhada. Resumidamente, o leite cru foi pasteurizado em lotes (62-65 °C por 30 min) e depois resfriado a 33-35 °C; em seguida, ao leite pasteurizado foi adicionado solução de cloreto de cálcio a 10 - 13% e coalho líquido. Três fábricas de processamento de queijo usavam culturas *starter* regulares contendo diferentes combinações de bactérias ácido lácticas (BAL) para a preparação dos queijos Minas Frescal, enquanto quatro fábricas preparavam os queijos sem adição de nenhum tipo de cultura *starter*. Após a adição de todos os ingredientes ao leite, a mistura foi incubada a 32-35°C até completa coagulação, cortada em pequenos cubos de 1-1,5 cm² e agitada suavemente. Após este procedimento, o soro era drenado e a coalhada transferida para as formas

(0,5-1,0 kg). Em todos os laticínios, os queijos foram armazenados a 4°C por 24 horas e embalados a vácuo em sacos de polietileno. Em cada lote de produção de queijo, foram coletadas amostras em recipientes estéreis, em duplicata, dos leites cru e pasteurizado (150 mL) usados para fabricação dos queijos Minas frescal. Após a finalização de todas etapas de produção, também foi coletada uma amostra do queijo Minas Frescal embalado. Todas as amostras foram transportadas para o laboratório em caixa térmica refrigerada e mantidas armazenadas a 4 °C até a análise da AFM₁.

II.2.2 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico e a água foi purificada por desionização (sistema Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA). O padrão de AFM₁ foi adquirido da *Sigma Chemical Company* (St Louis, Missouri, EUA). O metanol e acetonitrila, grau HPLC, foram obtidos da *EM Science* (Gibbstown, Nova Jersey, EUA). As colunas de imunoafinidade (IAC) Aflatest WB e Aflatest M₁ (Vicom®) foram adquiridas na *Waters Inc* (Milford, MA, EUA).

II.2.3 Instrumentos

Todas as análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência, Shimadzu 10VP (Kyoto, Japão), equipado com um detector de fluorescência 10 RF-AXL (excitação a 360 nm e emissão acima de 440 nm). Utilizou-se uma coluna Kinetex C₁₈ (Phenomenex, Torrance, CA, EUA) 4,6 × 150 mm, tamanho de partícula de 2,6 µm e um filtro em linha de 0,5 µm. A fase móvel utilizada foi isocrática, consistida de metanol/água/acetonitrila (61,4: 28,1: 10,5, v / v / v) com uma vazão de 0,50 mL/min. Os equipamentos utilizados neste estudo incluíram misturador vórtice (Fanem, São Paulo, Brasil); centrífuga (SOLAB SL-700, Piracicaba, Brasil); manifold (Supelco, Bellefonte, Pensilvânia, EUA) e bomba de vácuo (Modelo 131, tipo 2V, Primatec, Itu, Brasil).

II.2.4 Preparo das amostras

A AFM₁ foi extraída de amostras de leite e queijo e purificada de acordo com o fabricante das colunas de imunoafinidade (Aflatest, Vicam, Watertown, MA, EUA), com pequenas modificações, conforme descrito por Jager et al. (2013). Para o leite, 40 mL de amostra foram aquecidos a 37 °C por 10 min, adicionados de 1 g de cloreto de sódio e centrifugados a 2.078 x g por 5 min. A camada superior de gordura foi removida e a amostra

foi centrifugada novamente para remover a gordura restante. Então, a amostra foi filtrada através de filtro de papel (Whatman nº 4) e 30 mL foram recolhidos para passar na coluna de imunoafinidade, a qual foi conectada a uma seringa de vidro e a um sistema de vácuo (fluxo de 2–3 mL/min). A coluna foi lavada com 20 mL de água ultra-pura e a AFM₁ foi eluída com 1 mL de metanol. O eluato foi evaporado até a secura sob fluxo de nitrogênio e o extrato seco foi ressuspendido em 1 mL de metanol/água (50:50, v/v).

A quantificação de AFM₁ no queijo Minas Frescal foi determinada pesando 8 g de queijo macerado em um tubo Falcon, adicionado de 2 g de cloreto de sódio, 22 mL de metanol e 13 mL de água. A mistura foi homogeneizada em um misturador por 1 min, centrifugada a 2.078 x g por 10 min. Os sobrenadantes das amostras de queijo Minas Frescal foram filtrados através de filtro de papel (Whatman nº 4). Vinte mililitros do extrato anterior foram diluídos com 40 mL de água ultra-pura e passados pela coluna de imunoafinidade. As etapas de extração subsequentes foram idênticas às descritas para as amostras de leite.

As curvas de calibração para detectar AFM₁ nas amostras de leite e queijo foram preparadas usando solução padrão de AFM₁ (Sigma[®]), diluída em acetonitrila nas concentrações de 0,625, 1,25, 5, 10, 20 µg/L. Áreas de pico integradas foram linearmente correlacionadas com as concentrações. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados para cada método de análise com base na relação sinal: ruído de 3: 1 e 10: 1, respectivamente. A linearidade foi avaliada verificando-se o coeficiente de determinação (r^2) e a inspeção visual das parcelas residuais das curvas analíticas.

O desempenho dos métodos para determinação de AFM₁ em amostras de leite e queijo foi apresentado por Jager et al. (2013), descrevendo limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) de 0,0025 e 0,0080 µg/L para AFM₁ em leite fluido, respectivamente. O LOD e LOQ de AFM₁ nas amostras de queijo foram 0,017 e 0,055 µg/Kg, respectivamente.

II.3 Resultado e discussão

Os níveis de ocorrência de AFM₁ em amostras de leite cru, leite pasteurizado e queijo Minas Frescal fabricados com ou sem culturas *starter* de BAL em laticínios do estado de São Paulo estão sintetizados na Tabela 1.

Tabela 1 - Níveis de aflatoxina M₁ (AFM₁) em leite cru, leite pasteurizado e em queijos Minas Frescal produzidos com ou sem cultura *starter* em laticínios do estado de São Paulo.

Nível de AFM ₁ (µg/L or µg/kg)	Processamento do queijo		Total	%
	Com cultura <i>starter</i> ^a (n = 12)	Sem cultura <i>starter</i> ^a (n = 16)		
<i>Leite cru (N=28)</i>				
< LOD ^b	11	6	17	61
LOD – 0,05	1	9	10	35
0,05 – 0,25	0	1	1	4
0,25 – 0,50	0	0	0	0
0,50 – 1,00	0	0	0	0
Média (µg/L)	0,003	0,028 ± 0,009	-	-
<i>Leite pasteurizado (N=28)</i>				
< LOD ^b	11	2	13	46
LOD – 0,05	1	12	13	46
0,05 – 0,25	0	2	2	8
0,25 – 0,50	0	0	0	0
0,50 – 1,00	0	0	0	0
Média (µg/L)	0,005	0,023 ± 0,006	-	-
<i>Queijo Minas Frescal (N=28)</i>				
< LOD ^b	12	8	20	71
LOD – 0,05	0	4	4	14
0,05 – 0,25	0	3	3	11
0,25 – 0,50	0	0	0	0
0,50 – 1,00	0	1	1	4
Média (µg/L)	0	0,113 ± 0,092	-	-
Taxa de concentração ^c				4,9

^aCulturas *starter* de BAL disponíveis comercialmente. ^bLimites de quantificação dos métodos analíticos: 0,0025 µg/L (leite cru e pasteurizado) e 0,017 µg/Kg (queijo). ^cNível médio de AFM₁ no queijo (µg/Kg): nível médio de AFM₁ no leite pasteurizado (µg/L).

A AFM₁ foi quantificada em 11 amostras (39%) de leite cru, 15 amostras (54%) de leite pasteurizado e 8 amostras (29%) de queijo Minas Frescal (N = 28 por tipo de leite), em níveis médios de 0,028 ± 0,009 µg/L, 0,023 ± 0,006 µg/L e 0,113 ± 0,092 µg/L, respectivamente.

Nenhuma das amostras de leite ou queijo analisadas apresentou níveis de AFM₁ acima dos limites máximos permitidos pela legislação Brasileira, que é de 0,50 µg/L e 2,5 µg/Kg, respectivamente (BRASIL, 2011). No entanto, três amostras (uma de leite cru e duas de leite pasteurizado) apresentaram níveis de AFM₁ acima do limite máximo permitido pela União Europeia que é de 0,05 µg/L (EUROPEAN COMMISSION, 2006). Os níveis semelhantes de ocorrência de AFM₁ em leites cru e pasteurizado confirmam que o processo de pasteurização não diminui de maneira significativa as concentrações de toxinas no produto (AWASTHI et al., 2012; CAMPAGNOLLO et al., 2016). De fato, a AFM₁ exibe alta resistência ao processamento térmico convencional de alimentos, uma vez que a temperatura mínima para sua degradação varia de 237 a 306 °C (GALVANO; GALOFARO; GALVANO, 1996). As comparações dos resultados de AFM₁ no leite com os dados de estudos anteriores são difíceis, uma vez que este é o primeiro estudo sobre os níveis de ocorrência de AFM₁ em leites cru e pasteurizado coletados em indústrias produtoras de queijos no Brasil. No entanto, as frequências e concentrações de AFM₁ no leite neste estudo estão de acordo com as relatadas por Shundo et al. (2016), que detectaram AFM₁ em 63% das amostras ($N = 41$) de leite pasteurizado comercialmente disponíveis em diferentes regiões do Brasil, com concentrações variando de 0,003 a 0,05 µg/L. No estado de Minas Gerais, Picinin et al. (2013) detectaram AFM₁ em todas as amostras de leite cru analisadas ($N = 129$) com uma concentração média de $0,019 \pm 0,002$ µg/L, que é semelhante ao valor descrito no presente estudo ($0,028 \pm 0,009$ µg/L). Em contraste, Iha et al. (2013) relataram uma maior frequência de amostras positivas para AFM₁ (87%, $N = 30$) em amostras de leite pasteurizado comercializadas no estado de São Paulo, com níveis variando de 0,009 a 0,437 µg/L. Os resultados do presente estudo e de estudos anteriores indicam altas frequências de ocorrência de AFM₁ no leite cru ou pasteurizado no Brasil, às vezes em concentrações que excederam os limites máximos permitidos pela União Europeia (0,05 µg/L), mas, em geral, cumprindo as normas brasileiras (limite máximo permitido de 0,50 µg/L). Sabe-se que a incidência de AFM₁ em amostras de leite pode variar com (i) o tempo em que as vacas em lactação estão confinadas, uma vez que está associada a quantidade de concentrado oferecido contendo AFB₁; e (ii) o efeito de diluição do leite trazido de diferentes fazendas, incluindo aquelas sem estratégias de prevenção e manejo contra a AFM₁ (ARMORINI et al., 2016). Além disso, as diferenças nos níveis de AFM₁ em várias regiões ou países podem ser devido às diferenças entre condições geográficas, estação e clima, higiene e

precauções para evitar a contaminação por AFB₁ dos alimentos para vacas leiteiras e processamento de leite (HASSAN et al. 2018).

Em relação aos níveis de AFM₁ determinados no queijo Minas Frescal (Tabela 1), apenas uma amostra excedeu o limite máximo permitido (0,25 µg/Kg) adotado na Áustria, Suíça e Turquia (FAO, 2004) e todas as amostras apresentaram níveis abaixo do limite máximo permitido pela legislação brasileira, de 2,5 µg/Kg (BRASIL, 2011). A frequência (29%) e o nível médio de AFM₁ ($0,113 \pm 0,092$ µg/Kg) encontrados no presente estudo foram semelhantes aos relatados por Oliveira et al. (2011), que detectaram AFM₁ em 6 amostras (25%) de queijo Minas Frescal comercializados na região nordeste do estado de São Paulo (nível médio: $0,142 \pm 0,118$ µg/Kg). Nossos resultados também são consistentes com os níveis e ocorrência de AFM₁ em queijo descritos em outros estudos realizados no estado de São Paulo (IHA et al., 2011; JAGER et al., 2013). No entanto, uma frequência mais alta (75%) e níveis de até 6,92 µg/Kg foram relatados em queijos comercialmente disponíveis no estado de Minas Gerais por (PRADO et al., 2000).

No presente trabalho, esperava-se que os níveis de AFM₁ nas amostras de queijo fossem mais altos que no leite, pois estudos anteriores indicaram que as concentrações de AFM₁ no queijo e em outros produtos lácteos podem ser de 3 a 16 vezes maiores que no leite devido à capacidade da AFM₁ de se ligar à caseína (BAHRAMI; SHAHBAZI; NIKOUSEFAT, 2016; CAMPAGNOLLO et al., 2016; YILMAZ; ALTINCI, 2019). Além disso, a ocorrência de AFM₁ pode ser amplamente variável de acordo com o tipo de queijo, sendo aproximadamente três vezes maior em queijo macio e cinco vezes maior em queijo duro em comparação ao leite (ARDIC et al., 2009). Considerando o nível médio de AFM₁ encontrado no queijo (µg/Kg) e o nível médio de AFM₁ no leite pasteurizado (µg/L), foi calculada uma taxa de concentração média de 4,9 (Tabela 1).

Além do tipo de queijo e procedimentos de fabricação desses queijos, evidências experimentais indicam que a ocorrência de AFM₁ no queijo pode ser afetada pelo uso de cultura *starter* de BAL usada para o processamento do queijo (DEVECI, 2007; KAMKAR et al., 2008; ARDIC et al., 2009; CAMPAGNOLLO et al., 2016; KETNEY; SANTINI; OANCEA, 2017; YILMAZ; ALTINCI, 2019). Estudos demonstraram a capacidade das espécies de BAL em se ligar a AFM₁ e reduzir sua concentração em tampão fosfato ou no leite (BOVO; CORASSIN; OLIVEIRA, 2010; CORASSIN et al., 2013). No presente estudo, não foi possível confirmar o

efeito da adição de BAL sobre os níveis de AFM₁ na fabricação de queijos Minas Frescal, uma vez que apenas uma amostra de leite cru e pasteurizado de um dos laticínios que utilizaram cultura *starter* de BAL no processamento do queijo apresentou níveis detectáveis de AFM₁.

II.4 Conclusão

Foi detectado uma menor incidência de AFM₁ em leite cru (39%) e pasteurizado (54%) e em amostras de queijo (29%) em comparação com outros estudos brasileiros. Os níveis de toxina detectados em nossos estudos estavam abaixo do limite máximo permitido pela legislação brasileira. No Brasil, os estudos existentes sobre a incidência de AFM₁ no queijo Minas Frescal são escassos, os poucos estudos existentes não relatam o uso ou não da cultura *starter* e apresentaram resultados divergentes entre si. Portanto, o presente estudo sugere que isso possa ocorrer devido à uma grande variação entre os laticínios locais produtores de queijo e também pelo fato do uso da cultura *starter*, embora, na média, tenha sido detectado uma baixa incidência e um baixo nível de toxinas. É notório que leite e derivados lácteos são consumidos concomitantemente, razão pela qual os níveis de detecção de AFM₁ podem vir a ser um problema de saúde pública, por mais que os níveis detectados sejam baixos. Portanto, mais estudos sobre métodos para prevenir e reduzir a ocorrência de AFM₁ em leite e produtos lácteos, bem como estudos a cerca de ingestão diária, são necessários.

II. Referências

- ARDIC, M. et al. Aflatoxin M₁ levels of Turkish white brined cheese. **Food Control**, Kidlington, v. 20, n. 3, p. 196–199, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.04.003>>.
- ARMORINI, S. et al. Occurrence of aflatoxin M₁ in conventional and organic milk offered for sale in Italy. **Mycotoxin Research**, Heidelberg, v. 32, n. 4, p. 237–246, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12550-016-0256-8>>.
- AWASTHI, V. et al. Contaminants in milk and impact of heating: an assessment study. **Indian journal of public health**, Calcutta, v. 56, n. 1, p. 95–99, 2012.
- BAHRAMI, R.; SHAHBAZI, Y.; NIKOUSEFAT, Z. Aflatoxin M₁ in milk and traditional dairy products from west part of Iran: Occurrence and seasonal variation with an emphasis on risk assessment of human exposure. **Food Control**, Kidlington, v. 62, p. 250–256, 2016.
- BOVO, F.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. Descontaminação de Aflatoxinas em Alimentos por Bactérias Ácido-Láticas. **UNOPAR Científica – Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 12, n. 2, p. 15–21, 2010.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC 07/2011**, de 22 de fevereiro de 2011 da ANVISA. Estabelece limites para micotoxinas em alimentos, principalmente em grãos. Portal da Anvisa de 22 de fevereiro de 2011.
- CAMPAGNOLLO, F. B. et al. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M₁: A review. **Food Control**, Kidlington, v. 68, p. 310–329, 2016.
- CORASSIN, C. H. et al. Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M₁ in UHT skim milk. **Food Control**, Kidlington, v. 31, n. 1, p. 80–83, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.033>>.
- CRUZ, A. G. et al. **Processamento de produtos lácteos: queijos, leites fermentados, bebidas lácteas, sorvete, manteiga, creme de leite, doce de leite, soro em pó e lácteos funcionais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. (Coleção Lácteos, v. 3).
- DEVECI, O. Changes in the concentration of aflatoxin M₁ during manufacture and storage of White Pickled cheese. **Food Control**, Kidlington, v.18, p.1103-1107, 2007.
- EUROPEAN COMMISSION, & REGULATION, L. (EC) .Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of European Communities**, L364, n. 1881, p. 5–24, 2006. Disponível em:<https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Consol_Reg1881_2006.pdf> Acesso em: 20 Maio 2017.
- FALLAH, A. A. et al. Determination of aflatoxin M₁ levels in Iranian white and cream cheese. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 47, p. 1872–1875, 2009.

FAO. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003*. Rome: Food and Agriculture Organization. **Food and Drug Administration**. 2004. Rome: Food and Agriculture Organization (FAO Food and Nutrition Paper, 81).

FERNANDES, A. M. et al. Distribution and stability of aflatoxin M₁ during processing and storage of Minas Frescal cheese. **Food Control**, Kidlington, v. 24, n. 1–2, p. 104–108, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.010>>.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. **Food Additives and Contaminants**, Abingdon, v. 25, n. 2, p. 172–180, 2008.

GALVANO, F.; GALOFARO, V.; GALVANO, G. Occurrence and stability of aflatoxin M₁ in milk and milk products: A worldwide review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 10, p. 1079–1090, 1996.

HASSAN, H. F.; KASSAIFY, Z. The risks associated with aflatoxins M₁ occurrence in Lebanese dairy products. **Food Control**, Kidlington, v. 37, n. 1, p. 68–72, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.022>>.

HASSAN, Z. U. et al. Evidence of low levels of aflatoxin M₁ in milk and dairy products marketed in Qatar. **Food Control**, Kidlington, v. 92, p. 25–29, 2018.

IHA, M. H. et al. Occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products in Brazil. **Food Control**, Kidlington, v. 22, n. 12, p. 1971–1974, 2011.

IHA, M. H. et al. Aflatoxin M₁ in milk and distribution and stability of aflatoxin M₁ during production and storage of yoghurt and cheese. **Food Control**, Kidlington, v. 29, n. 1, p. 1–6, 2013.

JAGER, A. V. et al. Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. **Food Control**, Kidlington, v. 33, n. 1, p. 87–92, 2013.

KAMKAR, A. et al. Fate of aflatoxin M₁ in Iranian white cheese processing. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 2236–2238, 2008.

KETNEY, O.; SANTINI, A.; OANCEA, S. Recent aflatoxin survey data in milk and milk products: A review. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 70, n. 3, p. 320–331, 2017.

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

OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H. Aflatoxins. In: DUARTE, S. C.; PENA, A. L. S.; LINO, C. M. (Org.). **Mycotoxins and their implications in food safety**. London: Future Science, 2014. v. 1, p. 6–19.

- ORUC, H. H. et al. Fate of aflatoxin M₁ in Kashar cheese. **Journal of Food Safety**, v. 27, n. 1, p. 82–90, 2007.
- PICININ, L. C. A. et al. Influence of climate conditions on aflatoxin M₁ contamination in raw milk from Minas Gerais State, Brazil. **Food Control**, Kidlington, v. 31, n. 2, p. 419–424, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.10.024>>.
- PIERIDES, M. et al. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M₁ in a food model. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 5, p. 645–650, 2000.
- PRADO, G. et al. 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. 398400, 2000.
- PRANDINI, A. et al. On the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, p. 984-991, 2009.
- SHUNDO, L. et al. Estimate of aflatoxin M₁ exposure in milk and occurrence in Brazil. **Food Control**, Kidlington, v. 20, n. 7, p. 655–657, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.09.019>>.
- SHUNDO, L. et al. Occurrence of aflatoxin M₁ in bovine milk samples consumed in different regions of Brazil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz/article/view/36748/41336>>.
- SILVA, R.A. et al. Inquérito sobre o consumo de alimentos possíveis de contaminação por micotoxinas na ingesta alimentar de escolares da cidade de Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, p.439–447, 2007. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542007000200026>
- TROMBETE, F. M.; FRAGA, M. E.; SALDANHA, T. Contaminação de queijos por aflatoxina M₁: uma abordagem sobre a ocorrência e prevenção. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 68, n. 392, p. 40-48, 2013.
- WOMACK, E. D.; SPARKS, D. L.; BROWN, A. E. Aflatoxin M₁ in milk and milk products: a short review. **World Mycotoxin Journal**, Wageningen, v. 9, n. 2, p. 305-315, 2016.
- YILMAZ, S. Ö.; ALTINCI, A. Incidence of aflatoxin M₁ contamination in milk, white cheese, kashar and butter from Sakarya, Turkey. **Food Science and Technology**, Kidlington, v. 39, n. suppl 1, p. 190–194, 2019.

CAPÍTULO III: Redução da disponibilidade de aflatoxina M₁ por células não viáveis de bactérias ácido lácticas e *Saccharomyces cerevisiae* em queijo Minas Frescal

III.1 Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de células inativas pelo calor (121 °C, 10 min) de duas cepas de bactérias ácido lácticas (BAL) *Lactobacillus rhamnosus* (LRB, SACCO, Cadorago, Itália) e *Lactococcus lactis* (MWO 040, SACCO, Cadorago, Itália) e uma cepa de levedura, *Saccharomyces cerevisiae* (Fermentis K-97, SafAle, Bélgica), isoladamente ou em combinação, para reduzir os níveis de aflatoxina M₁ no queijo Minas Frescal durante 30 dias de armazenamento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 × 2 × 2, correspondendo a dois níveis de cultura starter de BAL (0 e *L. rhamnosus* 10¹⁰ células/kg + *L. lactis* 10¹⁰ células/kg), dois níveis de *S. cerevisiae* (0 e 10¹⁰ células de levedura/kg) e dois níveis de AFM₁ (0 e 0,5 µg/kg) adicionados à coalhada de queijo, totalizando 8 tratamentos com três repetições por tratamento. Os níveis de AFM₁ no queijo Minas Frescal foram avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu 10 VP, Kioto, Japão) composto por detector de fluorescência (10 RF-AXL). Os parâmetros físico-químicos teor de gordura e proteína não foram afetados ($P > 0,05$) em nenhum dos tratamentos entre os dias 2 e 30 de armazenamento, apenas o pH diminuiu ($P < 0,05$) todos os tratamentos durante o período de armazenamento. Os níveis de AFM₁ em queijos contaminados diminuíram no dia 2 de armazenamento, variando de 0,09 µg/kg (queijo com adição de células bacterianas) a 0,29 µg/kg (sem adição de células de BAL ou leveduras). As concentrações de AFM₁ diminuíram ($P < 0,05$) em todos os tratamentos dos dias 2 a 10 de armazenamento, e a redução percentual máxima (100%) foi alcançada após 10 e 20 dias de armazenamento em queijos contendo células de BAL e leveduras, ou contendo somente levedura. A adição de *S. cerevisiae* ou células de *L. rhamnosus* e *L. lactis* inativadas pelo calor, isoladamente ou em combinação, tem potencial para reduzir os níveis de AFM₁ no queijo Minas Frescal durante os 30 dias de armazenamento.

Palavras-chave: Aflatoxina; Bactérias ácido lácticas; Leveduras; Ligação; Queijo.

III.2 Introdução

As aflatoxinas são as micotoxinas mais conhecidas e amplamente distribuídas em alimentos e rações, sendo sintetizadas naturalmente por espécies de fungos do gênero *Aspergillus*, especialmente *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (WOCHNER et al., 2018). Embora tenham sido identificados mais de 20 tipos de moléculas de aflatoxina, o composto mais frequente e tóxico é a aflatoxina B₁ (AFB₁). A aflatoxina M₁ (AFM₁) é o principal produto da biotransformação da AFB₁ no fígado, e tanto a AFB₁ quanto a AFM₁ são cancerígenos para os seres humanos (WHO, 2002; KUHARIC et al., 2018). É importante ressaltar que a AFM₁ é excretada no leite de animais e humanos em lactação expostos à AFB₁ na dieta (CAVALIERE et al., 2006; MASOERO et al., 2007; KUHARIC et al., 2018). A taxa de excreção de AFM₁ no leite de vacas leiteiras varia de 0,3 a 6,2% do AFM₁ ingerido, dependendo do estágio de lactação e do volume de leite produzido (CREPPY, 2002). No leite, a AFM₁ se liga à caseína e permanece ligada a ela durante a fabricação de produtos lácteos, incluindo leite em pó, queijo e iogurte, entre outros (VAR; KABAK, 2008; CAMPAGNOLLO et al., 2016; KUHARIC et al., 2018). Além disso, uma vez que a AFM₁ está presente no leite ou em produtos lácteos, ela não pode ser removida por tratamentos térmicos convencionais, como pasteurização ou esterilização (CAMPAGNOLLO et al., 2016; ASSAF et al., 2019).

Vários estudos demonstraram evidências de exposição humana à AFM₁ devido ao consumo de leite e derivados lácteos contaminados. Além disso, a contaminação com AFM₁ tornou-se um sério problema de saúde, porque o leite e os derivados lácteos são frequentemente consumidos por uma parcela da população considerada vulnerável, como crianças e idosos (FALLAH et al., 2009; PRANDINI et al., 2009). Nesse contexto, várias estratégias foram desenvolvidas para prevenir a formação em alimentos, além de eliminar, inativar ou reduzir a biodisponibilidade dessas toxinas em produtos contaminados (CORASSIN et al., 2013; GONÇALVES; CORASSIN; OLIVEIRA, 2015; ISMAIL et al., 2018). Métodos físicos, químicos e biológicos têm sido propostos para a descontaminação de aflatoxinas em produtos alimentícios (CORASSIN et al., 2013). No entanto, os métodos físicos e químicos não são os mais adequados em termos de segurança, economia e qualidade do produto, porque não são eficazes na remoção ou degradação das aflatoxinas, ou porque têm alto custo ou causam efeitos negativos nas características nutricionais e sensoriais do produto alimentar (STOEV, 2013; WOCHNER et al., 2018). Os métodos biológicos para descontaminação de aflatoxinas

envolvendo microrganismos oferecem uma alternativa atraente para a indústria de alimentos (PENG et al., 2018).

As bactérias ácido lácticas (BAL) e as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* são os principais tipos de microrganismos testados para remover ou degradar aflatoxinas dos produtos alimentares (ISMAIL et al., 2018). A remoção da aflatoxina dos alimentos por microrganismos baseia-se na adsorção da toxina por células viáveis ou não viáveis, o que indica que a toxina está fisicamente ligada a componentes da parede celular bacteriana, principalmente peptidoglicanos e polissacarídeos (SHETTY; HALD; JESPERSEN, 2007). Corassin et al. (2013) observaram que um *pool* de células de BAL (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *Bulgaricus* e *Bifidobacterium lactis*) e cepas *S. cerevisiae* inativadas pelo calor removeu 100% da AFM₁ em leite UHT desnatado. No entanto, a remoção de aflatoxinas por BAL e cepas de leveduras em queijo ainda não foi investigada. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade das células inativadas pelo calor de duas linhagens BAL (*Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis*) e uma linhagem de levedura (*S. cerevisiae*), isoladamente ou em combinação, para reduzir os níveis de AFM₁ em o queijo Minas Frescal durante 30 dias de armazenamento.

III.3 Material e métodos

III.3.1 Cepas de bactérias ácido lácticas e *Saccharomyces cerevisiae*

Cultura *starter* liofilizada comercialmente disponível, doada pela SACCO Brasil, foi utilizada no experimento. A cultura *starter* continha duas cepas de BAL, *L. rhamnosus* (LRB, SACCO, Cadorago, Itália) e *L. lactis* (MWO 040, SACCO, Cadorago, Itália) e, de acordo com o fabricante, a concentração de cada espécie de BAL na cultura *starter* era de $1,0 \times 10^{10}$ células/g. A cepa de *S. cerevisiae* utilizada foi a levedura biológica seca de cervejaria, comercialmente disponível (Fermentis K-97, SafAle, Bruggeman, Bélgica) contendo $1,0 \times 10^{10}$ células de levedura/g. Ambas as cepas de BAL na cultura *starter* e as células de *S. cerevisiae* foram inativadas em autoclave à 121 ° C por 10 minutos para segundo Corassin et al. (2013).

III.3.2 Preparo do leite e design experimental

O leite utilizado, no presente estudo, para fabricação dos queijos foi produzido pelo rebanho leiteiro disponível na Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga, Brasil. Amostras, em duplicata, do leite cru foram previamente avaliadas em relação à AFM₁ através

de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito por Jager et al. (2013), para confirmar níveis abaixo do limite de detecção do método (0,0025 µg/L). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 x 2, correspondendo a dois níveis de cultura starter de BAL no leite (0 e *L. rhamnosus* 10¹⁰ células/kg + *L. lactis* 10¹⁰ células/kg), dois níveis de *S. cerevisiae* no leite (0 e 10¹⁰ células de levedura/kg) e dois níveis de AFM₁ (0 e 0,5 µg/kg) na coalhada de queijo, totalizando 8 tratamentos com três repetições por tratamento.

III.3.3 Preparo do queijo Minas Frescal

O queijo Minas Frescal foi produzido segundo Fernandes et al. (2012), conforme descrito a seguir: O leite cru foi submetido à pasteurização a 65°C por 30 minutos e resfriado a 34 °C. Ao leite pasteurizado (com contagem total de bactérias mesófilas de 3,5 x 10³ UFC/mL) foi adicionado à solução de cloreto de cálcio a 12,5%, 12 mL de coalho líquido (quimosina e pepsina bovina, Ha-La, Christian-Hansen®, Brasil) e sal (2%). Depois, o leite foi incubado a 34 °C por 35 min. Então, o coágulo foi cortado em cubos pequenos (aproximadamente 1,0 cm²) e agitado suavemente por aproximadamente 20 minutos. Após o período de agitação e a completa separação do soro, a coalhada foi coletada em um recipiente de polipropileno e transferida para o laboratório de microbiologia e micotoxicologia de alimentos para que à adição de AFM₁ e/ou da cultura *starter* e levedura fosse realizada sem causar risco de contaminação para o laticínio. A adição foi realizada de acordo com os tratamentos acima mencionados, antes de transferir a coalhada para as formas de queijo (250 g). A AFM₁ usada no experimento foi preparada dissolvendo o padrão (Sigma-Aldrich®, EUA) em acetonitrila a 0,5 µg de AFM₁/mL. Em seguida, 1,0 mL desta solução foi transferido para um becker e o solvente foi evaporado à temperatura ambiente sob fluxo de nitrogênio. Logo, 1,0 kg de coalhada de queijo foi adicionada e bem misturada por 15 min, para obter o nível necessário de AFM₁. A cultura *starter* e a levedura seca foram adicionadas à coalhada enriquecida misturando 1,0 g de cada produto comercial previamente inativado como descrito na seção *III.3.1* por kg de coalhada, a fim de obter os níveis necessários de BAL e levedura. Os queijos experimentais foram virados três vezes em intervalos de 15 minutos e armazenados a 4 °C por 24 horas. Então, eles foram removidos das formas, acondicionados em sacos de polietileno e armazenados a 4 °C por 30 dias.

III.3.4 Determinação de aflatoxina M₁ no queijo Minas Frescal

A determinação da Aflatoxina M₁ nas amostras de queijo Minas Frescal foi realizada conforme descrito por Jager et al. (2013), nos dias 2, 10, 20 e 30 após a produção. Oito gramas de queijo previamente maceradas foram pesadas em um tubo falcon e, em seguida, 2 g de NaCl, 22 mL de metanol e 13 mL de água ultrapura foram adicionados ao tubo. A mistura foi centrifugada a 2.078 x g durante 15 min. E o sobrenadante obtido foi filtrado. Vinte mililitros do filtrado foram coletados em becker e 40 mL de água ultrapura foram adicionados. A purificação foi realizada passando o volume total (60 mL) através de coluna de imunoafinidade (Aflatest WB, Vicam[®]) acoplada a manifold com fluxo de 2-3 gotas por segundo. Após este procedimento, a coluna foi lavada passando 20 mL de água ultrapura. Subsequentemente, a toxina foi eluída passando 1 mL de metanol grau HPLC. Em seguida, o eluente foi evaporado até a secura sob uma corrente de nitrogênio a 40 °C e ressuspendido com 1 mL de solução metanol grau HPLC e água ultrapura (50:50 v/v).

A separação e quantificação foram realizadas através de um sistema de HPLC Shimadzu[®] 10VP (Kyoto, Japão) equipado com detector de fluorescência (RF-10AXL). Utilizou-se uma coluna Kinetex C₁₈ de 4,6 x 150 mm (Phenomenex Torrance, CA, EUA) com tamanho de partícula de 2,6 µm e filtro em linha de 0,5 µm e amostrador automático (SIL-10AF). O sistema foi estabilizado por uma hora a uma taxa de fluxo de 1 mL min à temperatura ambiente. A fase móvel isocrática foi utilizada consistindo em metanol, água e acetonitrila (61,4: 28,1: 10,5 v / v / v). A detecção foi realizada no comprimento de onda de 360 nm e emissão de 440 nm. A curva de calibração para a detecção de AFM₁ em amostras de queijo foi preparada usando o padrão AFM₁ diluído em acetonitrila nas concentrações de 0,625, 1,25, 2,5, 5,0 e 10,0 ng/mL. As áreas de pico foram linearmente correlacionadas com as concentrações. A identificação foi realizada comparando o tempo de retenção dos picos de AFM₁ presentes nas amostras com esses padrões puros. Os limites de detecção e quantificação foram calculados na razão sinal-ruído de 3 por análise pico a pico da curva de calibração, sendo 0,017 e 0,055 (µg/kg), respectivamente. O método analítico foi validado previamente usando amostras de queijo Minas Frescal contaminadas com níveis de 0,25 e 2,5 µg/kg (*n* = 3 para cada concentração), e a recuperação de AFM₁ em amostras de queijo variou de 73 a 77% (JAGER et al., 2013).

III.3.5 Análises físico-químicas e microbiológicas do queijo Minas Frescal

As análises físico-químicas do queijo Minas Frescal foram realizadas nos dias 2 e 30 após a produção. Foi realizada a determinação do pH, gordura e porcentagem de proteína segundo descrito pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2000).

As análises microbiológicas dos queijos Minas Frescal foram realizadas nos dias 2 e 30 após a fabricação seguindo os procedimentos descritos no *American Public Health Association* (APHA, 1992). Foi feita a determinação de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Coliformes* a 45°C, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*.

III.3.6 Análise estatística

A equação abaixo foi utilizada para determinar a porcentagem de AFM₁ ligada pala BAL e *S. cerevisiae* testados em cada ensaio. As letras B, C e D são as áreas médias dos picos cromatográficos dos controles positivos, amostra analisada e controles negativos, respectivamente.

$$A = \{[B-C-D] / B\} * 100$$

A análise estatística dos ensaios de ligação à AFM₁ foi realizada no Modelo Linear Geral do SAS (SAS/STAT®, 2004), usando o Teste de Tukey para diferenças significativas entre os microrganismos testados (BAL, *S. cerevisiae* e BAL + *S. cerevisiae*) em $P < 0.05$.

III.4 Resultado e discussão

A Tabela 1 apresenta os parâmetros físico-químicos do queijo Minas Frescal nos dias 2 e 30 de armazenamento a 4 °C. O teor de gordura e proteína não foram afetados ($P > 0,05$) em nenhum dos tratamentos. Apenas o pH diminuiu ($P < 0,05$) em todos os tratamentos dos dias 2 a 30 de armazenamento. Corroborando com nosso estudo, Prezzi (2014) relatou diminuição gradativa das médias de pH do primeiro para o vigésimo primeiro dia de armazenamento, o grupo controle apresentou redução de 0,75 (6,83 para 6,08) e grupo com *L. rhamnosus* apresentou redução de 0,63 (6,41 para 5,78). Silva et al. (2003) também reportaram valores de pH entre 6,2 e 5,0 em queijo Minas Frescal. Em relação às análises microbiológicas, a contagem de *Coliformes* a 45°C nas amostras (Tabela 2) está em conformidade com a Portaria do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996) para *Coliformes* a 45°C que permite $n=5$, $c=2$, $2m$, $M= 1000$. Para as demais bactérias foram realizados testes

confirmatórios: a) a confirmação da *Salmonella sp.* foi realizada com kit pronto (Laborelin para Enterobacterias) que consiste em cinco tubos, cada um com sua especificidade. Para o resultado ser positivo para *Salmonella sp.* era necessário que no tubo 1 houvesse produção de gás sulfídrico (H₂S) e cor negra no fundo do tubo; no tubo 2 deveria ocorrer descarboxilação da lisina – cor deveria variar do amarelo ao purpura; no tubo 3 deveria ocorrer crescimento difuso com turvação total ou parcial, indicativo de motilidade positiva; no tubo 4 era necessário o aparecimento de coloração amarela com turvação do meio, resultado da reação da bactéria com a rhamnose; e no tubo 5 deveria aparecer coloração azul. Nenhuma das amostras apresentou todas estas condições conjuntamente logo, o resultado foi negativo para *Salmonella sp.*; b) para confirmação da *Listeria monocytogenes* foram realizados os testes de motilidade e de catalase e todas as amostras apresentaram motilidade negativa e catalase positiva, indicando que não era *L. monocytogenes* já que esta bactéria tem motilidade positiva e catalase negativa; c) para *Staphylococcus* foi realizado o teste da coagulase, todas as amostras apresentaram coagulase negativa.

O uso de BAL e *S. cerevisiae* como aditivos para reduzir o AFM₁ no queijo Minas Frescal não teve efeito negativo no prazo de validade do queijo, que geralmente é de 28 dias. A vida de prateleira do queijo Minas Frescal também está relacionada com a matéria prima utilizada, o processo de produção e a quantidade inicial de microrganismos presentes (PREZI, 2014).

A concentração de AFM₁ nos queijos dos tratamentos que não receberam AFM₁ estava abaixo do limite de detecção do método analítico, enquanto a concentração de AFM₁ nos tratamentos que receberam AFM₁ variou de 0,29 µg de AFM₁/kg até não detectado, conforme apresentado na Tabela 3.

No presente estudo, o tratamento, que não recebeu nenhum aditivo para reduzir AFM₁, apresentou um percentual de redução nos 30 dias de 54%. Segundo alguns autores, isso pode ocorrer devido à perda de AFM₁ no soro de leite (LÓPEZ et al., 2001; FERNANDES et al., 2012). Corroborando com nosso estudo López et al. (2001) reportaram em seu estudo com queijo fresco, produzido com leite contaminado artificialmente com AFM₁, que 40% da AFM₁ permaneceu no queijo e o restante (60%) foi transferido para o soro do leite. Resultado similar foi apresentado por Mendonça e Venâncio (2005) e Pietri et al. (2016). Eles reportaram que a AFM₁ ocorre no queijo quando o leite contaminado com AFM₁ é usado na fabricação de queijos

e a partição entre a coalhada e o soro de leite está geralmente na faixa de 40 a 60%. Além disso, em um estudo mais recente, Pietri et al. (2016) relataram que a relação entre a concentração de AFM₁ no queijo e a concentração no leite, chamada fator de enriquecimento (FE), é geralmente mais alta para queijos duros do que queijos moles. Eles explicaram que essa diferença é causada pelo processo de secagem do queijo e pela estabilidade da AFM₁ durante o processo de maturação.

Outra explicação para essa redução pode ser devido à presença natural de bactérias ácido lácticas do leite cru e pasteurizado usado no processamento de queijo (ANDRIGHETTO et al., 2002; RANDAZZO et al., 2002; DELBÈS; ALI-MANDJEE; MONTEL, 2007; FRANCIOSI et al., 2009).

Os efeitos dos microrganismos utilizados para redução de AFM₁ podem ser observados no tratamento que receberam BAL, o qual apresentou uma alta porcentagem de redução de AFM₁ na coalhada no dia 2 (82%), seguida de aumento na porcentagem de redução no dia 10 (94%) e então a concentração de AFM₁ permaneceu estável até o último dia de armazenamento (dia 30). Os altos percentuais de redução obtidos neste tratamento pode ter ocorrido devido a capacidade das bactérias ácido lácticas em ligar AFM₁, acrescido do efeito partição coalhada-soro, reportado por Pietri et al. (2016). Diferente do reportado no presente estudo, Oruc et al. (2007) e Fernandes et al. (2012) relataram que o uso de bactérias ácido lácticas não influenciou a concentração de AFM₁ em queijo Kashar e queijo Minas Frescal respectivamente, após 30 dias de armazenamento.

O tratamento que recebeu *Saccharomyces cerevisiae*, como microrganismo para reduzir AFM₁, apresentou um menor percentual de redução na coalhada no dia 2 (74%) e no dia 10 (86%) em comparação ao tratamento que recebeu bactérias ácido lácticas, mas do dia 10 para dia 20 alcançou 100% de redução de AFM₁, permanecendo este percentual de redução até o fim do período experimental (dia 30). Logo, pode-se dizer que por mais que nos dias iniciais as bactérias ácido lácticas tenham apresentado maior capacidade de reduzir AFM₁, a *Saccharomyces cerevisiae*, em um período de tempo não muito maior, apresentou maior capacidade em reduzir AFM₁.

O tratamento que recebeu bactérias ácido lácticas e *S. cerevisiae* combinados apresentou a mesma porcentagem de redução (74%) na coalhada (dia 2) que o tratamento que recebeu apenas *S. cerevisiae*. No entanto, no dia 10 foi observada uma redução de AFM₁ de 100%, que se

manteve até o último dia do experimento (dia 30). Com isto, pode-se dizer que o uso de bactérias ácidos lácticas e *S.cereviasie* combinado é benéfico, aumenta a capacidade de redução de disponibilidade de aflatoxina M₁.

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos do queijo Minas Frescal produzido com ou sem adição de células inativadas de bactérias ácido lácticas e levedura e aflatoxina M₁ após 2 e 30 dias de armazenamento.

Cultura <i>starter</i> ^a (células/kg)	Levedura ^b (células/kg)	AFM ₁ na coalhada (µg/kg)	Parâmetros físico-químicos do queijo durante o armazenamento ^c					
			pH		Gordura %		Proteína %	
			Dia 2	Dia 30	Dia 2	Dia 30	Dia 2	Dia 30
0	0	0	6,25±0,2 ^{aA}	5,42±0,1 ^{aB}	19,9±0,2 ^{aA}	20,1±0,1 ^{aA}	21,7±0,3 ^{aA}	21,9±0,1 ^{aA}
2x10 ¹⁰	0	0	6,22±0,3 ^{aA}	5,18±0,2 ^{aB}	20,4±0,1 ^{aA}	20,3±0,2 ^{aA}	20,2±0,2 ^{aA}	19,9±0,3 ^{aA}
0	10 ¹⁰	0	6,66±0,1 ^{aA}	5,44±0,2 ^{aB}	20,9±0,2 ^{aA}	21,2±0,4 ^{aA}	20,4±0,3 ^{aA}	20,3±0,2 ^{aA}
2x10 ¹⁰	10 ¹⁰	0	6,64±0,2 ^{aA}	5,60±0,1 ^{aB}	20,8±0,2 ^{aA}	20,6±0,2 ^{aA}	21,8±0,1 ^{aA}	22,1±0,2 ^{aA}
0	0	0.5	6,40±0,3 ^{aA}	5,30±0,5 ^{aB}	21,2±0,4 ^{aA}	20,9±0,1 ^{aA}	21,2±0,3 ^{aA}	21,1±0,4 ^{aA}
2x10 ¹⁰	0	0.5	6,25±0,2 ^{aA}	5,38±0,3 ^{aB}	21,1±0,3 ^{aA}	20,3±0,4 ^{aA}	21,3±0,1 ^{aA}	20,7±0,2 ^{aA}
0	10 ¹⁰	0.5	6,58±0,1 ^{aA}	5,60±0,4 ^{aB}	20,1±0,2 ^{aA}	19,9±0,3 ^{aA}	20,8±0,5 ^{aA}	20,9±0,4 ^{aA}
2x10 ¹⁰	10 ¹⁰	0.5	6,71±0,2 ^{aA}	5,58±0,2 ^{aB}	20,5±0,3 ^{aA}	20,6±0,1 ^{aA}	21,2±0,2 ^{aA}	21,4±0,3 ^{aA}

^{a-c} Na mesma coluna, as médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente ($P < 0.05$).

^{A-B} Na mesma linha, as médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente ($P < 0.05$).

^a Produto liofilizado disponível comercialmente (SACCO Brasil) contendo *L. rhamnosus* 1.0 x 10¹⁰ células/g + *L. lactis* 1.0 x 10¹⁰ células/g.

^b Levedura biológica seca de cerveja disponível comercialmente (Fermentis K-97, SafAle, Bruggeman, Belgium) contendo 1.0 x 10¹⁰ células de levedura/g.

^c Valores expressos em média ± desvio padrão das amostras analisadas em triplicata.

Tabela 2. Resultado das análises microbiológicas do queijo Minas Frescal produzido com ou sem adição de células inativadas de bactérias ácido lácticas e levedura e aflatoxina M₁ após 2 e 30 dias de armazenamento.

Cultura <i>starter</i> ^a (células/L)	Levedura ^b (células/L)	AFM ₁ na coalhada (µg/L)	Parâmetros microbiológicos durante o armazenamento ^c							
			<i>Coliformes</i> a 45 °C		<i>Salmonella</i> sp.		<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>		<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	
			Dia 2	Dia 30	Dia 2	Dia 30	Dia 2	Dia 30	Dia 2	Dia 30
0	0	0	26	273	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	<10 ^{2*}	<10 ^{2*}
2x10 ¹⁰	0	0	28	250	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	<10 ^{2*}	<10 ^{2*}
0	10 ¹⁰	0	26	99	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	<10 ^{2*}	<10 ^{2*}
2x10 ¹⁰	10 ¹⁰	0	33	270	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	<10 ^{2*}	<10 ^{2*}
0	0	0,5	1	270	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	<10 ^{2*}	<10 ^{2*}
2x10 ¹⁰	0	0,5	16	19	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	<10 ^{2*}	<10 ^{2*}
0	10 ¹⁰	0,5	42	89	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	<10 ^{2*}	<10 ^{2*}
2x10 ¹⁰	10 ¹⁰	0,5	0	160	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	<10 ^{2*}	<10 ^{2*}

^a Produto liofilizado disponível comercialmente (SACCO Brasil) contendo *L. rhamnosus* 1.0 x 10¹⁰ células/g + *L. lactis* 1.0 x 10¹⁰ células/g.

^b Levedura biológica seca de cerveja disponível comercialmente (Fermentis K-97, SafAle, Bruggeman, Belgium) contendo 1.0 x 10¹⁰ células de levedura/g.

^c Valores expressos em média das amostras analisadas em triplicata.

¹ND – Não detectado

*Unidade formadoras de colônia por grama

Tabela 3 - Concentrações e percentuais de redução de aflatoxina M₁ no queijo Minas Frescal produzido com ou sem adição de aflatoxina M₁ e células inativadas de bactérias ácido lácticas e levedura durante o período de armazenamento (30 dias).

Cultura <i>starter</i> ^a (celulas/kg)	Levedura ^b (celulas/kg)	AFM ₁ na coalhada (µg/kg)	Aflatoxin M ₁ no queijo durante armazenamento							
			Dia 2		Dia 10		Dia 20		Dia 30	
			Concentração (µg/kg) ^c	% Redução ^d	Concentração (µg/kg) ^c	% Redução ^d	Concentração (µg/kg) ^c	% Redução ^d	Concentração (µg/kg) ^c	% Redução ^d
0	0	0	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
2x10 ¹⁰	0	0	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
0	10 ¹⁰	0	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
2x10 ¹⁰	10 ¹⁰	0	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
0	0	0,5	0,29±0,01	42 ^{aA}	0,25±0,02	50 ^{aB}	0,24±0,02	52 ^{aB}	0,23±0,03	54 ^{aB}
2x10 ¹⁰	0	0,5	0,09±0,02	82 ^{bA}	0,03±0,01	94 ^{bB}	0,03±0,02	94 ^{bB}	0,03±0,01	94 ^{bB}
0	10 ¹⁰	0,5	0,13±0,02	74 ^{cA}	0,07±0,02	86 ^{cB}	<LOD	100 ^{cC}	<LOD	100 ^{cC}
2x10 ¹⁰	10 ¹⁰	0,5	0,13±0,01	74 ^{cA}	<LOD	100 ^{dB}	<LOD	100 ^{cB}	<LOD	100 ^{cB}

^{a-d} Na mesma coluna, as médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente ($P < 0.05$).

^{A-C} Na mesma linha, as médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente ($P < 0.05$).

^a Produto liofilizado disponível comercialmente (SACCO Brasil) contendo *L. rhamnosus* 1.0 x 10¹⁰ células/g + *L. lactis* 1.0 x 10¹⁰ células/g.

^b Levedura biológica seca de cerveja disponível comercialmente (Fermentis K-97, SafAle, Bruggeman, Belgium) contendo 1.0 x 10¹⁰ células de levedura/g.

^c Valores expressos em média ± desvio padrão das amostras analisadas em triplicata.

^d Porcentagens acumuladas de reduções relacionadas à concentração de aflatoxina M₁ adicionada na coalhada de queijo durante o processamento. LOD: Limite de detecção (0,017 µg/kg).

III.5 Conclusão

A redução da aflatoxina M₁ variou de acordo com o microrganismo utilizado nos tratamentos para reduzir essa micotoxina no queijo. A utilização de bactérias ácido lácticas e *Saccharomyces cerevisiae* para reduzir a AFM₁ no queijo Minas Frescal não teve efeito negativo sobre os parâmetros físico-químicos e microbiológicos, não causando efeito negativo sobre o prazo de validade do queijo. A *Saccharomyces cerevisiae*, quando utilizada isolada, apresentou maior capacidade de ligar AFM₁, e o uso combinado de bactérias ácido lácticas e *S. cerevisiae* foi benéfico, aumentou a capacidade de ligação da AFM₁. Como sugestão, estudos adicionais sobre o uso da *S. cerevisiae*, bem como, suas condições ótimas para sua aplicação em queijo devem ser avaliadas, para que sua aplicabilidade em laticínios possa ser realizada futuramente.

III.Referências

ANDRIGHETTO, C. et al. Genetic diversity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Italian traditional cheeses. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, p. 141–144, 2002.

AOAC. **Official methods of analysis**. 17. ed. Arlington: AOAC, 2000.

APHA. American Public Health Association. **Standard methods for the examination of dairy products**. (APHA, Ed.) (18th ed.). Washington, DC. (1992).

ASSAF, J. C. et al. Assorted Methods for Decontamination of Aflatoxin M₁ in Milk Using Microbial Adsorbents. **Toxins**, v.11, p. 1–23, 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 146 de 07 de março de 1996, Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, alterado pelo Decreto Nº1.255, de 25 de junho de 1962, alterado pelo Decreto Nº 1812 de 08 de fevereiro de 1996**. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-mapa-146-de-07-03-1996,669.html>

CAMPAGNOLLO, F. B. et al. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M₁: a review. **Food Control**, Kidlington, v. 68, p. 310-329, 2016.

CAVALIERE, C. et al. Aflatoxin M₁ determination in cheese by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 1135, n. 2, p. 135–141, 2006.

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

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

DELBÈS, C.; ALI-MANDJEE, L.; MONTEL, M.C. Monitoring Bacterial Communities in Raw Milk and Cheese by Culture-Dependent and -Independent 16S rRNA Gene-Based Analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1882–1891, 2007.

FALLAH, A. A. et al. Determination of aflatoxin M₁ levels in Iranian white and cream cheese. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 8, p. 1872–1875, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.04.042>>.

FERNANDES, A. M. et al. Distribution and stability of aflatoxin M₁ during processing and storage of Minas Frescal cheese. **Food Control**, Kidlington, v. 24, n. 1–2, p. 104–108, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.010>>.

FRANCIOSI, E. et al. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. **International Dairy Journal**, Barking, v. 19, n. 1, p. 3–11, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.07.008>>.

GONÇALVES, B. L.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. Mycotoxicoses in dairy cattle: A review. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 10, n. 11, 2015.

ISMAIL, A. et al. Aflatoxin in foodstuffs: Occurrence and recent advances in decontamination. **Food Research International**, Essex, v. 113, 2018.

JAGER, A. V. et al. Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. **Food Control**, Kidlington, v. 33, n. 1, p. 87–92, 2013.

KUHARIC, Z. et al. Removing aflatoxin M₁ from milk with native lactic acid bacteria, centrifugation and filtration. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 69, p. 334–339, 2018.

LÓPEZ, C. et al. Distribution of aflatoxin M₁ in cheese obtained from milk artificially contaminated. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 64, p. 211–215, 2001.

MASOERO, F. et al. Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. **Animal**, Columbia, v. 1, n. 9, p. 1344–1350, 2007.

MENDONÇA, C.; VENÂNCIO, A. Fate of aflatoxin M₁ in cheese whey processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 85, p. 2067–2070, 2005.

OLIVEIRA, C. A. F. et al. Aflatoxins and cyclopiazonic acid in feed and milk from dairy farms in São Paulo, Brazil. **Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance**, London, v. 1, n. 2, p. 147–152, 2008.

ORUC, H. H. et al. Fate of aflatoxin M₁ in kashar cheese. **Journal of Food Safety**, v. 27, p. 82–90, 2007.

PENG, Z. et al. Trends in Food Science & Technology Current major degradation methods for aflatoxins: A review. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 80, n. August, p. 155–166, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.009>>.

PIETRI, A. et al. Fate of aflatoxin M₁ during production and storage of parmesan cheese. **Food Control**, Kidlington, v. 60, p. 478–483, 2016.

PRANDINI, A. et al. On the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 984–991, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2007.10.005>>.

PREZZI, L. E. Efeito da adição de *Lactobacillus rhamnosus* em queijo Minas frescal sobre as contagens de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, 2014, 73f.

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP.

RANDAZZO, C. L. et al. Diversity, Dynamics, and Activity of Bacterial Communities during Production of an Artisanal Sicilian Cheese as Evaluated by 16S rRNA Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1882–1892, 2002.

SAS Institute. **SAS/STAT® 9.1 User's Guide**. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2004.

SHETTY, H. P.; HALD, B.; JESPERSEN, L. Surface binding of aflatoxin B₁ by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, p. 41–46, 2007.

STOEV, S. D. Food Safety and Increasing Hazard of Mycotoxin Occurrence in Foods and Feeds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition Food**, v.53, p. 887-901, 2013. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.571800>

VAR, I.; KABAK, B. Detection of aflatoxin M₁ in milk and dairy products consumed in Adana, Turkey. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v.62, p. 15–18, 2008.

WOCHNER, K. F. et al. The action of probiotic microorganisms on chemical contaminants in milk. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 44, n. 1, p. 112–123, 2018.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. **IARC Press**, v. 82, p. 1–556, 2002.

CAPÍTULO IV: Uso de microscopia eletrônica de varredura para avaliar a interação entre bactérias ácido lácticas, *Saccharomyces cerevisiae* e aflatoxina M₁ adicionados ao queijo Minas Frescal

IV.1. Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a interação entre células inativas pelo calor (121 °C, 10 min) de duas cepas de bactérias ácido lácticas (BAL) *Lactobacillus rhamnosus* (LRB, SACCO, Cadorago, Itália) e *Lactococcus lactis* (MWO 040, SACCO, Cadorago, Itália) e uma cepa de levedura, *Saccharomyces cerevisiae* (Fermentis K-97, SafAle, Bélgica), isoladamente ou em combinação, com a aflatoxina M₁ adicionadas ao queijo Minas Frescal durante 30 dias de armazenamento. A interação foi avaliada através de microscópio eletrônico de varredura (HITACHI, TM 3000, Japão) composto por detector de elétrons retroespalhados com voltagem de 15 kV e ampliações de 1000, 5000 e 8000 vezes. As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram capturadas nos dias 2 e 30 após a produção do queijo Minas Frescal. Essa técnica permitiu observar as alterações ocorridas na matriz proteica do queijo ao longo do tempo e de acordo com os diferentes tratamentos. Os oito tratamentos foram: queijo (T1), queijo com AFM₁ (T2), queijo com bactérias ácido lácticas (BAL) (T3), queijo com BAL e AFM₁ (T4), queijo com *S. cerevisiae* (T5), queijo *S. cerevisiae* e AFM₁ (T6), queijo com BAL e *S. cerevisiae* (T7) e queijo com BAL, *S. cerevisiae* e AFM₁ (T8). Alterações na matriz proteica do queijo foram observadas do segundo para o trigésimo dia após a produção. Em relação à capacidade dos microrganismos em ligar AFM₁, tanto as bactérias ácido lácticas quanto a *S. cerevisiae* apresentaram capacidade de ligar partículas de toxinas na matriz alimentar, que pode ser observado nas micrografias através de pontos e/ou manchas na parede celular dos microrganismos.

Palavras-chave: Bactérias ácido lácticas; Queijo; Microscopia; *Saccharomyces cerevisiae*.

IV.2. Introdução

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por uma espécie fúngica toxigênica pertencente ao gênero *Aspergillus*, principalmente *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (OLIVEIRA; CORASSIN, 2014). A aflatoxina B₁ (AFB₁) é tóxica, carcinogênica, teratogênica e /ou mutagênica, facilmente encontrada como contaminante na dieta animal. A alimentação de vacas leiteiras com forragem ou qualquer outro ingrediente da dieta animal contaminado com AFB₁ resulta na conversão metabólica de AFB₁ em aflatoxina M₁ (AFM₁), que é excretada no leite, além de ser apresentada no produto final devido à resistência ao tratamento térmico (FINK-GREMMELS, 2008; CAMPAGNOLLO et al., 2016).

Leite e produtos lácteos são frequentemente consumidos por uma parcela da população considerada vulnerável, crianças e idosos (FALLAH et al., 2009; PRANDINI et al., 2009). O queijo Minas Frescal é um produto típico brasileiro, é um dos produtos lácteos mais consumidos, apresentando ampla aceitação no mercado nacional (CUNHA; VIOTTO; VIOTTO, 2006). É um queijo branco fresco, macio, ligeiramente salgado, com um leve sabor de ácido láctico. É produzido pela coagulação enzimática do leite pasteurizado com coalho e/ou outras enzimas de coagulação apropriadas (CUNHA; VIOTTO; VIOTTO, 2006; FRITZEN-FREIRE et al., 2010).

O impacto negativo das aflatoxinas na saúde e na economia levou a investigações de estratégias para prevenir sua formação em alimentos, bem como eliminar, inativar ou reduzir a disponibilidade dessas toxinas em produtos contaminados (HERNANDEZ-MENDOZA; GARCIA; STEELE, 2009; CORASSIN et al., 2013; GONÇALVES; CORASSIN; OLIVEIRA, 2015).

Nesse contexto, surgiram métodos biológicos de redução de micotoxinas, provenientes da ação de microrganismos, como bactérias, leveduras e outros (FAZELI et al., 2009). Os métodos de redução de disponibilidade biológica têm sido extensivamente estudados por serem eficientes, econômicos e, em muitos casos, já utilizados na produção de alimentos, como as bactérias ácido lácticas e a levedura *S. cerevisiae* (BOVO et al., 2013; GONÇALVES et al., 2015).

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica versátil e útil, com uma grande variedade de aplicações comerciais, industriais e de pesquisa. Envolve um feixe de elétrons finamente colimado que varre a superfície da amostra que está sendo analisada. O feixe é focado

em uma pequena sonda que varre a superfície da amostra. As interações do feixe com o material resultam na emissão de elétrons e fótons, quando os elétrons penetram na superfície, as partículas emitidas são coletadas com o detector apropriado para fornecer informações da superfície. O produto final da colisão do feixe de elétrons com a superfície da amostra é uma imagem (LEE; HYUN; CHOI, 2019). No presente estudo, a microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para caracterizar a superfície dos aditivos biológicos e da aflatoxina M₁ separadamente e em conjunto, dependendo do tratamento, a fim de observar alterações na superfície quando a aflatoxina é adsorvida. Além disso, foi avaliada a microestrutura das amostras de queijos.

IV.3. Material e métodos

IV.3.1 Material

Leite integral, cultura probiótica composta por *Lactobacillus rhamnosus* (LRB, SACCO, Cadorago, Itália) e *Lactococcus lactis* (MWO, SACCO, Cadorago, Itália), *Saccharomyces cerevisiae* (SafAle, Bruggeman, Bélgica), cloreto de cálcio, coalho líquido (quimosina e pepsina bovina, Ha-La, Christian-Hansen[®], Brasil), padrão de aflatoxina M₁ (Sigma Aldrich[®]), gluteraldeído (2%), álcool, acetona e stubs foram utilizados neste estudo.

IV.3.1.1 Produção do queijo Minas Frescal

Para realizar a análise por microscopia eletrônica de varredura, o queijo Minas Frescal foi produzido previamente de acordo com Fernandes et al. (2012), conforme descrito no capítulo III, item III.3.3. Os queijos foram produzidos no Laboratório de Microbiologia e Micotoxilogia de Alimentos da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, campus de Pirassununga, a partir de leite produzido no mesmo campus.

As amostras de queijo (24) foram produzidos em triplicata para cada um dos seguintes tratamentos: T1) controle negativo - apenas queijo; T2) controle positivo, queijo com adição de AFM₁ (0,5 µg/Kg); T3) queijo com adição de *L. rhamnosus* e *L. lactis* (10¹⁰ células/g); T4) queijo com adição de *L. rhamnosus*, *L. lactis* e AFM₁; T5) queijo com adição de *S. cerevisiae* (concentração 10¹⁰ células/g); T6) queijo com adição de *S. cerevisiae* e AFM₁; T7) queijo com adição de *L. rhamnosus*, *L. lactis* e *S. cerevisiae*; T8) queijo com adição de *L. rhamnosus*, *L.*

lactis, *S. cerevisiae* e AFM₁. Em todos os tratamentos, as bactérias ácido láticas, *S. cerevisiae* e aflatoxina M₁ estavam na mesma concentração.

A interação entre os aditivos biológicos e aflatoxina M₁, bem como a microestrutura das amostras de queijo, foi avaliada nos dias 2 e 30 após a produção.

IV.3.1.2 Ensaio de microscopia eletrônica de varredura

As amostras de queijo foram preparadas para microscopia eletrônica de varredura (MEV), conforme proposto por Lobato-Calleros et al. (2002) e Fritzen-Freire et al. (2010) com adaptações. Amostras cilíndricas de 0,5 cm de diâmetro por 0,5 cm de altura foram fixadas em tampão de glutaraldeído a 2% (tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2) por 6 h. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de soluções aquosas de etanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%, 15 minutos por 3 vezes em cada uma, totalizando 45 minutos) e colocadas em acetona por 1 h. Depois disso, cada amostra foi fraturada perpendicularmente em seu eixo longo e montada em stubs com a face fraturada para cima. Um Microscópio Eletrônico de Varredura (Hitachi, TM 3000, Japão) com um detector de elétrons retroespalhado semicondutor de alta sensibilidade foi usado a 15 kV para visualizar cada amostra com uma ampliação de 1000, 5000 e 8000 vezes.

IV.3.1.3 Análise das imagens

A análise das imagens de microscopia eletrônica de varredura foi realizada sem o uso de um programa específico, além do próprio dispositivo MEV - Hitachi 3000, utilizado apenas para captura de imagens. As imagens foram avaliadas uma a uma, sendo selecionadas pelos seguintes critérios: (1) nitidez da imagem e (2) ampliação utilizada, buscou-se a ampliação que apresentava as imagens mais nítidas em todos os tratamentos. Depois de escolher a melhor ampliação, que foi a de 5000x, as imagens mais nítidas e as melhores imagens (dia 2 e dia 30) foram rastreadas para cada tratamento através de uma nova triagem.

IV.4. Resultado e discussão

No presente estudo, o ensaio de microscopia eletrônica de varredura foi útil para caracterizar a superfície dos aditivos biológicos e da aflatoxina M₁ separadamente e em conjunto, dependendo do tratamento e da microestrutura da amostra de queijo Minas Frescal após dois e trinta dias de produção. Além disso, foi possível observar poucas alterações na (1)

superfície dos microrganismos quando a aflatoxina estava ligada a estes e (2) na microestrutura do queijo ao longo do período experimental.

As Figuras 1 a 4 mostram as micrografias dos diferentes tratamentos aplicados ao queijo Minas Frescal avaliados neste trabalho, após os dias 2 e 30 de armazenamento. A Figura 4 é uma imagem compilada de todos os tratamentos realizados neste estudo. Foram observadas diferenças na microestrutura do queijo e na morfologia dos microrganismos utilizados para reduzir a AFM₁ entre os dias 2 e 30.

A microestrutura do queijo é um arranjo espacial de micelas de caseína que se juntam em grupos e cadeias para formar uma rede de proteínas viscoelásticas através da qual a umidade, glóbulos de gordura, minerais e bactérias são dispersas (AGUILERA; STANLEY, 1999; LUCEY; JOHNSON; HORNE, 2003; IMPOCO et al., 2007).

Diferenças foram observadas na microestrutura do queijo e na estrutura das bactérias ácido lácticas (Figura 1). Comparando as imagens dos tratamentos 3 e 4 nos dias 2 e 30 (imagens B dia 2 e B.1 dia 30 do tratamento 3 com as imagens F dia 2 e F.1 dia 30 do tratamento 4) é possível observar que a matriz do queijo possui uma estrutura mais compactada no dia 2 de ambos os tratamentos, não sendo possível nem visualizar as bactérias ácido lácticas. Após 30 dias de produção a rede do queijo está menos compactada sendo possível observar as bactérias ácido lácticas no tratamento 3 (imagem B.1) e no tratamento 4 (imagem F.1) é possível observar a AFM₁ (pontos brancos) ligada as bactérias ácido lácticas. Corroborando com nosso estudo Madadlou e Khosrowshahi (2007) e Fritzen-Freire et al. (2010) relataram que durante o armazenamento do queijo modificações estruturais podem ocorrer devido à perda de umidade e alterações bioquímicas, bem como em virtude de modificações nas propriedades do queijo. Além disso, outro fator que pode contribuir para a formação ou mudanças na microestrutura do queijo é o uso de bactérias ácido lácticas graças a capacidade destas em melhorar o corpo e a textura do queijo (MERRILL et al., 1996; CENTENO et al., 2002). Também corroborando com os nossos resultados Abdelmotilib, Hamad e Salem (2018) observaram que cepas de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* quando em contato com AFM₁ apresentavam manchas na parede celular após a adsorção da toxina.

Na Figura 2 (imagens C dia 2 e C.1 dia 30 do tratamento 5 e G dia 2 e G.1 dia 30 do tratamento 6) foram observadas diferenças na matriz do queijo entre os dias 2 e 30, tanto entre as imagens do tratamento 5 (C/C.1) quanto entre as imagens do tratamento 6 (G/G.1), em ambos

os casos houve um aumento dos poros da rede. Como já reportado anteriormente durante o armazenamento do queijo modificações estruturais podem ocorrer como resultado da perda de umidade e alterações bioquímicas, bem como devido a modificações nas propriedades do queijo (MADADLOU; KHOSROWSHAHI, 2007; FRITZEN-FREIRE et al., 2010). No tratamento 6, tanto na imagem G (dia2) quanto na imagem G.1 (dia 30) foi possível observar a AFM₁ ligada à parede da *Saccharomyces cerevisiae*. A *S.cerevisiae* ao se ligar AFM₁, além de apresentar pontos/manchas brancas na superfície da sua parede celular, sofre uma deformação em sua parede celular, tornando-se alongada ou mais ovalada como é possível observar nas imagens G e G1. Corroborando com nosso resultado Hamad, Zahran e Hafez (2017) relataram em seu estudo que a análise de MEV mostrou que a superfície do microrganismo é capaz de ligar as partículas de toxina que aparecem como um pequeno ponto nas paredes celulares do microrganismo. Abdelmotilib, Hamad e Salem (2018) relataram em seu estudo que as cepas não viáveis das leveduras *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram alterações na parede celular após a adsorção da AFM₁.

Na Figura 3 (imagens D dia 2 e D.1 dia 30 do tratamento 7 e H dia 2 e H.1 dia 30 do tratamento 8) foi possível observar diferenças na matriz do queijo entre os tratamentos que não receberam AFM₁ (imagens D e D.1) e os que receberam AFM₁ (imagens H e H.1). Comparando as imagens do tratamento 7 (D e D.1) com as do tratamento 8 (H e H.1) foi possível observar que a primeira apresenta uma matriz com estrutura mais compactada. De acordo com Fox et al. (2000) uma microestrutura menos compactada pode ser resultado da desmineralização (perda de cálcio e fósforo na micela de caseína) que ocorre devido à diminuição do pH. Fato que pode ter ocorrido no queijo Minas Frescal, já que ao longo do armazenamento há um aumento de ácido láctico, que pode resultar na diminuição do pH. Corroborando com nosso estudo, Fritzen-Freire et al. (2010) relataram em seu trabalho que após 28 dias o queijo Minas Frescal com maior teor ácido láctico apresentaram uma estrutura menos compactada e menos deformações foram observadas. Em relação a capacidade de ligar AFM₁, quando comparamos as imagens do tratamento 7 (D/D.1) com as do tratamento 8 (H/H.1) foi possível observar manchas claras na parede celular e deformação na *Saccharomyces cerevisiae* nas imagens H (dia 2) e H.1 (dia 30) ausentes nas imagens D (dia2) e D.1 (dia 30). Estas manchas na parede celular e a deformação na levedura indicam que a AFM₁ está ligada à parede celular da mesma. Semelhante ao nosso resultado Hamad, Zahran e Hafez (2017) e Abdelmotilib, Hamad e Salem (2018) relataram em

seu estudo que a superfície do microrganismo é capaz de ligar as partículas de AFM₁ que aparecem como pequenos pontos ou manchas na parede celular dos microrganismos. No tratamento 7 na imagem D foi possível observar a *S.cerevisiae* e na imagem D.1 foi possível observar as bactérias ácido lácticas, a qual não foi possível observar no tratamento 8 em nenhuma das imagens.

Figura 1 - Micrografias dos tratamentos 3 (imagens B dia 2 e B.1 dia 30) e 4 (imagens F dia 2 e F.1 dia 30) após 2 e 30 dias de armazenamento.

Fonte: Própria Autoria (2019).

Figura 2 - Micrografias dos tratamentos 5 (imagens C dia 2 e C.1 dia 30) e 6 (imagens G dia 2 e G.1 dia 30) após 2 e 30 dias de armazenamento.

Fonte: Própria Autoria (2019).

Figura 3 - Micrografias dos tratamentos 7 (imagens D dia 2 e D.1 dia 30) e 8 (imagens H dia 2 e H.1 dia 30) após 2 e 30 dias de armazenamento.

Fonte: Própria Autoria (2019).

Figura 4 - Micrografias de todos os tratamentos após 2 dias de armazenamento: A) tratamento 1; B) tratamento 3; C) tratamento 5; D) tratamento 7; E) tratamento 2; F) tratamento 4; G) tratamento 6 e H) tratamento 8. As variações A.1, B.1, C.1, D.1, E.1, F.1, G.1 e H.1 correspondem aos mesmos tratamentos, mas após 30 dias de armazenamento.

Fonte: Própria Autoria (2019).

IV.5. Conclusão

A análise por microscopia eletrônica de varredura é uma técnica útil e muito versátil, e mostrou que tanto as bactérias ácido lácticas quanto as leveduras são capazes de adsorver partículas de aflatoxina M₁ na matriz alimentar (queijo Minas Frescal). Essa capacidade pode ser observada nas micrografias através dos pontos ou manchas presentes na parede celular dos microrganismos. Além disso, permitiu ver as mudanças que ocorrem na matriz proteica do queijo ao longo do tempo e de acordo com os diferentes tratamentos.

IV. Referências

- ABDELMOTILIB, N. M.; HAMAD, G.; SALEM, E. G. Aflatoxin M₁ Reduction in Milk by a Novel Combination of Probiotic Bacterial and Yeast Strains. **European Journal of Nutrition & Food Safety**, v. 8, n. April, p. 83–99, 2018.
- AGUILERA, J.; STANLEY, D. **Microstructure principles of food processing and engineering** (Second). Gaithersburg, USA: Aspen, 1999.
- BOVO, F. et al. Efficiency of Lactic Acid Bacteria Strains for Decontamination of Aflatoxin M₁ in Phosphate Buffer Saline Solution and in Skimmed Milk. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 8, p. 2230–2234, 2013.
- CAMPAGNOLLO, F. B. et al. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M₁: A review. **Food Control**, Kidlington, v. 68, p. 310–329, 2016.
- CENTENO, J. A. et al. Effect of wild strains of *Lactococcus lactis* on the volatile profile and the sensory characteristics of ewes' raw milk cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 12, p. 3164–3172, 2002.
- CORASSIN, C. H. et al. Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M₁ in UHT skim milk. **Food Control**, Kidlington, v. 31, n. 1, p. 80–83, 2013.
- CUNHA, C. R.; VIOTTO, W. H.; VIOTTO, L. A. Use of low concentration factor ultrafiltration retentates in reduced fat “ Minas Frescal ” cheese manufacture : Effect on composition , proteolysis , viscoelastic properties and sensory acceptance. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, p. 215–224, 2006.
- FALLAH, A. A. et al. Determination of aflatoxin M₁ levels in Iranian white and cream cheese. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 8, p. 1872–1875, 1 ago. 2009.
- FAZELI, M. R. et al. Aflatoxin B₁ binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 1, p. 189-192, 2009.
- FERNANDES, A. M. et al. Distribution and stability of aflatoxin M₁ during processing and storage of Minas Frescal cheese. **Food Control**, Kidlington, v. 24, n. 1–2, p. 104–108, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.010>>.
- FINK-GREMMELS, J. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 84–92, 1 abr. 2008.
- FOX, P. et al. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg, USA: Aspen, 2000.
- FRITZEN-FREIRE, C. B. et al. The influence of *Bifidobacterium Bb-12* and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. **Journal of Food Engineering**, London, v. 96, n. 4, p. 621–627, 2010.

GONÇALVES, B. L. et al. The in vitro ability of different *Saccharomyces cerevisiae* based products to bind aflatoxin B₁. **Food Control**, Kidlington, v. 47, p. 298-300, 2015.

GONÇALVES, B. L.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. Mycotoxicoses in dairy cattle: A review. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 10, n. 11, 2015.

HAMAD, G. M.; ZAHRAN, E.; HAFEZ, E. E. The efficacy of bacterial and yeasts strains and their combination to bind aflatoxin B₁ and B₂ in artificially contaminated infants food. **Journal of Food Safety**, v. 37, n. 4, p. 1–9, 2017

HERNANDEZ-MENDOZA, A.; GARCIA, H. ; STEELE, J. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B₁. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 4, p. 1064–1068, 2009. Doi:10.1016/j.fct.2009.01.042

IMPOCO, G. et al. Quantitative analysis of cheese microstructure using SEM imagery. **Communications to SIMAI Congress**, v. 2, p. 1–10, 2007.

LEE, C. S.; HYUN, Y.; CHOI, J. Y. Syntesis and Electrochemical Performance of Transition Metal Coated Carbon Nanofibers on Ni Foan as Anode Materials for Lethium Secondary Batteries. In: YARAGALLA, S.; MISHRA, R.; MARIA, H. J. (Ed.). **Carbon Based Nanofillers and Their Rubber Nanocomposites**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 225–242.

LOBATO-CALLEROS, C. et al. Microstructure and texture of Manchego cheese-like products made with canola oil, lipophilic and hydrophilic emulsifiers. **Journal of Texture Studies**, v. 33, n. 3, p. 165–182, 2002. Doi: 10.1111/j.1745-4603.2002.tb01343.x

LUCEY, J. A.; JOHNSON, M. E.; HORNE, D. S. Invited review: Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 9, p. 2725–2743, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73869-7](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73869-7)>.

MADADLOU, A.; KHOSROWSHAHI, A. The influence of brine concentration on chemical composition and texture of Iranian White cheese. **Journal of Food Engineering**, London, v. 81, p. 330–335, 2007.

MERRILL, R. K. et al. Microstructure and physical properties of a reduced fat Mozzarella cheese made using *Lactobacillus casei* ssp. *casei* adjunct culture. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 29, n. 8, p. 721–728, 1996.

OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H. Aflatoxins. In: DUARTE, S. C.; PENA, A. L. S.; LINO, C. M. (Org.). **Mycotoxins and their implications in food safety**. London: Future Science, 2014. v. 1, p. 6-19.

PRANDINI, A. et al. On the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 984–991, 2009.

4. CONCLUSÕES GERAIS

As principais conclusões desta pesquisa foram:

- A ocorrência de AFM₁ em leite cru, pasteurizado e queijo minas frescal foi menor em comparação com outros estudos, mas verificamos uma ocorrência considerável (40,5%, $N=84$), e essa exposição pode representar um risco potencial para a saúde humana.
- No Brasil os estudos existentes sobre a incidência de AFM₁ no queijo Minas Frescal são insuficientes e os poucos estudos existentes não relatam o uso ou não da *cultura de starter*. Além disso, apresentaram resultados divergentes.
- O uso de aditivos biológicos como BALs e *Saccharomyces cerevisiae* são eficientes na redução da AFM₁ em queijo Minas Frescal e não afetam a vida útil do queijo.
- A redução da AFM₁ variou de acordo com o aditivo a base de microrganismos utilizado nos tratamentos. A *Saccharomyces cerevisiae* apresentou maior capacidade de ligar AFM₁ e foi mais resistente a variações de pH.
- A microscopia eletrônica de varredura foi bastante útil, confirmou que tanto as bactérias ácido lácticas quanto as leveduras foram capazes de adsorver partículas de AFM₁ na matriz alimentar. Além disso, permitiu visualizar as mudanças que ocorreram na matriz proteica do queijo ao longo do tempo e de acordo com os diferentes tratamentos.

5. SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

Embora o uso de aditivos biológicos tenha sido intensamente estudado durante o mestrado e doutorado, alguns estudos ainda podem ser propostos, uma vez que o leite e os produtos lácteos são consumidos concomitantemente, e geralmente em maior quantidade por idosos e crianças, que são mais vulneráveis à efeitos tóxicos, razão pela qual os níveis de detecção de AFM₁ podem ser um problema de saúde pública.

Ao decorrer do estudo foi observado que na última década poucos estudos foram publicados sobre esses métodos biológicos e, infelizmente, nenhum dos estudos publicados testou esses métodos em queijo. Por estes motivos sugere-se que:

- Mais estudos sobre métodos para prevenir e reduzir a ocorrência de AFM₁ em leite e produtos lácteos devam ser realizados;
- Mais estudos sobre métodos biológicos para descontaminação em leite e principalmente em queijos e produtos lácteos são necessários para que essa técnica seja melhor desenvolvida e aplicada a indústrias de grande porte;
- Estudos adicionais sobre o uso dessa levedura em laticínios devem ser realizados;
- Estudos utilizando MEV ou outras técnicas que possibilitassem visualizar a interação microrganismos-AFM₁ deveriam ser realizados, visando elucidar a ligação e seus efeitos na matriz alimentar.

“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto”

Carl Sagan