

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ANDRESSA INEZ CENTENARO

**EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO E DA DIGESTIBILIDADE SOBRE A
INTERAÇÃO ENTRE AFLATOXINA B1 E M1 COM A FRAÇÃO PROTEICA DO
LEITE**

DISSERTAÇÃO

MEDIANEIRA

2016

ANDRESSA INEZ CENTENARO

**EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO E DA DIGESTIBILIDADE SOBRE A
INTERAÇÃO ENTRE AFLATOXINA B1 E M1 COM A FRAÇÃO PROTEICA DO
LEITE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos, do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Deisy A. Drunkler

MEDIANEIRA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C397e Centenaro, Andressa Inez

Efeito do tratamento térmico e da digestibilidade sobre a interação entre aflatoxina b1 e m1 com a fração proteica do leite / Andressa Inez Centenaro – 2016.

75 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Deisy A. Drunkler

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Medianeira, 2016.

Inclui bibliografias.

1. Pasteurização. 2. Bioacessibilidade. 3. Metabolização. 4. Alimentos – Dissertações. I. Drunkler, Deisy A., orient. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. III. Título.

CDD: 664

Biblioteca Câmpus Medianeira
Fernanda Bem 9/1735



TERMO DE APROVAÇÃO

EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO E DA DIGESTIBILIDADE SOBRE A INTERAÇÃO ENTRE AFLATOXINA B₁ E M₁ COM A FRAÇÃO PROTEICA DO LEITE.

Por

ANDRESSA INEZ CENENTENARO

Essa dissertação foi apresentada às 14:00 horas, do dia 09 de junho de 2016, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Ciências e Tecnologia de Produtos Alimentícios, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Alimentos – PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Deisy Alessandra Drunkler (Orientadora – PPGTA)

Prof. Dr. Fernando Reinoldo Scremin (Membro Externo – UTFPR)

Prof. Dr. Paulo Rodrigo Stival Bittencourt (Membro Externo – UTFPR)

Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong (Membro Externo – FURG)

A via original com as assinaturas encontra-se na secretaria do programa.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, sabedoria e luz no decorrer do desenvolvimento desse trabalho.

À professora orientadora Dr^a. Deisy Alessandra Drunkler que não mediu esforços para o desenvolvimento, orientação, e disponibilidade para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Ildo e Nilda Centenaro, pela minha existência e por sempre me incentivaram nesta jornada.

Às minhas irmãs Andréia Ap. Centenaro e Adriana M. Centenaro Follmann, cunhados, amigos e amigas, pelo apoio.

Às alunas Katia, Ediane, Tania pela ajuda mutua e companheirismo.

RESUMO

CENTENARO, Andressa Inez. Efeito do tratamento térmico e da digestibilidade sobre a interação entre aflatoxina B₁ e M₁ com a fração proteica do leite. 2016. 76 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2016.

O leite é uma das principais fontes de nutrientes da dieta humana e é um alimento que acompanha o ser humano durante toda a vida, tanto como leite de consumo como através de seus derivados. O leite pode apresentar contaminação oriunda de diversas fontes, relacionados desde a ordenha até o processo de beneficiamento do mesmo. Dentre esses contaminantes, destacam-se as micotoxinas, que são metabólitos tóxicos produzidos por fungos em condições de estresse. Estudos correlacionam a ocorrência de micotoxinas em leite e derivados lácteos, com ênfase na aflatoxina M₁ (AFM₁) que é regulamentada pela legislação vigente. Apesar da maior parte da literatura afirmar que a aflatoxina B₁ (AFB₁) é completamente convertida em AFM₁, resultados preliminares tem sugerido que isso não é verdadeiro, o que vem a justificar que a mesma passe, também, a ser analisada, uma vez que a toxicidade da AFB₁ é maior que a da AFM₁. Na área de leite e derivados lácteos, estudos têm sugerido que as aflatoxinas, em especial a AFM₁, localizam-se predominantemente nas frações proteicas. Porém, a elucidação da interação entre AFM₁ e fração proteica permanece sem conclusão definitiva, o que sugere um campo amplo de estudo nesta área. Ainda, tendo em vista que a concentração de aflatoxinas é predominante na fração proteica e que pode haver uma interação química entre esta fração e aflatoxinas, os tratamentos térmicos aos quais o leite é submetido podem causar alterações significativas nas estruturas dessas proteínas e, por conseguinte, nas interações entre proteínas e AFM₁ e AFB₁. Portanto, o entendimento da natureza das ligações entre as AFM₁ e AFB₁ às proteínas do leite é imprescindível para a compreensão da biodisponibilidade dessas micotoxinas em animais e seres humanos. Desta forma, o objetivo do trabalho foi verificar o efeito do tratamento térmico e da digestibilidade sobre a interação proteína-aflatoxina. Para isso, foram contaminados amostras de solução de caseína bovina e leite desnatado com AFB₁ (200 µg.L⁻¹) e AFM₁ (20 µg.L⁻¹), posteriormente submetidas a pasteurização e digestão *in vitro*. As determinações realizadas consistiram na quantificação das AFLB₁ e M₁ por Cromatografia à Líquido de Ultra Alta Eficiência, Espectroscopia na região do infra vermelho (FTIR), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Espectroscopia de fluorescência. Não houve redução da concentração de AFB₁ e AFM₁ após o tratamento térmico e a bioacessibilidade foi de 91,2% 70,5% e 90,9% e 69,7%, respectivamente, para caseína bovina e leite desnatado. Avaliando quantitativamente as estruturas secundárias da solução de caseína bovina e leite desnatado contaminados com AFB₁ e AFM₁ as principais mudanças ocorreram nas estruturas β-volta, β-anti e β-folha. Com a análise de DSC observou-se picos exotérmicos para ambos os ensaios, com variação de entalpia (ΔH) após cada ensaio. Em relação aos espectros de fluorescência, foi possível verificar que as AFB₁ e AFM₁ promoveram redução da fluorescência original das proteínas lácteas. Pelos resultados obtidos, é possível concluir que a concentração das AFB₁ e M₁ não foram reduzidas pela temperatura

empregada, provavelmente pela interação proteínas do leite-aflatoxina, resultando numa bioacessibilidade relativamente elevada.

Palavras-chave: Bioacessibilidade. Metabolização. Pasteurização.

ABSTRACT

CENTENARO, Andressa Inez. Effect of heat treatment and digestibility on interaction between aflatoxin B₁ and M₁ with the milk protein fraction. 2016. 76 p. Dissertation (Post Graduate Program in Food Technology). Federal Technological University of Paraná. Medianeira, 2016.

Milk and derivatives are one of the main sources of nutrients of the human diet and is a food that follows man during all of your life. The milk may be contaminated from several sources, related since milking until the beneficiation process. Among these contaminants, highlights are the mycotoxins, which are toxic metabolites produced by fungus in conditions of stress. Studies related to the occurrence of mycotoxins in milk and milk products, with the emphasis on aflatoxin M₁ (AFM₁) which is ruled by Brazilian law. While most of the literature stating that aflatoxin B₁ (AFB₁) is completely converted into AFM₁, preliminary results have suggested that this is not true, justifying that it passes also to analyze because the toxicity of AFB₁ is greater than the AFM₁. In the milk and dairy products, studies have suggested that aflatoxins, in particular AFM₁, are located predominantly in protein fractions. However, the elucidation of the interaction between AFM₁ and protein fraction remains without definitive conclusion, suggesting a large broad field of study in this area. Also considering that the concentration of aflatoxins are prevalent in the protein fractions and can have a chemical interaction between these fractions and aflatoxins, the thermal treatments that the milk is subjected can cause significant changes in these proteins structures and consequently in interactions between proteins and AFM₁ and AFB₁. Therefore, the knowledge of nature of the links between AFM₁ and AFB₁ to milk proteins is indispensable for understanding the bioavailability of these mycotoxins in animals and humans. Thus, the aim of this study was to investigate the effect of thermal treatment and the digestibility of the interaction protein-aflatoxin. For this, samples of bovine casein solution and skimmed milk were contaminated with AFB₁ (200 µg.L⁻¹) and AFM₁ (20 µg.L⁻¹), and then submitted to pasteurization and in vitro digestion. The carried analyzes consisted in quantifying AFB₁ and AFM₁ using high performance liquid chromatography, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and fluorescence spectroscopy. There was no reduction in the concentration of AFB₁ and AFM₁ and after the thermal treatment the bioaccessibility was 91.2% and 70.5%, 90.9% and 69.7%, respectively, for bovine casein and skim milk. In quantitative assessments of the secondary structures of bovine casein and skim milk contaminated with AFB₁ and AFM₁ the major changes occurred in the β-turn structures, β-anti and β-sheet. With the DSC analysis was observed exothermic peaks for both tests, the change of enthalpy (ΔH) after each test. Regarding the fluorescence spectra, we found that AFB₁ and AFM₁ promoted reduction of the original fluorescence of milk proteins. From the results, it may be concluded that the concentration of AFB₁ and M₁ not been reduced by the temperature applied, probably by the interaction between milk protein and aflatoxin, resulting in a relatively high bioaccessibility.

Keywords: Bioaccessibility. Metabolization. Pasteurization.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2 OBJETIVOS	8
2.1 OBJETIVO GERAL.....	8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	9
3.1 AFLATOXINAS	9
3.2 OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS EM LEITE E DERIVADOS.....	12
3.3 EFEITOS DOS PROCESSOS TECNOLÓGICOS SOBRE A ESTABILIDADE DAS AFLATOXINAS	15
3.4 BIOACESSIBILIDADE OU BIODISPONIBILIDADE DE AFLATOXINAS EM ALIMENTOS.....	16
3.5 INTERAÇÃO ENTRE A AFLATOXINA E PROTEÍNA DO LEITE	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 MATERIAS	19
4.2 MÉTODOS	19
4.2.1 Preparo das soluções	19
4.2.2 Tratamento térmico	21
4.2.3 Digestibilidade <i>in vitro</i>	21
4.2.4 Quantificação das aflatoxinas	24
4.2.5 Espectroscopia na região infra vermelho (FTIR)	25
4.2.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	26
4.2.7 Espectroscopia de fluorescência	26
4.2.8 Análise estatística	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO E DA DIGESTIBILIDADE SOBRE A CONCENTRAÇÃO E A INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS DO LEITE E A AFB ₁ ...	27
5.1.1 Quantificação da AFB₁ na amostra de caseína e no leite desnatado UAT	27
5.1.2 Análise de Infravermelho transformada de <i>Fourier</i> (FTIR) para avaliar a interação da AFB₁ na caseína bovina e no leite desnatado	30
5.1.3 Análise de DSC em amostras de caseína e no leite desnatado contaminados com AFB₁	39
5.1.4 Análise de espectroscopia de fluorescência em amostras de caseína e no leite desnatado UAT contaminados com AFB₁	41

5.2 EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO E DA DIGESTIBILIDADE SOBRE A CONCENTRAÇÃO E A INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS DO LEITE E A AFM1	44
5.2.1 Quantificação da AFM1 na amostra de caseína e no leite desnatado	44
5.2.2 Análise de FTIR para avaliar a interação da AFM1 na amostra de caseína e no leite desnatado UAT	46
5.2.3 Análise de DSC em amostras de caseína e no leite UAT desnatado contaminados com AFM1	54
5.2.4 Análise de espectroscopia de fluorescência em amostras de caseína e no leite UAT desnatado contaminados com AFM1	56
5.3 CORRELAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS EMPREGADAS PARA VERIFICAR A INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS DO LEITE E AS AFLATOXINAS	59
7. CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61

1. INTRODUÇÃO

O leite é um dos principais alimentos da dieta humana, sendo um dos mais importantes para os lactentes e crianças (BILANDZIC et al., 2014). Devido a essa peculiaridade deve estar associada à preocupação com a qualidade do leite, que não se define por uma única questão, mas sim um conjunto de atributos dentre os quais se destacam a estabilidade físico-química e microbiológica, o elevado nível higiênico e a inocuidade sanitária (BRASIL, 2002a).

O leite está exposto a vários fatores que podem resultar na sua contaminação e que influenciam a inocuidade, entre elas a forma como o produto é estocado na fazenda, pelas condições higiênicas dos equipamentos, utensílios, ambiente e dos funcionários, desde a obtenção até o processamento. Dentre os contaminantes presentes, destacam-se as substâncias químicas, a citar os resíduos de antibióticos e as micotoxinas (GALVANO; GALORAFO; GALVANO, 1996; KHANIKI, 2007; SANTOS et al. 2014).

As micotoxinas são compostos químicos tóxicos produzidos por fungos, diferenciando-se das toxinas bacterianas por não serem de natureza proteica (SAKATA; SABBAG; MAIA, 2011).

A presença de micotoxinas no leite pode estar correlacionada com a ingestão de alimentos contaminados por estes compostos tóxicos, como, por exemplo, as rações concentradas contendo grãos de cereais, plantas forrageiras e ainda alimentos preservados como silagem, feno e palha (CREPPY, 2002).

Dentre as micotoxinas que podem estar contaminando o leite e derivados, destacam-se as aflatoxinas, que são produzidas pelos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nominus* (BIANCO et al., 2012; BRITZI et al., 2013; ASHIQ; HUSSAIN; AHMAD, 2014), e dentre estas as aflatoxinas B₁ e B₂, oriundas de alimentos contaminados consumidos pelos animais, e M₁ e M₂, que são produtos da metabolização excretados no leite (PEREIRA et al. 2005; PRADO et al. 2008; ZAIN, 2011; BRITZI et al., 2013).

A AFB₁ é, dentre as aflatoxinas, a mais toxigênica, sendo considerada cancerígena, teratogênica e mutagênica (BILANDZIC et al., 2014). Seu consumo está associado à ocorrência de carcinoma hepatocelular, terceira principal causa de

morte por câncer no mundo, contribuindo com 28% de todos os casos mundiais relatados desta doença (ILHA et al., 2013). Ainda, produzem efeitos nocivos ao sistema imunológico, alterando a expressão dos linfócitos e das citocinas (BIANCO et al., 2012). Nos casos agudos, conhecidos como aflatoxicose aguda, pode causar no ser humano vômito, doenças do coração e do fígado, edema pulmonar e até a morte (FANG et al., 2013).

Por sua vez, o perfil toxicológico da AFM₁ se assemelha com o da estrutura original a AFB₁ (IARC, 2012).

Na literatura, poucos são os estudos que relatam a ocorrência de AFB₁ em leite e derivados (CARVAJAL et al., 2003; SCAGLIONI et al., 2014), porém são vários os estudos que demonstram a presença de AFM₁ (FARIAS et al., 2005; EK, KA, 2009; BECKER et al., 2010; BIANCO et al., 2012; KABAK e OZBEY, 2012; DUARTE et al., 2013; VDOVENKO et al., 2013; BRITZI et al., 2013), sendo que esta última é regulamentada pela legislação em vigor (BRASIL, 2002b).

Na área de leite e derivados lácteos, estudos têm sugerido que as aflatoxinas, em especial a AFM₁, localizam-se predominantemente nas frações proteicas, naquelas com maior concentração de caseína, que são as principais proteínas do leite, seguida das proteínas do soro (α -lactoalbumina e β -lactoglobulina) (BRACKETT; MARTH, 1982; IHA et al., 2013). Porém, estes estudos não tinham por objetivo de verificar a existência de interação entre AFM₁ e as proteínas do leite assim como propor um mecanismo de interação, mas apenas baseiam-se na quantificação das aflatoxinas nas frações proteicas do leite para embasar o que acima foi dito. Sendo assim, a elucidação da interação entre aflatoxina e fração proteica permanece sem conclusão definitiva, o que sugere um campo amplo de estudo nesta área.

Nos processos térmicos de tratamento do leite para torná-lo apto para consumo (pasteurização e ultra-alta temperatura), a AFB₁ e a AFM₁ não são destruídas; assim, é essencial ter o controle efetivo do leite e os produtos lácteos (BECKER, 2012; DUARTE et al., 2013; BILANDZIC et al., 2014). Portanto, o emprego de tratamentos térmicos no leite, além de poder alterar a disponibilidade e digestibilidade de proteínas e demais nutrientes, ainda pode intervir nas interações moleculares proteína-aflatoxina e, conseqüentemente, nos níveis de biodisponibilidade de AFB₁ e AFM₁.

A compreensão da natureza das ligações entre as AFB₁ e AFM₁ às proteínas

do leite é imprescindível para a compreensão da biodisponibilidade dessas micotoxinas em seres humanos e animais. Aplicações para deduzir a biodisponibilidade de aflatoxinas dependem da estabilidade do complexo formado e as condições do meio em que se encontram (HASKARD et al., 2001).

É difícil quantificar a biodisponibilidade e biodisponibilidade de um composto devido aos diferentes processos que compoe a digestão. Há um interesse crescente em utilizar métodos *in vitro* para estudar a biodisponibilidade dos compostos a partir do solo e do alimentos A maior parte dos modelos de digestão *in vitro* simula, de forma simplificada, processos de digestão na boca, estômago e no intestino delgado, de modo a permitir investigação do potencial de absorção de certos compostos durante o trânsito no trato digestório (VERSANTVOORT et al., 2005).

Com base no exposto, o efeito do tratamento térmico e da digestibilidade sobre a interação entre AFB₁ e AFM₁ com a fração proteica do leite vêm a justificar a presente proposta de pesquisa, uma vez que não há dados suficientes na literatura sobre este assunto e que poderiam orientar novos trabalhos voltados à descontaminação do leite, a prevenção e maior entendimento da interação proteína-aflatoxina em leite produto amplamente consumido pela população.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar os efeitos do tratamento térmico e da digestibilidade sobre a interação entre as AFB₁ e AFM₁ com as frações proteicas do leite.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do tratamento térmico sobre a concentração das AFB₁ e AFM₁;
- Avaliar o efeito do tratamento térmico sobre as interações entre as AFB₁ e AFM₁ com a fração proteica do leite;
- Avaliar o efeito da digestibilidade *in vitro* sobre as interações entre as AFB₁ e AFM₁ com a fração proteica do leite.

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

As micotoxinas compreendem um conjunto de compostos químicos de caráter tóxico, produzidas por diferentes espécies de fungos (DZUMAN et al., 2013) e que podem ser encontradas em alimentos, o que justifica a importância em se estudar o impacto destas substâncias na saúde humana e animal, pois ocasionam perdas econômicas significativas, além de representarem riscos à saúde humana e animal (ASHIQ; HUSSAIN; AHMAD, 2014).

As micotoxinas quando absorvidas, ingeridas ou inaladas podem causar doenças ou até morte (JOBIM et al., 2014).

Em torno de 400 micotoxinas diferentes foram reconhecidas (BERTHILLER et al., 2014). Dentre estas, as aflatoxinas destacam-se por contaminar o leite e seus derivados, pois estão presentes em alimentos e rações consumidas pelos animais (SAKATA, SABBAG, MAIA, 2011).

3.1 AFLATOXINAS

As principais aflatoxinas encontradas nos alimentos são produzidas por fungos dos gêneros *Aspergillus*, destacando-se as espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (BIANCO et al., 2012; DUARTE et al., 2013; BRITZI et al., 2013; ASHIQ, HUSSAIN, AHMAD, 2014)

A AFB₁ é, dentre as aflatoxinas, a mais toxigênica, sendo considerada cancerígena, teratogênica e mutagênica (KABAK; OZBEY, 2012). Seu consumo está associado à ocorrência de carcinoma hepatocelular, terceira principal causa de morte por câncer no mundo, contribuindo com 28% de todos os casos mundiais relatados desta doença (KABAK; OZBEY, 2012; BRITZI et al., 2013). Ainda, produzem efeitos nocivos ao sistema imunológico, alterando a expressão dos linfócitos e das citocinas (BIANCO et al., 2012). Nos casos agudos, conhecidos como aflatoxicose aguda, pode causar no ser humano vômito, doenças do coração e do fígado, edema pulmonar e até a morte (FANG et al., 2013).

Por sua vez, o perfil toxicológico da AFM₁ se assemelha com o da estrutura original a AFB₁ (IARC, 2012).

Quimicamente, as aflatoxinas são advindas de um núcleo cumarínico, ligado por um lado por um sistema reativo bifurânico e do outro lado uma pentanona (série B) ou uma delta-lactona (série G) (HOLZAPFEL; STEYN, 1966; ROCHA, 2010). Apesar de existirem cerca de 20 tipos desta micotoxina (SAKATA; SABBAG; MAIA, 2011; VDOVENKO et al., 2013), as de maior importância toxicológica são a B₁, B₂, G₁ e G₂, e seus metabolitos M₁ e M₂ (BIANCO et al., 2012), sendo representadas na Figura 1.

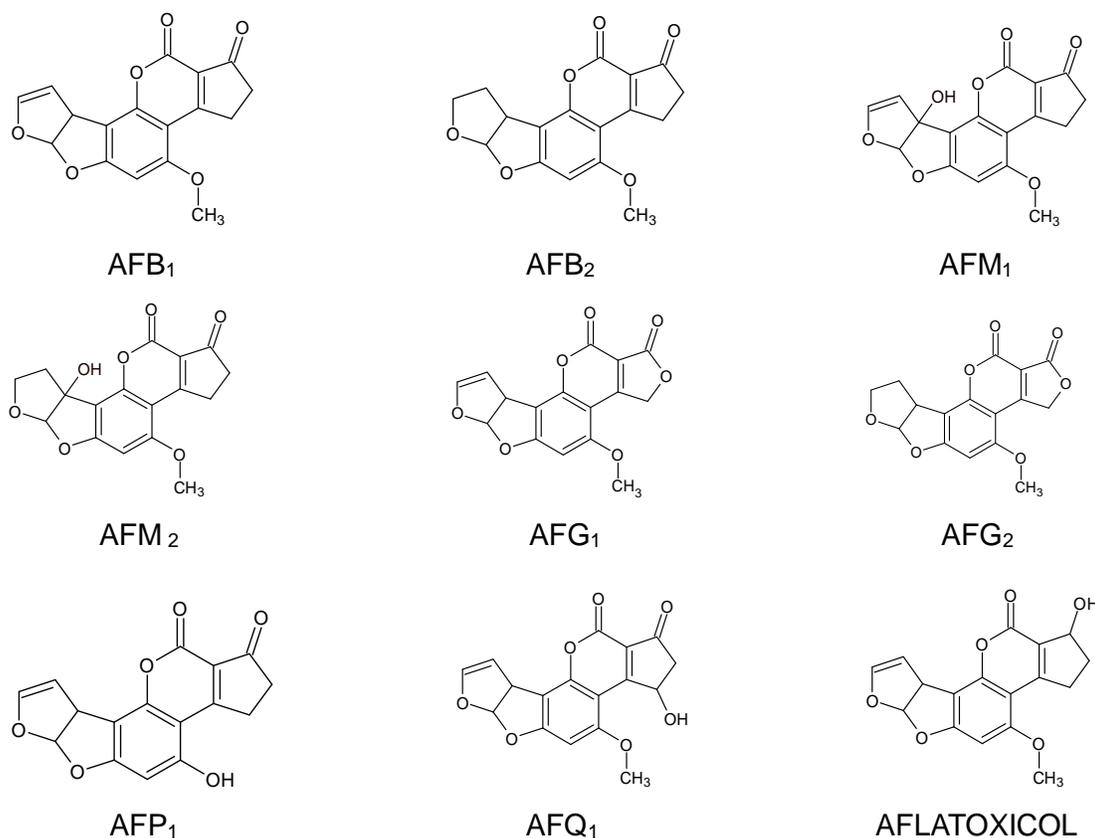


Figura 1 - Estrutura química das principais aflatoxinas.

No trato digestório, as aflatoxinas são absorvidas e, posteriormente, biotransformadas por enzimas hepáticas com funções oxidases que pertencem ao sistema citocromo P-450, tais como a CYP1A2, CYP3A4, CYP2A6. Estas enzimas convertem AFB₁ aos seguintes compostos: aflatoxina B-8,9-exo-epóxido (exo-AFBO); AFM₁, aflatoxina Q1 e aflatoxina B2a nas reações de hidroxilação; P1

(AFP₁) que se forma na reação de O-demetilação e aflatoxicol (AFL) pela redução de AFB₁ (Figura 2) (FANG et al., 2013). A hidroxilação da aflatoxina B₂ (AFB₂) produz Aflatoxina M₂ (AFM₂) (BIANCO et al.; 2012).

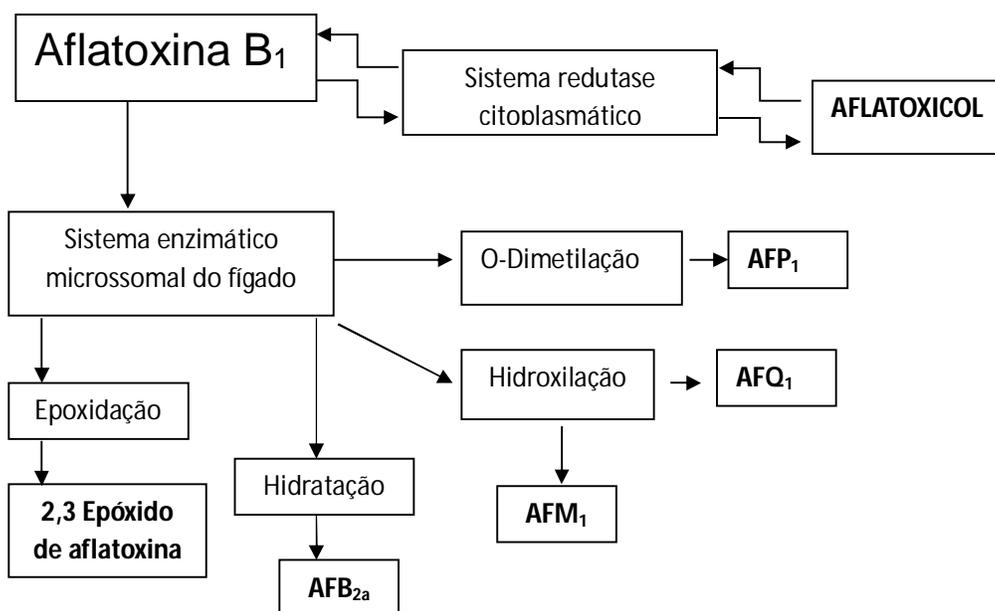


Figura 2 – Principais metabolitos da AFB₁.

Fonte: Adaptado de BAGGINI (2015).

Todos os produtos resultantes da biotransformação podem estar presentes no leite; porém, a AFM₁ foi o primeiro metabólito a ser identificado neste alimento (SAKATA; SABBAG; MAIA, 2011), cuja presença foi associada à ingestão de ração contaminada por AFB₁ (MOHAMMADI et al., 2011) e, por isso, sua concentração está diretamente relacionada à quantidade de AFB₁ ingerida pelo animal (NAVARRO, 2011).

Estudos sugerem que a biotransformação da AFB₁ em AFM₁ no rúmen de animais lactantes é de, aproximadamente, 0,5 a 6%, sendo proporcional à produção de leite, quanto maior a produção maiores taxas de transformação, ou vice-versa (SAKATA; SABBAG; MAIA, 2011; NAVARRO, 2011; KABAK; OZBEY, 2012; DUARTE et al., 2013); no entanto, os valores de conversão ainda não foram totalmente elucidados. Sugere-se que a contaminação do leite por AFM₁ ocorra no segundo e terceiro dias após a ingestão da AFB₁ pelo animal, mas essa contaminação já foi relatada em períodos de tempo menores (DUARTE et al., 2013). Segundo

Mohammadi et al. (2011), após doze horas da ingestão de alimento contaminado a AFM₁ é excretada para o leite; porém, quando retirada a AFB₁ do alimento por dois a três dias, reduz-se a zero o nível do metabólito hidroxilado no leite (DUARTE et al., 2013).

Dentre os fatores que afetam a passagem da AFM₁ para o leite destacam-se os nutricionais e fisiológicos, tais como a saúde do animal, a capacidade de biotransformação hepática, a taxa de ingestão, taxa de digestão, produção do leite e a integridade das membranas celulares alveolares mamárias, estas caracterizadas por células somáticas (SAKATA; SABBAG; MAIA, 2011; BRITZI et al., 2013; DUARTE et al., 2013).

Além da contaminação do leite por AFM₁, estudos relatam a presença da AFB₁ nesses produtos, indicando que a conversão não ocorre de forma completa como descrito anteriormente (CARVAJAL et al., 2003; SCAGLIONI et al., 2014).

Por representar um risco de segurança e também devido à periculosidade das aflatoxinas, se fazem necessários estudos que visem a melhor compreensão da contaminação do leite por estes compostos químicos visando uma melhoria na qualidade dos alimentos, como leite e seus derivados (STOEV et al., 2015).

3.2 OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS EM LEITE E DERIVADOS

A avaliação da qualidade do leite é de extrema importância, uma vez que há um grande consumo por parte do público infantil (BILANDZIC et al., 2014), principalmente nos primeiros anos da infância nos quais se faz a introdução de nova alimentação, produzidos a partir de outros tipos de leite que não o materno, expondo-as ao potencial risco de ingestão e exposição às aflatoxinas (EK; KA, 2009).

No Brasil, vários estudos relataram a ocorrência de aflatoxinas em leite e derivados. Becker et al. (2010) ao avaliarem a ocorrência de AFM₁ em leite *in natura*, pasteurizado, UAT e em pó comercializados no Paraná, verificaram que 70% (14) apresentaram contaminação por AFM₁; porém, somente 3 (15%) apresentaram resultados acima do limite de detecção estipulado pelo método (0,10 µg.kg⁻¹) e

nenhuma acima do estipulado pela legislação ($0,50 \mu\text{g.kg}^{-1}$). Em contrapartida, um estudo realizado em Minas Gerais avaliou 75 amostras de leite UAT quanto à ocorrência de AFM_1 e 30,7% apresentaram valores superiores ao estipulado pela legislação (OLIVEIRA et al., 2013). Ilha et al. (2013) ao analisarem leite (diversos tipos: UAT, pasteurizado, em pó, *in natura*, integral, desnatado e com aditivos) e fórmulas infantis comercializados na cidade de Ribeirão Preto-SP, verificaram que 83% das amostras de leite estavam contaminadas com AFM_1 , com concentração variando de $0,01$ - $0,44 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para leite fluido e $0,02$ - $0,76 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para leite em pó; porém, observaram contaminação nas diferentes amostras de fórmulas infantis. Quando analisadas amostras de leite em pó, Londoño et al. (2013) observaram que, das 30 amostras coletadas no Brasil e na Argentina, todas estavam contaminadas por AFM_1 com concentrações variando de $0,1$ a $0,92 \mu\text{g.kg}^{-1}$, concentração média de $0,39 \mu\text{g.kg}^{-1}$, também excedendo o limite permitido para esta aflatoxina na Argentina, que é de $0,05 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Shundo e Sabino (2006) avaliaram 107 amostras de leite *in natura* comercializadas nas cidades de São Paulo e Marília (SP) e constataram que 79 (73,8%) das amostras estavam contaminadas por AFM_1 , com concentrações variando de $0,02$ a $0,26 \mu\text{g.L}^{-1}$; sendo que duas amostras de leite cru (9%), duas amostras de leite pasteurizado (7,2%) e 3 amostras de leite UAT estavam acima de $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$ (permitido pela legislação vigente).

Oliveira et al. (2013), determinaram AFM_1 em 75 amostras de leite ultra alta temperatura (UAT) comercializados em Minas Gerais, Brasil. Das amostras analisadas, 23 (30,7%) apresentaram contaminação por AFM_1 com concentrações variando entre $1,00$ - $4,10 \mu\text{g.L}^{-1}$, estando desta forma acima do limite máximo permitido pela legislação brasileira.

A ocorrência de AFM_1 também já foi reportada em amostras de derivados lácteos, como queijos, iogurtes e leites fermentados. Oliveira et al. (2011) avaliaram 24 amostras de queijo Minas Frescal e 24 amostras de queijo Minas Padrão produzidas na região Nordeste do Estado de São Paulo, e detectaram AFM_1 em 13 (27,1%) amostras, com concentrações variando entre $0,03$ - $0,31 \mu\text{g.kg}^{-1}$. As concentrações médias de AFM_1 nas amostras de queijo Minas Frescal e Padrão foram de $0,14 \pm 0,11$ e de $0,11 \pm 0,05 \mu\text{g.kg}^{-1}$, respectivamente. Esses dados chamam a atenção para a necessidade de adoção de um limite de tolerância menor para AFM_1 em queijos no Brasil.

Prado et al. (2008), detectaram AFM_1 em 40 das 88 amostras (46,4%) de

queijo parmesão comercializadas no estado de Minas Gerais, Brasil. Das amostras contaminadas, somente duas estavam num nível acima do limite máximo permitido limite máximo permitido ($0,25 \mu\text{g.kg}^{-1}$) aceito pela União Europeia para AFM₁.

No Líbano, foram analisadas amostras de leite e iogurte para a presença de AFM₁ e a incidência de contaminação foi de 40,6% e 32,8%, respectivamente. Destas contaminações, 11% das amostras de leite e 4% das amostras de iogurte estavam acima do permitido pela legislação local (KHOURY; ATOUI; YAGHI, 2011).

No estado de Ogun na Nigéria, foram avaliadas amostras de leite humano e bovino, iogurte e sorvetes coletados aleatoriamente. Foram observadas altos níveis de contaminação por AFM₁ em amostras de leite humano, leite de vaca e sorvete ($4,00 \mu\text{g.L}^{-1}$, $2,04 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $2,23 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente) (ATANDA et al., 2007).

A incidência de AFM₂ também já foi avaliada em produtos lácteos comerciais. Lee e Lee (2015) analisaram amostras de leite em pó e leite fluido e observaram níveis baixos de concentração, de 0,02 a 0,06 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, respectivamente. Garrido et al. (2003) também avaliaram a ocorrência dessa aflatoxina em 60 amostras de leite UAT e 79 amostras de leite pasteurizado comercializadas nos municípios de Ribeirão Preto – SP; porém, não detectaram a presença desta aflatoxina.

Apesar de escassos, os estudos de ocorrência de AFB₁ em leite vem comprovando a contaminação natural por esta micotoxina. Gurbay et al. (2010) encontraram níveis de 0,09 a 4,10 mg.L^{-1} para a AFB₁ e 0,06-0,30 mg.L^{-1} para AFM₁ em leite humano, na Turquia. Em amostras de origem animal, Scaglioni et al. (2014) avaliaram a ocorrência de AFB₁ em amostras de leite pasteurizado e UAT e observaram valores positivos em 41,7 e 13,3%, das amostras, respectivamente. Carvajal et al. (2003) também reportaram a presença de AFB₁ (0 a 0,40 $\mu\text{g.L}^{-1}$) em amostras de leite tratadas termicamente, enfatizando desta forma, não só a importância do estudo e estabelecimento de limites máximos toleráveis para a AFM₁ mas também para a sua precursora, a AFB₁, em amostras de leite e derivados lácteos, considerando-se a toxicidade elevada e a ocorrência de ambas as micotoxinas nesses produtos.

3.3 EFEITOS DOS PROCESSOS TECNOLÓGICOS SOBRE A ESTABILIDADE DAS AFLATOXINAS

O leite é submetido a inúmeros processos tecnológicos, quer para torná-lo apto para consumo, quer para elaborar derivados. Apesar de o fato de que várias aflatoxinas podem ser encontradas no leite e derivados lácteos, os estudos se restringem quase que exclusivamente no efeito dos processos tecnológicos sobre AFM₁.

O emprego de temperatura pode ser considerado o processo mais comum nos laticínios, pois além de ser utilizado para elaboração de leite fluído (pasteurizado, ultra alta temperatura), é uma etapa obrigatória na elaboração de derivados lácteos. Os resultados ainda são conflitantes quanto ao efeito da temperatura sobre a estabilidade da AFM₁. Alguns trabalhos afirmam que estes não modificam a estabilidade desta micotoxina (BILANDZIC et al., 2014); porém, outros tem observado diminuições das concentrações no leite processado em relação ao leite cru (PEREIRA et al., 2005, CARVAJAL et al, 2003). O emprego de outros tipos de tratamento térmico utilizando temperatura, como cozimento e congelamento, não promovem redução da concentração das aflatoxinas (RAI et al., 2012).

A AFB₁ é resistente a altas temperaturas, cerca de 120°C (FARIAS et al., 2005) e segundo Rustom (1997) a AFB₁ possui temperatura de decomposição alta, variando de 237°C a 306°C.

Além do emprego de temperaturas, outros processos para a obtenção de derivados lácteos já foram avaliados quanto aos efeitos na concentração das micotoxinas. Na elaboração de queijos, Ilha et al. (2013) tem sugerido que devido a maior afinidade da AFM₁ pela fração proteica do leite, a concentração desta aflatoxina é maior no queijo do que no soro de queijo e comparado ao leite empregado na elaboração. Bakirci (2001) constatou que o conteúdo de AFM₁ em amostras de queijo branco e queijo *Kashar* foram maiores do que as encontradas em leite à granel.

Cattaneo et al. (2013) avaliaram soro de leite e soro desproteínizado contaminados com AFM₁ e submetidos a diferentes tratamentos tecnológicos. Quando utilizado na produção de ricota, os autores observaram que 94% da contaminação inicial por AFM₁ permaneceu na parte líquida e 6% na coalhada. O

soro de leite desproteínizado, obtido a partir da produção de ricota, foi submetido a ultrafiltração e a secagem por pulverização, e esses processos proporcionaram reduções de 90% e e perdas de 40%, respectivamente, para soro ultrafiltrado e seco.

A fim de avaliar a ação da fermentação do leite para elaboração de queijo por processo artesanal sobre a contaminação inicial do leite por AFM₁, Lopez et al. (2001) fortificaram o leite com concentrações de AFM₁ entre 1,7 a 2,0 ug.L⁻¹ e observaram que 40% da contaminação inicial permaneceu no queijo e 60% migrou para o soro do leite.

A partir dos estudos acima, é possível evidenciar a estabilidade da AFM₁ perante diferentes processamentos tecnológicos, e a importância do estabelecimento de limites máximos legislados para esta micotoxina também em outros produtos lácteos, que não só leite e queijo.

3.4 BIOACESSIBILIDADE OU BIODISPONIBILIDADE DE AFLATOXINAS EM ALIMENTOS

Bioacessibilidade ou biodisponibilidade são os termos usado para descrever a proporção de contaminante ingerido através de alimentos que atinge a circulação sistêmica, normalmente envolvendo três passos: libertação do composto da sua matriz por ação do suco digestivo no trato digestório (bioacessibilidade), transporte através do epitélio intestinal pela veia porta (transporte intestinal) e degradação do composto no fígado e intestino (metabolismo) (VERSANTVOORT et al., 2005).

A técnica de digestão *in vitro* tem sido largamente utilizada para prever a digestibilidade *in vivo*. Na digestão *in vitro* há algumas variáveis que podem ser controladas, tais como: quantidade de amostra, tempo de fermentação, infusão de nitrogênio e inóculo, espécie animal, tipo de dieta e pH, além das diferenças entre as marchas analíticas adotadas por diversos laboratórios. O método *in vitro* é comumente utilizado pela conveniência ou quando grande escala de testes de alimentos são necessários (CAMPOS et. al., 2000).

Estes parâmetros podem ser utilizados para estudar as mudanças

estruturais, digestibilidade e liberação dos componentes dos alimentos nas condições do trato digestório (HUR et al., 2011), simulando, de forma simplificada, os processos de digestão na boca, no estômago e no intestino delgado, onde a composição química dos fluídos, pH e períodos de incubação específicos para cada etapa, permitindo a investigação da biodisponibilidade de compostos de interesse a partir da sua matriz em curto espaço de tempo (FERREIRA, 2014).

3.5 INTERAÇÃO ENTRE AFLATOXINA E PROTEÍNA DO LEITE

Apesar de alguns estudos enfatizarem que as aflatoxinas ficam ligadas a fração proteica (LOPEZ et al., 2001; CATTANEO et al., 2013; ILHA et al., 2013), nenhum trabalho até então preocupou-se em aplicar técnicas para verificar esta interação. Assim, trabalhos envolvendo o estudo da interação aflatoxina e proteínas do leite não foram encontrados na literatura consultada. Porém, alguns trabalhos estudaram a interação das proteínas do leite com outros compostos empregando diferentes técnicas para tal.

Dentre as técnicas, a análise de calorimetria diferencial de varredura caracteriza-se por ser um método eficiente no estudo de transição de fases e modificações estruturais, especialmente de proteínas, para verificar a interação com componentes de interesse (MOBILI et al., 2009; HU et al., 2009).

Ferraro et al. (2015) empregaram esta técnica para examinar a interação entre ácido rosmarínico e proteínas do soro de leite bovino (α -lactalbumina, β -lactoglobulina e lactoferrina), possível devido aos eventos exotérmicos observados, característico ao fenômeno de agregação.

A análise por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) caracteriza-se por permitir a compreensão dos componentes estruturais e é uma das técnicas mais empregadas na avaliação da interação entre proteínas e diferentes compostos. Nesta técnica, as vibrações de uma unidade estrutural de proteína originam nove bandas de absorção, entre elas a amida A, B e I-VII, onde as mais importantes são amida I e II. A posição do pico da amida I ocorre na região de 1700-1600 cm^{-1} (estiramento da C=O), ao passo que a da amida II na região de 1600-

1500 cm^{-1} (estiramento N-H). Dentre estas, a banda de amida I é mais susceptível de alteração da estrutura secundária da proteína do que a banda Amida II (LIU et al., 2008; KHAN et al., 2008; LI et al., 2013). As principais vantagens dessas técnicas são a rapidez na realização das medidas, o fato de não haver restrições quanto ao peso molecular da proteína em estudo e a não necessidade de cristais (FORATO, et al. 1997). Bourassa et al. (2013) avaliaram a interação entre vitamina A e α e β -caseína do leite sendo constatado que a interação ocorre devido as variações de deslocamento e intensidade do espectro para banda amida I em 1656-1654 cm^{-1} (principalmente no estiramento C=O) e na banda da amida II em 1542 cm^{-1} após a adição da vitamina A na proteína. Essemine et al. (2011) ao avaliarem a ligação entre a β -lactoglobulina com poliaminas observou redução no componente da β -folha após a interação do complexo formado, indicando uma possível desdobração parcial da proteína.

Outra técnica muito empregada na avaliação de interação entre proteína e compostos diversos é espectroscopia de fluorescência. As proteínas contêm triptofano, tirosina e/ou fenilalanina que possuem fluorescência intrínseca ao serem excitados em 285 nm; dentre estes aminoácidos, a emissão é principalmente devido à excitação de resíduos de triptofano, com uma contribuição menor de tirosina e fenilalanina. Zhang e Zhong (2013) avaliaram a interação entre as proteínas do leite (caseína e proteínas do soro) e a norbixina, sendo que após a adição da norbixina nas proteínas a intensidade da fluorescência diminuiu, sugerindo, portanto, a ocorrência da interação.

Outras técnicas podem ser utilizadas para a análise de interação com as proteínas, como Dicroísmo Circular e a Espectroscopia Raman. O dicroísmo circular é uma das mais sensíveis técnicas espectroscópicas para explorar os vários aspectos da proteína, como estrutura, dobragem e propriedades das ligação das proteínas e também a interação com moléculas pequenas (GORJI et al., 2015). O Raman é utilizado para obter uma visão mais profunda sobre as mudanças de conformação (GAO et al., 2011)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAS

Os padrões das micotoxinas AFB₁ e AFM₁, de caseína bovina, as enzimas e os reagentes necessários para a análise de digestibilidade *in vitro* foram adquiridos da *Sigma Chemical Company*[®].

Utilizou-se para o preparo das soluções água ultrapurificada em sistema purificador de água por osmose reversa (Osmose 10 LX, Gehaka, 2010) acoplado a um sistema ultrapurificador de água (Master System P&D TOC, MS 2000, Gehaka). O leite desnatado Ultra Alta Temperatura (UAT) (Frimesa[®], Marechal Cândido Rondon) foi adquirido no comércio local.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo das soluções

O preparo das soluções padrão das micotoxinas AFB₁ e AFM₁ bem como a determinação da concentração destas seguiram o proposto por Scaglioni (2014).

Para a solução da AFB₁, foi dissolvido 1 mg do padrão em 100 mL de solução benzeno:acetoneitrila (98:2, v/v), a partir dessa solução estoque foi fracionado 10 mL em 10 frascos âmbar, evaporados em corrente de N₂ (solução estoque) e armazenado sob temperatura de refrigeração (3^o ± 1^oC).

Quanto ao padrão da AFM₁, 10 µg foram diluídos em 10 mL de solução de benzeno:acetonitrila (98:2), fracionados em 10 frascos âmbar e evaporados em corrente de N₂ (solução estoque) e armazenado sob temperatura refrigeração (3° ± 1°C). As concentrações das soluções de AFB₁ e AFM₁ foram avaliadas em espectrofotômetro (Lambda XLS, PerkinElmer, Waltham), nos comprimentos de onda 360 nm e 350 nm, respectivamente (TRUCKSESS; POHLAND, 2001).

Para avaliar a interação entre as AFB₁ e AFM₁ e as proteínas do leite foram utilizadas solução-tampão fostato-salino (Tabela 1) e leite desnatado.

Tabela 1. Composição da solução tampão fosfato-salino (PBS)

Composição	Concentração (g.L ⁻¹)
NaCl	4,3
KCl	0,1
Na ₂ HPO ₄	0,8
KH ₂ PO ₄	0,1

* Solução 0,08 M, pH 6,7 (ajustado com HCl 0,01 M). Fonte: Hoppner et al. (2004)

O padrão de caseína bovina foi dissolvido na solução-tampão preparada previamente (Tabelas 1), na concentração de 6 g.L⁻¹, homogeneizada em agitador magnético, à temperatura ambiente (25° ± 2°C) por 2 horas, a fim de obter uma solução homogênea.

Após a preparação dos ensaios (solução de caseína e leite desnatado), estas foram contaminadas com a AFB₁. Para tal, utilizou-se o padrão de AFB₁ seco (100 µg), adicionou-se 5 mL de acetonitrila, deixando em banho de ultrassom (ElmasonicP, Elma, Singen) por 10 minutos a temperatura ambiente (25° ± 2°C) para remover completamente a aflatoxina do frasco. A seguir, adicionou-se esta solução gota à gota em 500 mL da solução de caseína bovina e também na amostra de leite desnatado UAT, separadamente, com agitação branda e constante em agitador de mesa (Q.261.1, Quimis, Diadema) por 2 horas, à temperatura ambiente (25° ± 2°C), para assegurar a formação de uma solução homogênea.

Para a os ensaios de caseína bovina e leite desnatado contaminada com AFM₁, utilizou-se o padrão de AFM₁ seco (10 µg), adicionou-se 5 mL de acetonitrila,

deixando em banho de ultrassom (ElmasonicP, Elma, Singen) por 10 minutos, à temperatura ambiente ($25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$), para remover completamente a aflatoxina do frasco. A seguir, adicionou-se esta solução gota à gota em 500 mL da solução de caseína bovina e no leite desnatado, separadamente, com agitação branda e constante em agitador de mesa (Q.261.1, Quimis, Diadema) por 2 horas, à temperatura ambiente ($25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$), para assegurar a formação de uma solução homogênea.

Após a contaminação com as respectivas aflatoxinas, após o tratamento térmico e o processo de digestão *in vitro*, as amostras foram congeladas e liofilizadas (*Bulk Tray Dryer*, Labconco, Kansas) por 24 horas, e posteriormente submetidas às análises.

4.2.2 Tratamento térmico

Para avaliação do efeito do tratamento térmico sobre a concentração das AFB₁ e AFM₁ e sobre a interação destas com as proteínas do leite (solução de caseína bovina e leite desnatado), os ensaios foram submetidos ao tratamento térmico de pasteurização realizado em escala piloto à 72-75°C/15-20" (BRASIL, 2011).

4.2.3 Digestibilidade *in vitro*

Para avaliar o efeito da digestibilidade sobre a interação das AFB₁ e AFM₁ com as proteínas do leite (solução de caseína bovina e leite desnatado), foi adaptado o método proposto por Kabak e Ozbey (2012) e Versantvoort et al. (2005), sumarizada na Figura 3.

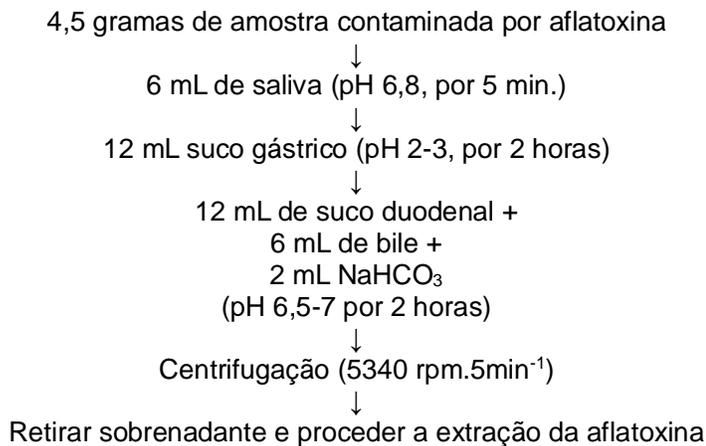


Figura 3 – Representação do modelo de digestão *in vitro*.

Fonte: VERSANTVOORT et al., (2005).

A composição dos sucos digestivos está descrita na Tabela 2. Todas as soluções que mimetizavam os sucos digestivos foram aquecidas a 37°C antes da realização da análise. As soluções orgânicas e inorgânicas tiveram o volume aumentado para 500 mL cada e, a seguir, foram misturadas com os demais compostos que são as enzimas.

Ao final do processo de digestão *in vitro*, os tubos foram centrifugados durante 5 min a 5340 rpm (CT-5000R, Cientec, Belo Horizonte) a 37°C, obtendo-se o sobrenadante no qual foi determinada a concentração das AFB₁ e AFM₁.

A biodisponibilidade/ bioacessibilidade é expressa como a razão entre o nível de concentração de aflatoxinas após a digestão para a concentração total do composto contaminado inicialmente na amostra padrão (KABAK, OZBEY, 2012).

Tabela 2 – Composição dos sucos digestivos empregado no método de digestibilidade *in vitro*.

	Saliva	Suco Gástrico	Suco Duodenal	Suco Bile
Solução Inorgânica	10 mL KCl 89,6 g.L ⁻¹	15,7 mL NaCl 175,3 g.L ⁻¹	40 mL NaCl 175,3 g.L ⁻¹	30 mL NaCl 175,3 g.L ⁻¹
	10 mL KSCN 20 g.L ⁻¹	3,0 mL NaH ₂ PO ₄ 88,8 g.L ⁻¹	40 mL NaHCO ₃ 84,7 g.L ⁻¹	68,3 mL NaHCO ₃ 84,7 g.L ⁻¹
	10 mL NaH ₂ PO ₄ 88,8 g.L ⁻¹	9,2 mL KCl 89,6 g.L ⁻¹	10 mL KH ₂ PO ₄ 8 g.L ⁻¹	4,2 mL KCl 89,6 g.L ⁻¹
	10 mL NaSO ₄ 57 g.L ⁻¹	18 mL CaCl ₂ ·2H ₂ O 22,2 g.L ⁻¹	6,3 mL KCl 89,6 g.L ⁻¹	0,15 mL HCl (37%) g.g ⁻¹
	1,7 mL NaCl 175,3 g.L ⁻¹	10 mL NH ₄ Cl 30,6 g.L ⁻¹	10 mL MgCl ₂ 5 g.L ⁻¹	
Solução Orgânica	20 mL NaHCO ₃ 84,7 g.L ⁻¹	6,5 mL HCl (37%)	0,18 mL HCl (37%)	
		10 mL glicose 65g.L ⁻¹		
		¹ 10 mL ácido glucurônico 2 g.L ⁻¹		
	8 mL ureia 25 g.L ⁻¹	3,4 mL ureia 25 g.L ⁻¹	4 mL úrea 25g.L ⁻¹	10 mL ureia 25 g.L ⁻¹
Demais Compostos	290 mg α-amilase	1 g BSA	9 mL CaCl ₂ ·2H ₂ O 22,2 g.L ⁻¹	30 g bile
	15 mg ácido úrico	2,5 g pepsina	1 g BSA	10 mL CaCl ₂ ·2H ₂ O 22,2 g.L ⁻¹
	25 mg mucina	3 g mucina	9 g pancreatina 1,5 g lipase	1,8 g BSA
pH	6,8±0,2	1,3±0,02	8,1±0,2	8,2±0,2

Fonte: Adaptado de Versantvoort et al., (2005), As soluções orgânicas e inorgânicas foram aumentadas para 500 ml com água destilada. Depois de homogeneizar as soluções orgânicas e inorgânicas, foi adicionado os demais compostos (enzimas) e homogeneizado novamente. Ajustando o pH se necessário.

4.2.4 Quantificação das aflatoxinas

4.2.4.1 Extração, purificação, partição e concentração das aflatoxinas na amostra de leite desnatado e de proteína

Para a extração das AFB₁ e AFM₁ dos ensaios foi adaptado o método de QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*), segundo proposto por Sartori et al. (2015). Este método consiste na adição de 10 mL de hexano, 15 mL de acetonitrila (acidificada com 1% de ácido acético) em 15 mL de amostra contaminada. A seguir, foi agitado em vortex (LS, Logen, Diadema) por 30 segundos, adicionado de 6 g de sulfato de magnésio e 1,5 g de cloreto de sódio, novamente agitado em vortex por 1 minuto e centrifugado por 7 minutos a 3000 rpm (CT-5000R, Cientec, Belo Horizonte) à temperatura ambiente ($25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$). O sobrenadante foi removido, coletado 5 mL da fase purificada e, por fim, evaporado sobre corrente de nitrogênio a 45°C (PRESTES et al., 2011; MICHELANGELO, et al., 2003), utilizando evaporador (TE-019, Tecnal, Piracicaba). Para a quantificação, a amostra seca foi ressuspendida em solução de acetonitrila: metanol: água acidificada a 1% com ácido acético (10:35:55).

Os ensaios de recuperação foram realizado com base nos níveis de fortificação das amostras com aflatoxina AFM₁ 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e para a AFB₁ 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

4.2.4.2 Quantificação por Cromatografia à Líquido de Ultra Alta Eficiência - CLUE

Para a quantificação, foi utilizado cromatógrafo à líquido de ultra alta eficiência (CLUE) acoplado a detector de fluorescência (HPLC - FLD) (*Ionex Corporation, UltiMate 3000, Sunnyvale, EUA*) e os dados foram processados através do *software Chromeleon 7.2*. A fase móvel foi composta por acetonitrila: metanol: água acidificada a 1% com ácido acético (35:10:55 v/v/v), filtrada e desgaseificada antes da sua inclusão no aparelho. As corridas cromatográficas foram realizadas em

coluna de fase inversa C18 *Acclaim* PA 2,5 μM analítica (4,6 x 250 mm), com o fluxo de fase móvel 1,0 mL.min⁻¹ e temperatura da coluna de 35°C. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão foram 360 nm e 450 nm, respectivamente, e o volume de injeção da amostra foi de 20 μL . O tempo da passagem cromatográfica foi de 10 minutos. O tempo de retenção da AFB₁ foi 7,8 minutos e para a AFM₁ 4,9 minutos. O método foi validado a partir da avaliação dos parâmetros linearidade, limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ), porcentagem de recuperação (%R) e desvio padrão relativo percentual (%RSD ou % CV). Todas as quantificações foram realizadas em triplicata.

4.2.5 Espectroscopia na região infra vermelho (FTIR)

Os espectro dos ensaios na região do infravermelho foram obtidos com o FTIR (*Frontier Spectrum 100*, PerkinElmer, Waltham), realizados em triplicata, utilizando o modo de refletância total atenuada (UATR), no intervalo de número de onda de 4000-600 cm⁻¹, com resolução de 4 pontos por cm⁻¹. A amostra de caseína bovina e o leite desnatado contaminados, assim como as puras (controles) previamente preparadas e liofilizadas foram inseridos sobre o leitor do equipamento para caracterização.

Posteriormente ao ajuste das linhas de base espectrais, as estruturas secundárias das proteínas em estudo, na ausência e na presença da AFB₁ ou AFM₁, foram avaliadas por meio da deconvolução da estrutura secundária da proteína, na região de interesse (1700 - 1600 cm⁻¹, correspondente à região da Amida I), com o uso da segunda derivativa dos espectros selecionando o número e posição dos picos. Os ajustes foram feitos com curvas gaussianas, sendo que o cálculo da porcentagem de cada componente da amida I corresponde as áreas relativas dos picos formados na banda em análise, que servem para estimar a fração dos elementos secundários estruturais da molécula proteína (BYLER; SUSI, 1986; KUMOSINSKI; UNRUH, 1996; FORATO et al. 1997; KANAKIS et al., 2011; LI; MA; NGADI, 2013).

4.2.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas foram obtidas por equipamento STA 4000 (*Simultaneous Thermal Analyser, PerkinElmer, Waltham*), com banho de resfriamento acoplado (9100, *Polyscience, Illinois*) acondicionando-se 4,0 mg ($\pm 0,2$ mg) de amostra em porta amostra de alumínio selado, utilizando a razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, de 50 a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ com atmosfera dinâmica de nitrogênio (20 mL min^{-1}), conforme Zhang e Zhong (2013).

Para avaliar a energia gasta na mudança da fase de desnaturação calculou-se a variação da entalpia ($\Delta H\text{ J.g}^{-1}$) através da integração da área do pico.

4.2.7 Espectroscopia de fluorescência

As medidas de espectroscopia de emissão de fluorescência dos ensaios em estado sólido (controle e contaminados com as aflatoxinas em estudo) foram realizados em espectrofluorímetro (RF-5301PC, *Shimadzu, Tóquio, Japão*), utilizando suporte para sólidos. *Slits* de emissão e excitação 1.5/1.5 nm foram utilizados, respectivamente. Os espectros de excitação foram obtidos utilizando 280 nm como comprimento de onda e de emissão entre 200-500 nm. Todas as medidas foram feitas a 25°C (ZHANG; ZHONG, 2013).

4.2.8 Análise estatística

Para avaliar a existência de diferenças significativas entre os tratamentos estudados ao nível de 5% de probabilidade, os resultados obtidos foram submetidos a Análise de Variância ANOVA e Teste Tukey.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO E DA DIGESTIBILIDADE SOBRE A CONCENTRAÇÃO E A INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS DO LEITE E A AFB₁

5.1.1 Quantificação da AFB₁ na amostra de caseína e no leite desnatado UAT

O método foi validado para extração simultânea das AFB₁ e AFM₁ através da estimativa do limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, repetibilidade (desvio padrão relativo - RSD%) e recuperação (%R), conforme proposto pela legislação vigente (BRASIL, 2003).

Para a validação do método no equipamento foram encontrados os seguintes parâmetros: a eluição das AFB₁ ocorreu em torno de 7,8 minutos, com limites de detecção (LOD_i) de 0,3 µg.L⁻¹ e de quantificação (LOQ_i) de 1,0 µg.L⁻¹. Foram utilizados seis níveis para a definição da reta, obtendo a seguinte equação: $y = 96,90x + 0,3929$ ($R^2 = 0,99768$), com faixa de linearidade 1,0 a 350 µg.L⁻¹.

Para a validação do método os ensaios de recuperação foram realizados com base nos níveis de fortificação das amostras AFB₁ com 200 µg.L⁻¹ comparados com o padrão (sem contaminação). Assim, após a contaminação dos ensaios obteve-se limites de detecção (LOD_m) de 0,06 µg.L⁻¹ e de quantificação (LOQ_m) de 0,20 µg.L⁻¹. A porcentagem de recuperação (%R) em média foi 103,9% e o desvio padrão relativo (RSD%) ou coeficiente de variação (%CV) de 1,1 %, onde todos os valores estão de acordo com o proposto por BRASIL (2003).

Após a contaminação com AFB₁, os ensaios de caseína e leite desnatado foram submetidos aos tratamentos de pasteurização e digestão *in vitro*. Após cada etapa, os ensaios foram submetidos a extração da micotoxina e quantificação por cromatografia de alta eficiência (CLUE), gerando cromatogramas de cada etapa (Figura 4 e 5), cujas médias dos resultados de todos os ensaios estão na Tabela 3.

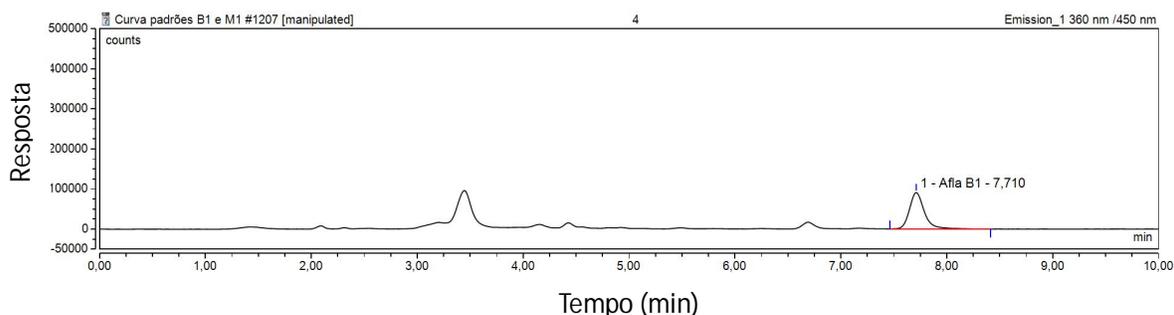


Figura 4 - Cromatograma obtido da quantificação da AFB₁ em amostra de caseína bovina.

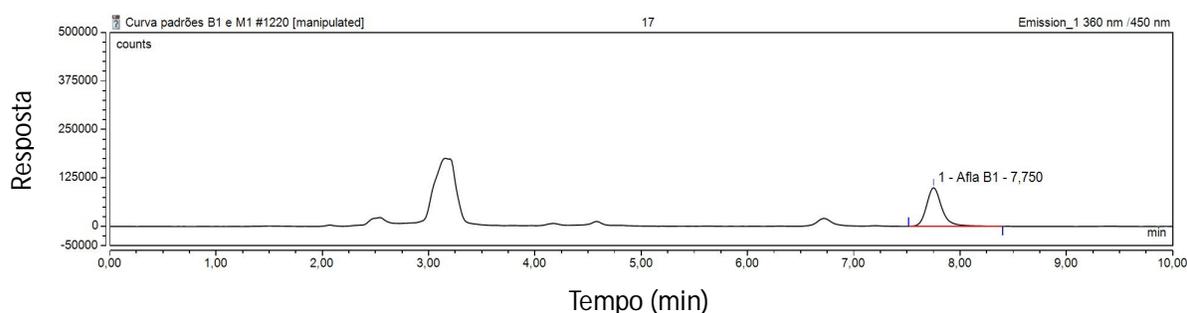


Figura 5 - Cromatograma obtido da quantificação da AFB₁ em amostra de leite desnatado UAT.

Tabela 3 – Quantificação da AFB₁ nas amostras de caseína bovina e de leite desnatado submetidas aos diferentes ensaios.

Ensaio	Caseína bovina	Leite desnatado
Controle ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	000,0 \pm 0,0 ^a	000,0 \pm 0,0 ^a
Adicionada de AFB ₁ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	220,3 \pm 2,2 ^b	208,6 \pm 1,5 ^b
Após pasteurização ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	282,1 \pm 5,1 ^c	210,6 \pm 2,8 ^c
Após digestão <i>in vitro</i> ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	24,7 \pm 1,3 ^d	19,1 \pm 0,9 ^d

a,b,c,d Letras diferentes na mesma coluna indicam haver diferença significativa ($p < 0,05$) entre os ensaios.

Em especial para esta aflatoxina, não foram encontrados estudos sobre a sua estabilidade térmica no leite, uma vez que, até pouco tempo, acreditava-se que toda a AFB₁ era convertida em AFM₁ e que esta é que se encontrava no leite (BRITZI et al., 2013). Estudos tem demonstrado que também pode ser encontrada no leite

(GURBAY et al., 2010; SCAGLIONI et al., 2014) e esse resultado, do ponto de vista da saúde pública, é preocupante uma vez que esta micotoxina possui toxicidade mais elevada que a AFB₁ (BIANCO et al., 2012).

A concentração de AFB₁ não foi reduzida pelo tratamento térmico empregado. No entanto, o resultado já era esperado, pois segundo Rustom (1997) a AFB₁ possui temperatura de decomposição alta, variando de 237°C a 306°C, temperatura essa não empregada nos processos industriais de beneficiamento do leite.

Raters e Matissek (2008) ao avaliarem o efeito do tratamento térmico sobre a estabilidade de AFB₁ em diferentes matrizes alimentícias verificaram que a presença de proteína, no caso oriundo da soja, aumentava o potencial de degradação das aflatoxinas. No entanto, no presente estudo, isso não foi observado; ao contrário, houve um aumento de 28 % e 1 % no teor de AFB₁ na amostra de caseína bovina e no leite desnatado, respectivamente, após a pasteurização. É importante enfatizar que o nível inicial de contaminação, o binômio tempo-temperatura, o nível de penetração do calor, associado ao teor de umidade, pH e força iônica do alimento, entre outros fatores, ocupam um importante papel no nível e extensão de degradação de micotoxinas (KABAK, 2008). Além, do mais, isso pode ter acontecido devido ao efeito denominado de “micotoxinas derivadas”, que pode ser definida como àquele grupo de micotoxinas que por se associarem a compostos presentes na matriz alimentícia não são extraídas pelas técnicas tradicionais (STOEV, 2015). Com o tratamento térmico, pode ter ocorrido modificação estrutural das proteínas, reduzindo a ligação com a AFB₁ e, por conseguinte, favorecendo o processo de extração, reforçando a possível interação aflatoxina-proteína do leite. Ainda, mesmo que o efeito matriz não tenha sido significativo ($p > 0,05$), pode ter havido um certo efeito da matriz que influenciou no resultado obtido.

Em relação à bioacessibilidade, que pode ser definida como a fração de um composto que é liberada da matriz alimentícia no trato digestório e que então torna-se passível de ser absorvida pelo intestino (FERNÁNDEZ; CARVAJAL; PÉREZ, 2009), os tratamentos apresentaram valores na ordem de 91,2% para amostra de caseína bovina e 90,9% para o leite desnatado, ambos contaminados com AFB₁, respectivamente. O remanescente possivelmente está ligado a fração proteica dos ensaios. Resultados semelhantes foram encontrados por Versantvoort et al. (2005) e

Kabak et al. (2009), que obtiveram 85,1-98,1% de bioassibilidade para AFB₁ em diversas matrizes alimentares empregando o mesmo modelo de digestão *in vitro*.

5.1.2 Análise de Infravermelho transformada de *Fourier* (FTIR) para avaliar a interação da AFB₁ na caseína bovina e no leite desnatado

Para a análise de FTIR foram obtidos espectros normalizados na região 4000-500 cm⁻¹ (Figura 6) para as amostras contaminadas com AFB₁.

Ao comparar os espectros obtidos para amostra de caseína bovina (Figura 6a) com caseína adicionada de AFB₁ antes (Figura 6 b) e após o tratamento térmico (Figura 6c) verifica-se que houve um efeito hipocrômico para amida I e deslocamento da banda referente a amida II, sugerindo a ocorrência de uma possível interação entre caseína bovina e a aflatoxina em estudo do tipo não covalente (FERRARO et al., 2015)

Contudo, tendo em vista a estrutura das micelas, interações hidrofóbicas com ligantes são esperadas. Sendo assim, ao avaliar o deslocamento da banda na região CH (2800-3000 cm⁻¹) foi observado um efeito hipsocrômico após a adição da AFB₁ (Figura 6a) quando comparado a amostra pura de caseína bovina (Figura 6b).

Zhang e Zhong (2013), ao avaliarem a ocorrência de interação entre caseína e norbixina observaram deslocamento do pico da amida I em 1633 cm⁻¹ para 1627 cm⁻¹ e a amida II em 1578 cm⁻¹ para 1596 cm⁻¹.

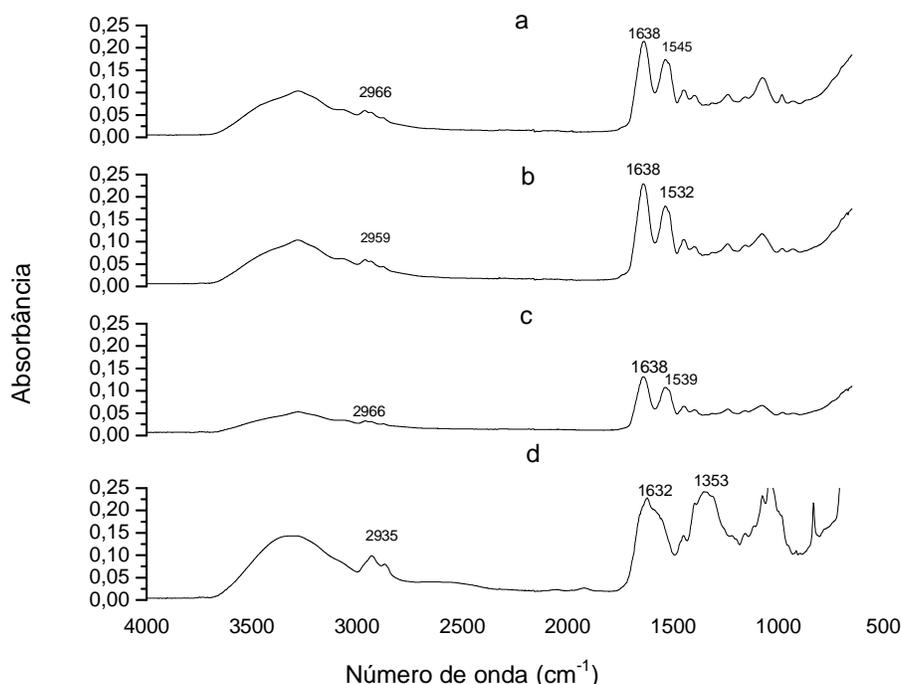
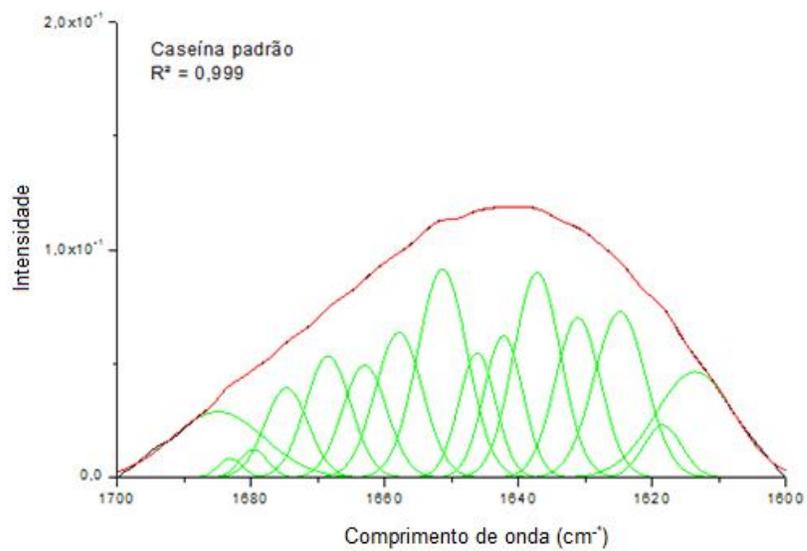


Figura 6 – Análise de FTIR das amostras de caseína bovina (a), caseína bovina contaminada com AFB₁ antes do tratamento térmico (b), após o tratamento térmico (c) e após a digestão *in vitro* (d).

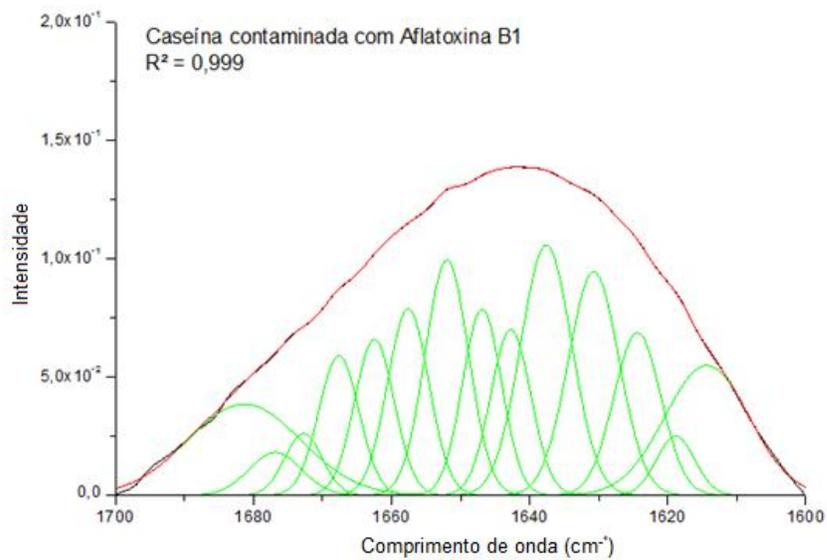
Após a digestão *in vitro* (Figura 6.d) houve um efeito hipocrômico na região 1636 – 1031 e um aumento da concentração das bandas associadas com N-H e C-O, provavelmente associado a decomposição da proteína no processo de digestão *in vitro* (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

As duas bandas de vibração mais proeminentes do esqueleto da proteína são a amida I e II. A banda amida I abrange a região espectral 1600-1700 cm⁻¹ que corresponde ao estiramento C=O de ligações peptídicas. A banda amida II decorre, principalmente, no plano de flexão NH e vibração de alongamento CN. Comparativamente, a banda amida I mostra muito mais sensibilidade conformacional proteica do que o seu homólogo amida II (região espectral 1600-1500 cm⁻¹) (KONG; YU, 2007). Sendo assim, para reforçar o estudo da interação entre a AFB₁ e a fração proteica do leite (caseína bovina e leite desnatado), os resultados da análise da estrutura secundária obtidas da Figura 7 estão listados na Tabela 4.

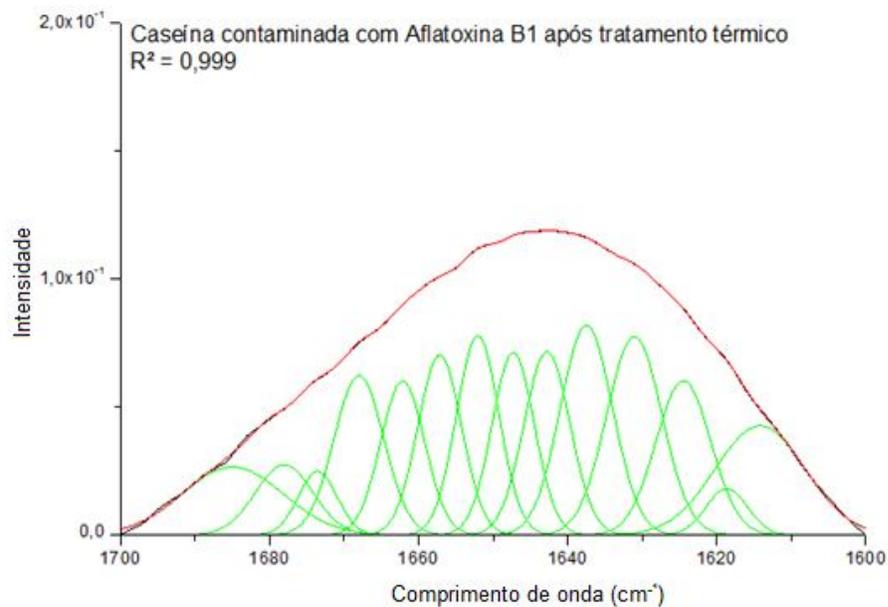
a)



b)



c)



d)

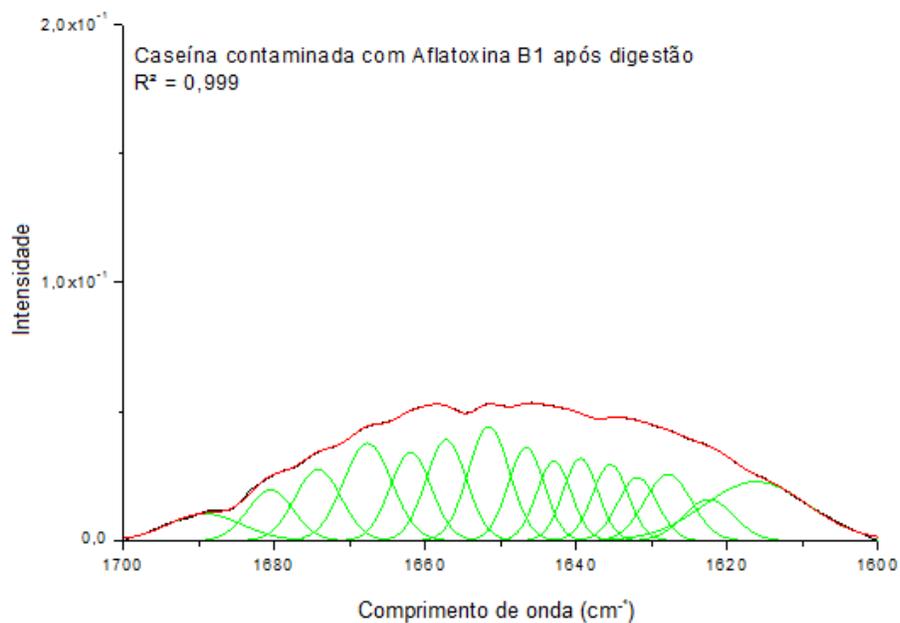


Figura 7 – Análise de deconvolução das estruturas secundárias obtidas do FTIR das amostras de caseína bovina (a), caseína bovina contaminada com AFB₁ (b), caseína bovina contaminada com AFB₁ após tratamento térmico (c) e caseína bovina contaminada com AFB₁ após digestão (d).

Tabela 4 – Análise das estruturas secundárias da caseína contaminada com AFB₁ em diferentes processos

Componentes amida I (cm ⁻¹)	Caseína pura (%)	Caseína com AFB ₁ (%)	Caseína com AFB ₁ pasteurizada (%)	Caseína com AFB ₁ após a digestão (%)
β-folha (1638-1612)	41,9±3,6 ^a	39,5±3,5 ^a	37,6±4,3 ^a	35,2±3,0 ^a
Randômicas (1648-1641)	17,8±1,1 ^a	17,5±3,7 ^a	17,5±1,6 ^a	18,6±2,4 ^a
α-hélice (1658-1653)	16,2±3,6 ^a	15,8±2,0 ^a	15,2±2,8 ^a	17,5±0,1 ^a
β-volta (1678-1662)	16,1±2,3 ^a	22,1±3,9 ^a	26,0±3,7 ^a	21,1±2,0 ^a
β-anti (1691-1682)	7,7±0,6 ^a	4,9±2,9 ^a	3,5±3,3 ^a	7,4±1,4 ^a

^a. Letras iguais na mesma linha representam que não houve diferença significativa (p < 0,05, Teste Tukey).

Avaliando quantitativamente as estruturas secundárias da caseína (Tabela 4), embora não houve diferença significativa nos componentes da amida I comparando os processo (p > 0,05), percebe-se que após a adição da AFB₁ na amostra de caseína bovina as principais mudanças ocorreram nas estruturas β-volta, β-anti e β-folha (16,1±2% para 22,1±3,9%, 7,7±0,6% para 4,9±2,9% e 41,9±3,6% para 39,5±3,5%, respectivamente), assim como após o tratamento térmico (26,0±3,7%, 3,5±3,3% e 37,6±4,3% respectivamente) indicando uma possível interação da AFB₁ com a proteína nessa região da amida I.

Estes resultados são consistentes com os estudos espectroscópicos realizado por Bourassa et al. (2013) que avaliaram a ligação da vitamina A com α e β- caseína, e verificaram que após a adição do retinol às caseínas houve modificação na concentração da β-anti sugerindo a formação o complexo caseína-retinol.

Para verificar a interação entre a AFB₁ e as proteínas presentes no leite desnatado frente a cada processo submetido, foram obtidos espectros normalizados na região 4000-500 cm⁻¹ (Figura 8)

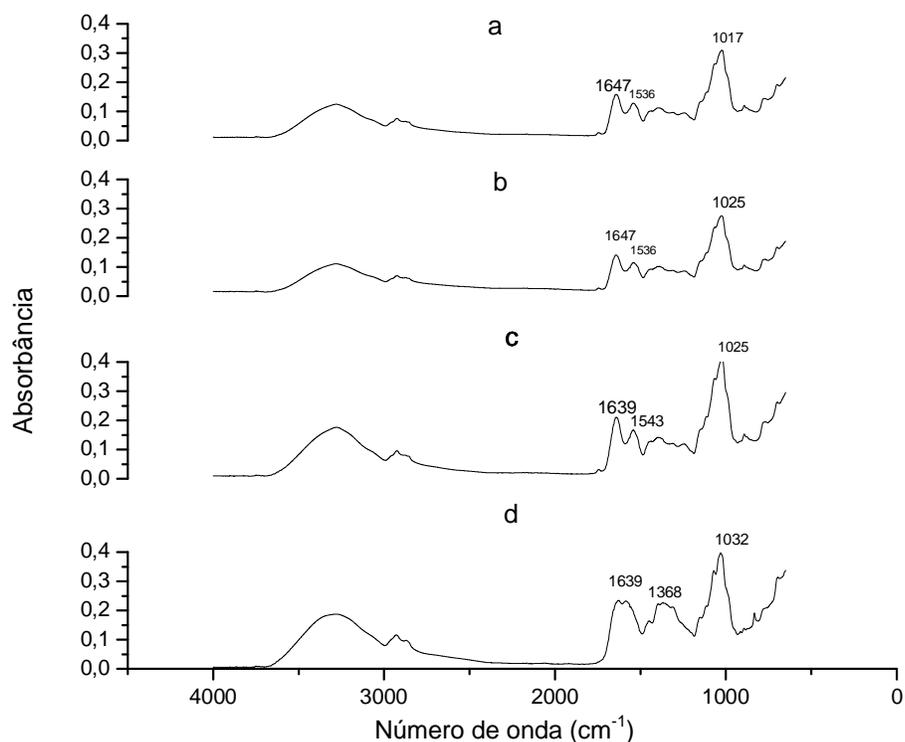


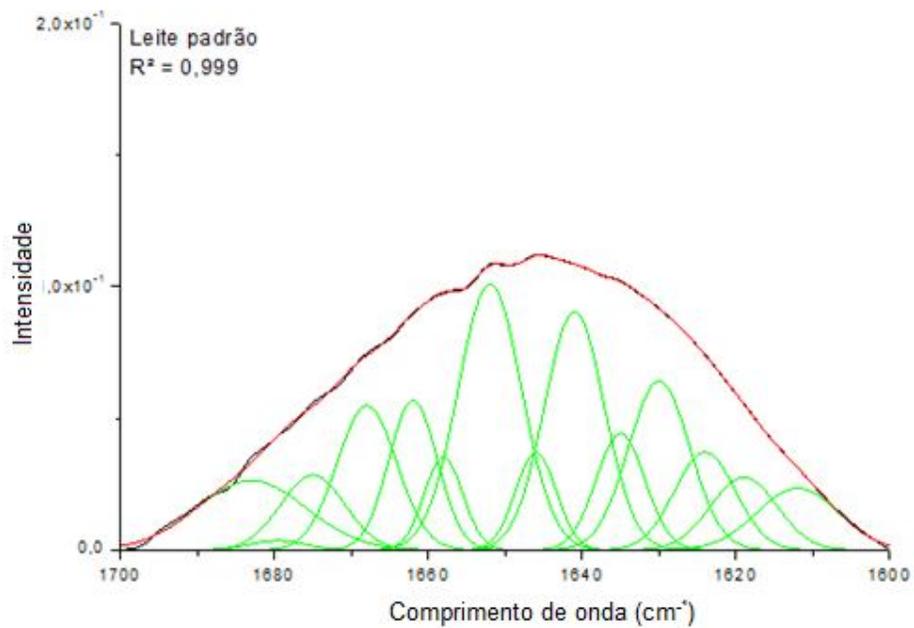
Figura 8 – Análise de FTIR do leite (a), do leite contaminado com AFB₁ antes do tratamento térmico (b), após o tratamento térmico (c) e após a digestão *in vitro* (d).

As proteínas do leite são formadas por caseína (maior parte) e proteínas de soro em menor quantidade (CAMPGNOLLO et al., 2016), devida a essa composição entre as amostras de leite e caseína é esperado que os resultados não sejam semelhantes.

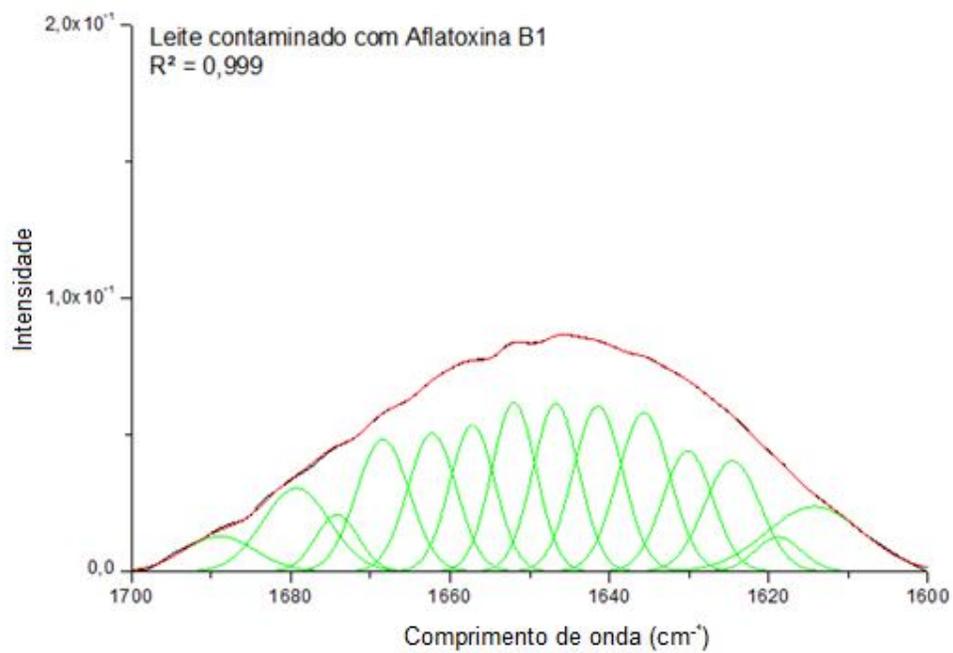
Após o tratamento térmico (Figura 8.c) verifica-se que houve um efeito hipocrômico para amida I e deslocamento da banda referente a amida II, sugerindo a ocorrência de uma possível interação entre o leite (Figura 8.a) e a aflatoxina em estudo. Após a digestão *in vitro* (Figura 8.d) observa-se um efeito hipocrômico nos picos formado na região de 1639-1032, correspondem aos compostos orgânicos N-H e C-O (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009), produtos resultantes da digestão e degradação da proteína.

Sendo assim, para reforçar o estudo da interação entre a AFB₁ e a fração proteica do leite (caseína bovina e leite desnatado), os resultados da análise da estrutura secundária obtidas da Figura 9 estão listados na Tabela 5.

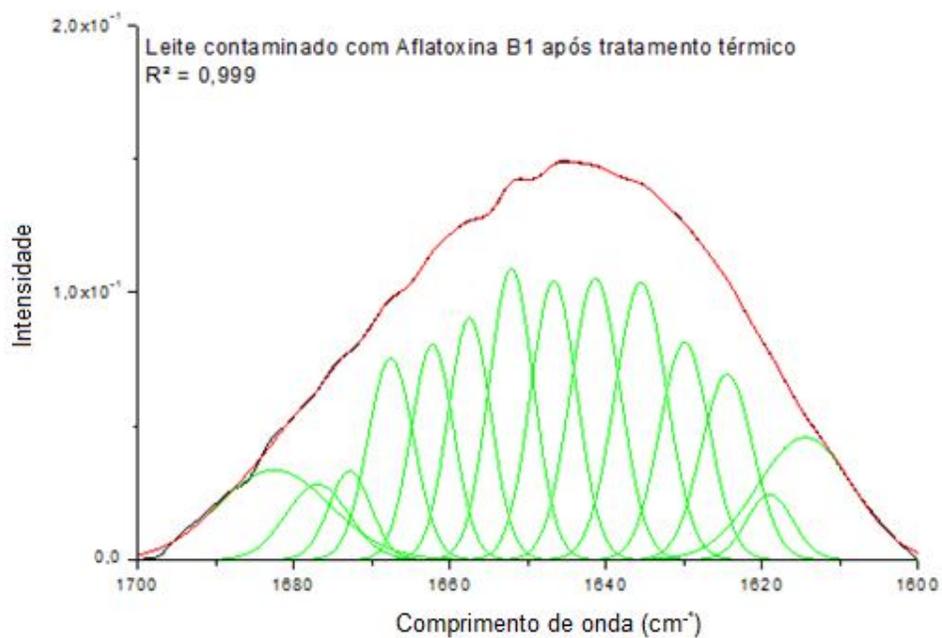
a)



b)



c)



d)

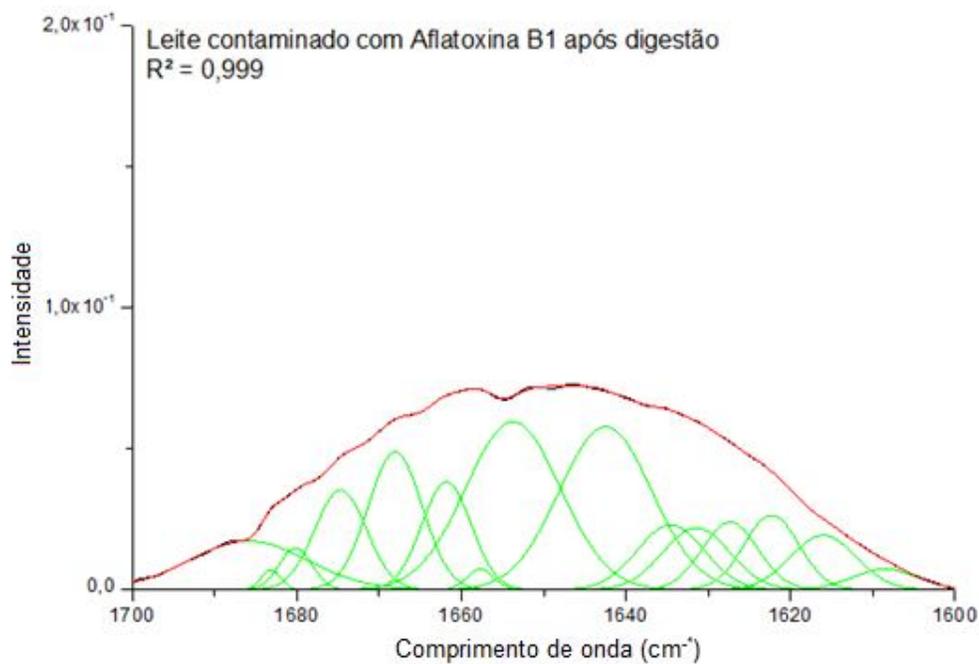


Figura 9– Análise de deconvolução das estruturas secundárias obtidas do FTIR do leite desnatado (a), contaminado com AFB₁ (b), após tratamento térmico (c) e após digestão (d).

Tabela 5 – Análise das estruturas secundárias do leite desnatado contaminada com AFB₁ em diferentes processos

Componentes amida I (cm-1)	Leite puro (%)	Leite com AFB₁ (%)	Leite com AFB₁ pasteurizada (%)	Leite com AFB₁ após a digestão (%)
β-folha (1638–1612)	34,7±2,4 ^a	33,0±1,7 ^a	36,2±1,9 ^b	28,0±3,1 ^c
Randômicas (1648–1641)	19,7±3,7 ^a	19,3±0,1 ^a	19,03±2,6 ^a	19,5±2,0 ^a
α-hélice (1658–1653)	16,5±0,5 ^a	17,8±1,0 ^a	15,6±2,4 ^a	17,8±3,7 ^a
β-volta (1678–1662)	21,0±0,4 ^a	21,3±2,5 ^a	26,5±2,1 ^a	23,2±1,2 ^a
β-anti (1691–1682)	7,9±0,2 ^a	8,5±1,8 ^a	2,4±3,0 ^b	11,0±2,5 ^a

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p < 0,05$, Teste Tukey).

Como na avaliação entre a AFB₁ e amostra de caseína bovina, no leite desnatado também as principais mudanças nas estruturas secundárias da proteína, em todos os processos submetidos, ocorreram com os componentes β-folha, β-anti com diferenças significativas ($p < 0,05$).

Hu et al. (2016) ao investigar e comparar a morfologia e estrutura da α-caseína, aplicando pressão hidrostática elevada, ultra violeta e infra vermelho, também perceberam mudanças ocorridas na estrutura β perante tratamento empregado. Possivelmente, esta estrutura seja mais sensível e proeminente do que as demais, portanto susceptível a interação com as aflatoxinas.

As modificações estruturais das proteínas do leite podem estar associadas aos resultados obtidos na quantificação das micotoxinas em estudo, que demonstraram maior concentração após o tratamento térmico quando comparado ao ensaio sem tratamento térmico, ou seja, interações mais facilmente rompidas pelo método de extração em estudo.

5.1.3 Análise de DSC em amostras de caseína e no leite desnatado contaminados com AFB₁

Os ensaios de caseína bovina e leite desnatado, submetidos aos diferentes processos, foram submetidos à análise de DSC originando picos exotérmicos (Figura 10), e os resultados encontram-se na Tabela 6, onde t_i é a temperatura em que iniciou a formação do pico, T_p a temperatura do pico e ΔH (variação da entalpia).

Tabela 6 – Análise de DSC dos ensaios de caseína bovina e leite desnatado contaminadas com AFB₁ e submetidas aos processos de tratamento térmico e digestão *in vitro*.

Amostra	t_i (°C)	T_p (°C)	ΔH (J.g ⁻¹)	Amostra	t_i (°C)	T_p (°C)	ΔH (J.g ⁻¹)
Caseína padrão	-149,2	-165,9	-15,39	Leite padrão	-168,9	-175,1	-8,81
Caseína contaminada com AFB ₁	-124,9	-158,7	-16,98	Leite contaminado com AFB ₁	-161,3	-172,9	-9,89
Caseína contaminada com AFB ₁ após o tratamento térmico	-139,1	-155,1	-14,92	Leite contaminado com AFB ₁ após o tratamento térmico	-185,2	-188,9	-7,58
Caseína contaminada com AFB ₁ após a digestão	-163,8	-166,7	-14,98	Leite contaminado com AFB ₁ após a digestão	-124,7	-127,7	-7,79

Nota: t_i temperatura em que iniciou a formação do pico, T_p temperatura de pico e ΔH é variação da entalpia de desnaturação.

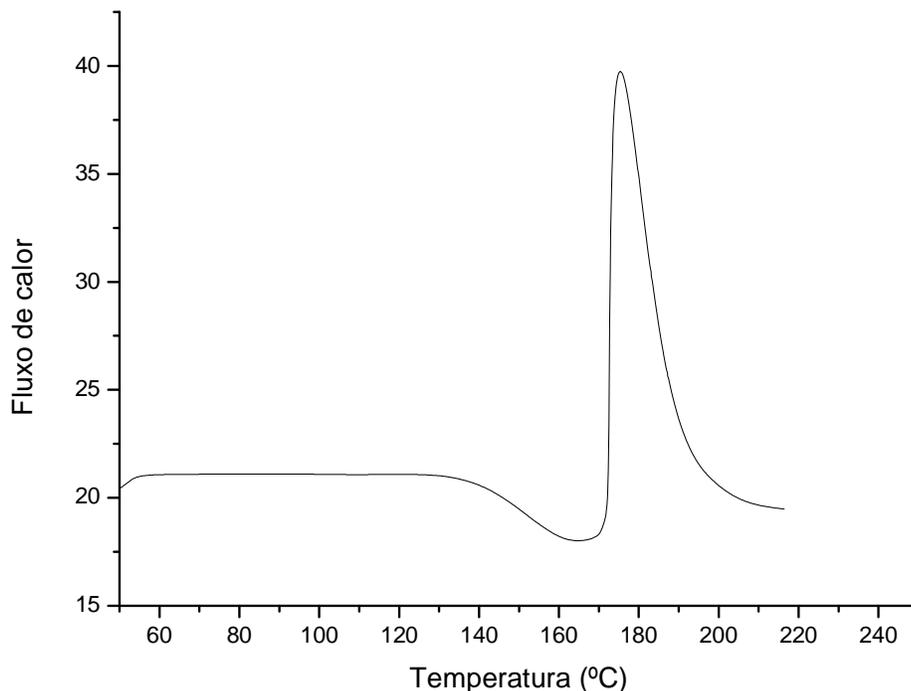


Figura 10 – Pico exotérmico da análise de DSC da amostra de leite UAT desnatado.

Em todos os ensaios realizados foram obtidos picos exotérmicos similarmente aos resultados encontrados por Fitzsimons et al. (2003).

Para o padrão de caseína bovina e leite desnatado a temperatura do pico foi de 165,9 e 175,1°C, respectivamente. Ferraro et al. (2015) ao estudarem a interação entre as proteínas do soro bovino e ácido rosmarínico, observaram eventos exotérmicos em temperaturas acima de 100°C, provavelmente devido as alterações nas ligações dissulfeto, aumentando a reatividade proteínas.

A variação de entalpia (ΔH) foi de 15,39 J.g⁻¹ para caseína e 8,81 J.g⁻¹ para o leite. Noisuwan et. al. (2008), por sua vez, obtiveram variação de entalpia (ΔH) para leite em pó desnatado de 13,94 – 14,05 J.g⁻¹ e para concentrado de proteína do leite 13,00 – 13,55 J.g⁻¹.

Para ambos os ensaios, houve uma maior variação de entalpia (ΔH) após a adição da AFB₁, sendo necessária uma maior quantidade de energia para ocorrer o pico (16,98 J.g⁻¹ para caseína bovina e 9,89 J.g⁻¹ para leite), o que pode estar associada ao complexo formado entre a aflatoxina-proteína. Marinho et al. (2015) obtiveram um maior valor de ΔH para àqueles queijos adicionados de alecrim

quando comparado ao sem adição, sugerindo que poderia ter ocorrido interações estruturais entre antioxidantes e a proteína do leite.

Após a pasteurização houve uma redução na variação de entalpia passando para 14,92 J.g⁻¹ para a caseína e 7,58 J.g⁻¹ para o leite desnatado. E após a digestão *in vitro*, ambos tratamentos obtiveram uma variação de entalpia próximos a estrutura original, 14,98 J.g⁻¹ para a caseína e 7,79 J.g⁻¹ para o leite, podendo estar correlacionado com a baixa concentração de AFB₁ conforme constatado no item 5.1.1.

5.1.4 Análise de espectroscopia de fluorescência em amostras de caseína e no leite desnatado UAT contaminados com AFB₁

Devido à sensibilidade da fluorescência intrínseca para as alterações do microambiente em torno das proteínas, a análise de fluorescência fornece informações únicas sobre as interações entre as pequenas moléculas e as proteínas. Quando a proteína é estimulada em 285 nm, a emissão de fluorescência é principalmente devido à excitação de resíduos de triptofano (ZHANG; ZHONG, 2013) e as aflatoxinas possuem fluorescência natural (CIGIĆ; PROSEN, 2009). Logo, é possível utilizar a fluorescência para estudar o complexo formado entre a aflatoxinas-proteínas.

Os resultados referentes aos espectros de fluorescência AFB₁ entre a caseína bovina e leite desnatado estão representados nas Figuras 11 e 12, respectivamente. É possível verificar que a maior intensidade deve-se os ensaios antes da adição de AFLB₁. Com a adição da AFB₁, houve redução da fluorescência, similarmente aos resultados encontrados por Zhang e Zhong (2013) ao avaliarem as proteínas do soro e a caseína na presença e na ausência de norbixina, sugerindo que a complexação entre a proteína láctea-norbixina reduziu a fluorescência.

Gorji et al. (2015) avaliaram as interações intermoleculares entre resveratrol e proteínas do leite e verificaram desvio do pico no máximo de emissão para comprimentos de onda mais longos e uma diminuição do valor máximo da intensidade de fluorescência.

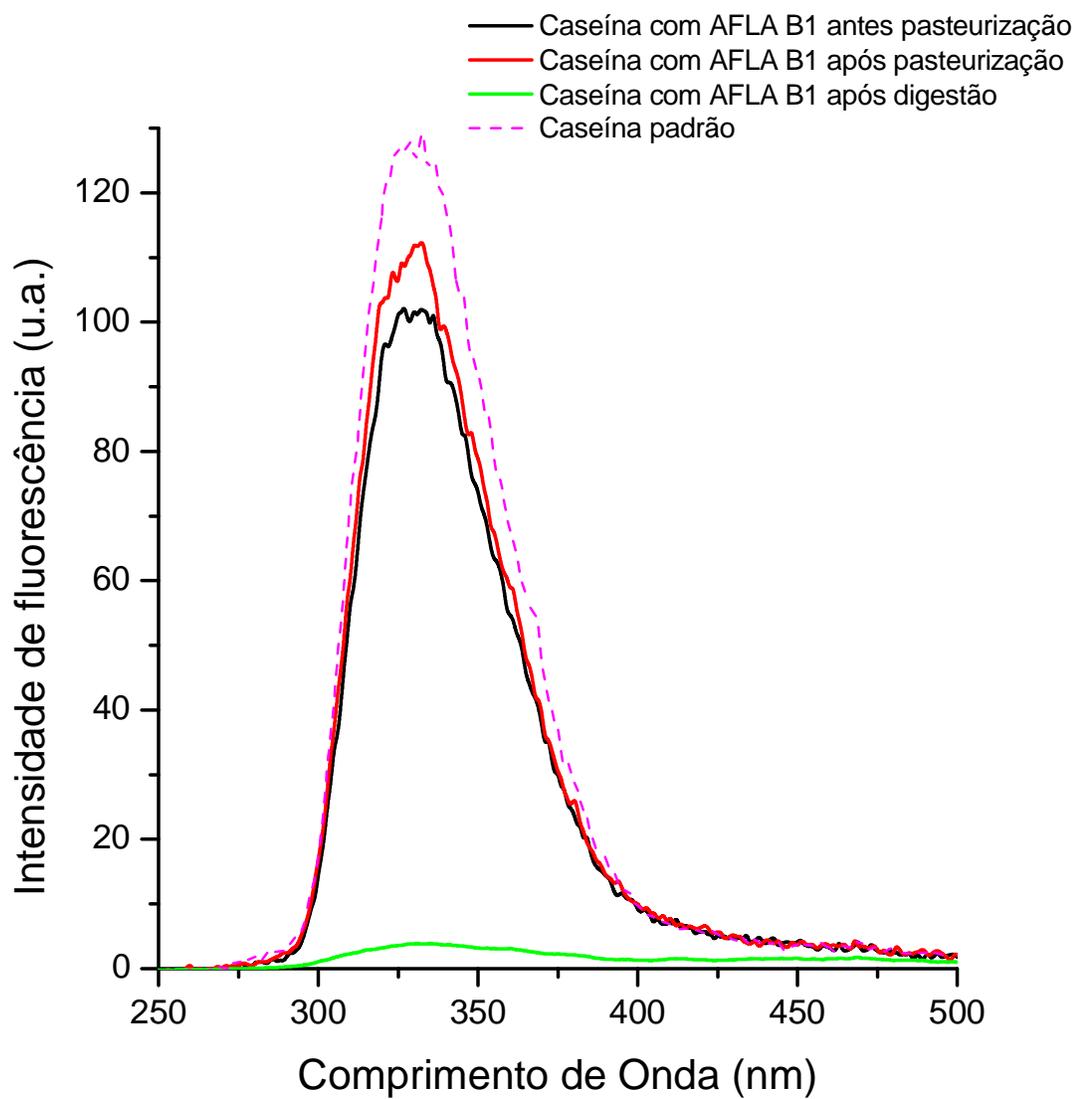


Figura 11. Espectro de emissão de fluorescência no estado sólido dos ensaios de padrão de caseína, contaminada com AFB₁, após a pasteurização e após digestão *in vitro*

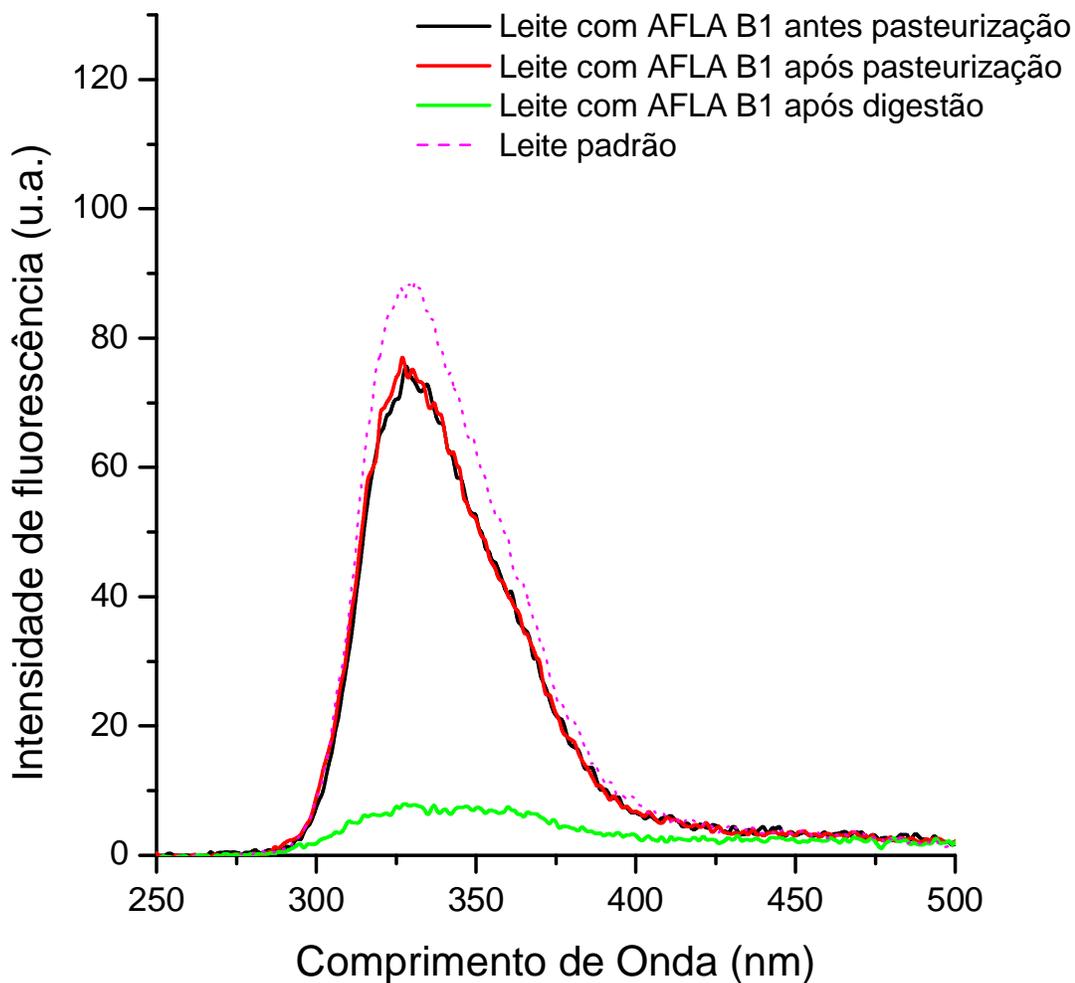


Figura 12. Espectro de emissão de fluorescência no estado sólido dos ensaios de padrão de leite, contaminado com AFB₁, após a pasteurização e após digestão *in vitro*

Segundo ZAMORA (2003), as caseínas são digeridas em torno de 98%; assim a intensidade de fluorescência detectada após a digestão *in vitro* pode ser da AFB₁ remanescente, visto que estas também emitem fluorescência (RATERS; MATISSEK, 2008; MAFANI et al., 2015).

5.2 EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO E DA DIGESTIBILIDADE SOBRE A CONCENTRAÇÃO E A INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS DO LEITE E A AFM₁

5.2.1 Quantificação da AFM₁ na amostra de caseína e no leite desnatado

O método foi validado para extração de AFM₁ e AFB₁ através da estimativa do limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, repetibilidade (desvio padrão relativo - RSD%) e recuperação (%R), conforme proposto pela legislação vigente (BRASIL, 2003).

Para a validação do método no equipamento foram encontrados os seguintes parâmetros: a eluição das AFM₁ ocorreu em 4,9 minutos, com limites de detecção (LOD_i) de 0,10 µg.L⁻¹ e de quantificação (LOQ_i) de 0,30 µg.L⁻¹. Foram utilizados seis níveis para a definição da reta a equações: $y = 225,7291 x - 24,7127$ ($R^2 = 0,99964$), com faixa de linearidade de 0,3 – 20 µg.L⁻¹

Para a validação do método os ensaios de recuperação foram realizados com base nos níveis de fortificação das amostras (AFM₁ 20µg.L⁻¹) comparados com o padrão (sem contaminação). Assim, após a contaminação dos ensaios obteve-se limites de detecção (LOD_m) para as AFM₁ de 0,02 µg.L⁻¹, tendo limites de quantificação (LOQ_m) de 0,06 µg.L⁻¹. A porcentagem de recuperação (%R) foi em média 84,8% e o desvio padrão relativo (RSD%) ou coeficiente de variação (%CV) de 18,3%, todos os valores estão de acordo com o proposto por BRASIL (2003).

Após a contaminação com AFM₁ os ensaios de caseína bovina e leite desnatado foram submetidas aos tratamentos de pasteurização e digestão *in vitro*. Após cada etapa, os ensaios foram submetidas a extração da micotoxina e quantificação por cromatografia de alta eficiência (CLUE-UHPLC), gerando cromatogramas para cada etapa (Figura 13 e 14), cujas médias dos resultados de todos os ensaios estão na Tabela 7.

Tabela 7 – Quantificação das AFM₁ no leite desnatado e nas soluções de caseína submetidos aos diferentes processos.

Ensaio	Caseína bovina	Leite desnatado
Controle (μL^{-1})	0 ± 0^a	0 ± 0^a
Adicionada de AFM ₁ (μL^{-1})	$17,6 \pm 1,9^b$	$16,8 \pm 0,7^b$
Após pasteurização (μL^{-1})	$19,3 \pm 1,6^b$	$18,5 \pm 1,5^b$
Após digestão <i>in vitro</i> (μL^{-1})	$5,7 \pm 0,7^c$	$5,62 \pm 0,3^c$

a,b,c Letras diferentes, na mesma coluna, representam diferença significativa ($p < 0,05$ Teste Tukey).

Após a pasteurização, os valores de AFM₁ aumentaram em 10,3% e 9,1%, respectivamente, similar aos resultados obtidos para AFB₁, possivelmente pela ocorrência de micotoxinas derivadas. O grupo de micotoxinas derivadas inclui ambas as variedades conjugadas ligadas e não extraíveis. Estas não são diretamente acessíveis e devem ser libertadas ou separadas da matriz através de tratamento químico antes das análises químicas ou enzimáticas para assim serem analisadas (BERTHILLER et al., 2013).

Após a digestão *in vitro*, a bioacessibilidade da AFM₁ na amostra de caseína bovina foi de 70,5% e para amostra de leite desnatado de 69,7%, resultados estes inferiores aos obtidos por Kabak e Ozbey, (2012) que obtiveram um valor de bioacessibilidade de 80,5-83,8% para leite e produtos lácteos, respectivamente. O remanescente das contaminações pode estar ligada ao complexo aflatoxina-caseína e ainda sendo uma grande preocupação sobre a segurança dos alimentos, porque eles são persistentes nos produtos lácteos (BIANCO et al., 2012).

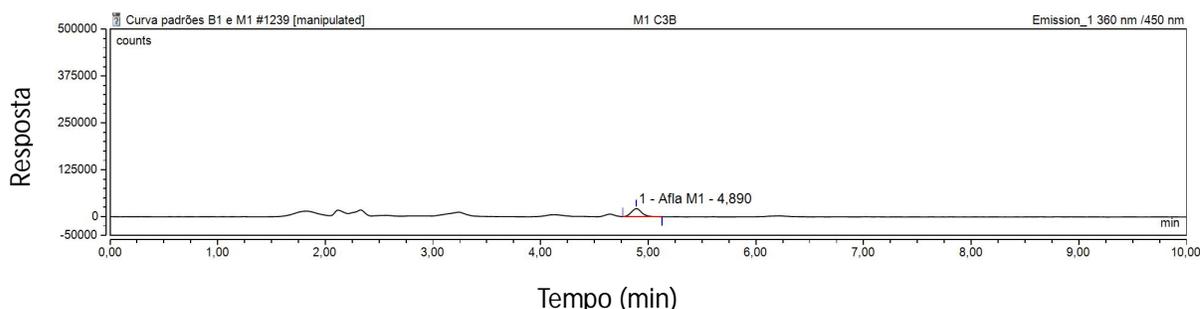


Figura 13 - Cromatograma obtido da quantificação da AFM₁ em amostra de caseína bovina após a contaminação

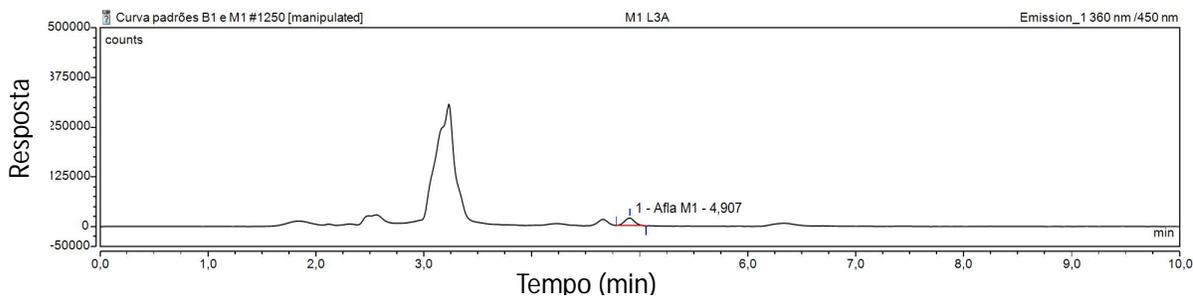


Figura 14 - Cromatograma obtido da quantificação da AFM₁ em amostra de leite desnatado.

5.2.2 Análise de FTIR para avaliar a interação da AFM₁ na amostra de caseína e no leite desnatado UAT

Para a análise de FTIR dos ensaios contaminadas com AFM₁, também foram obtidos espectros normalizados na região 4000-500cm⁻¹ (Figura 15).

Após a adição da AFM₁ (Figura 15.b) nos ensaios houve um aumento da intensidade na região da β -folha (1638–1612) em relação aos componentes da Amida I quando comparado com a estrutura padrão (Figura 15.a), sugerindo uma interação entre a aflatoxina-proteína. Zhang et al. (2014), avaliou a interação entre a caseína e ácido fólico, também sugerindo a existência de uma interação de caráter hidrofóbico muito importante para a ligação caseína-ácido fólico.

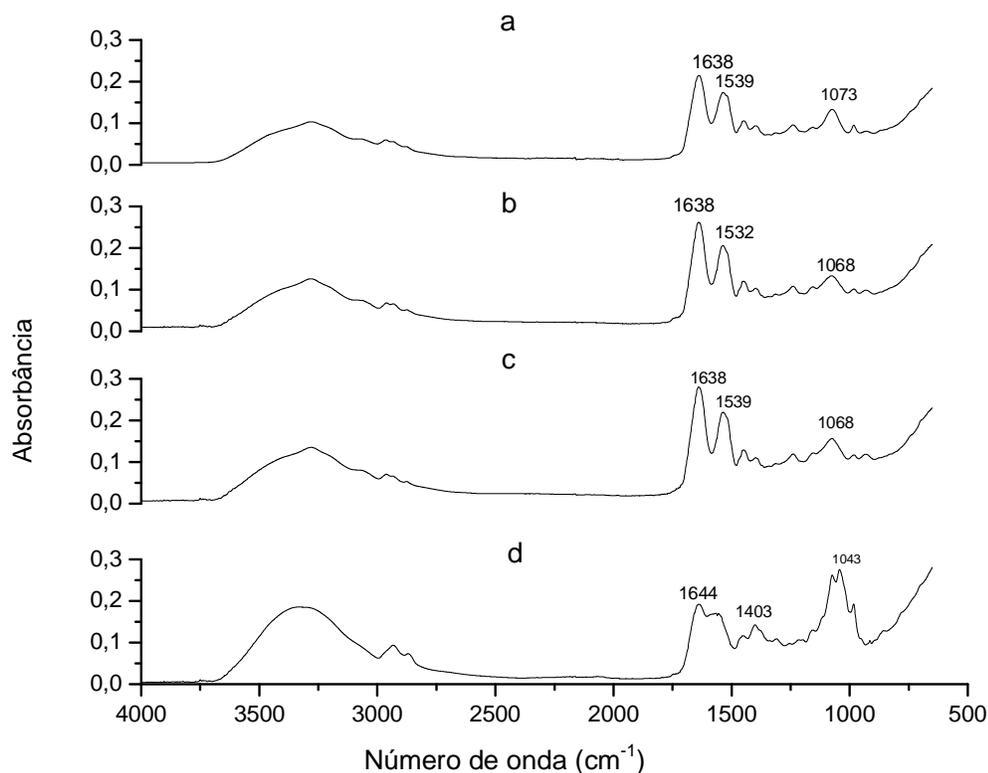


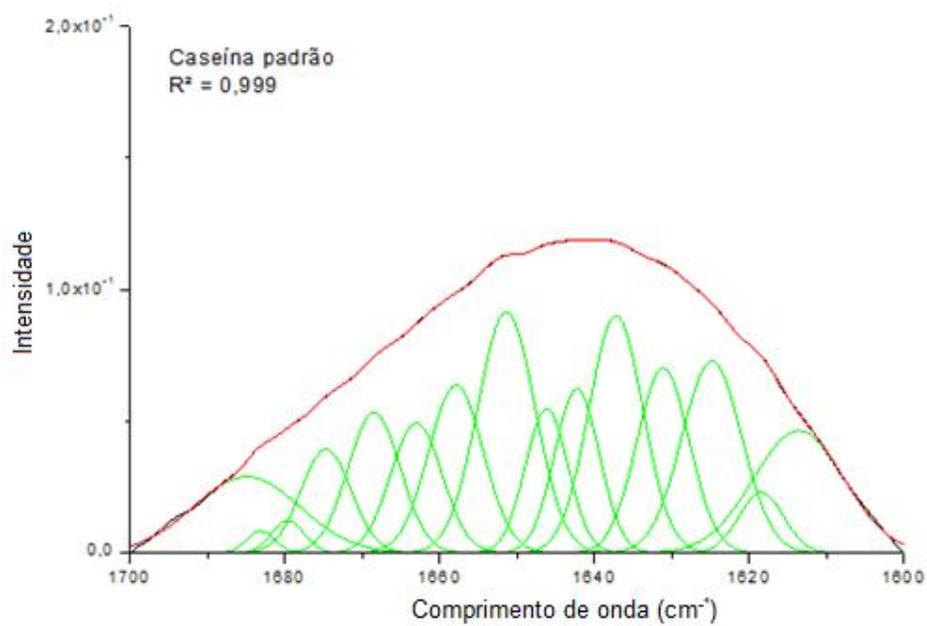
Figura 15 Análise de FTIR da caseína bovina (a), caseína bovina contaminada com AFM1 antes do tratamento térmico (b), após o tratamento térmico (c) e após a digestão *in vitro* (d).

Após o tratamento térmico (Figura 15.c) não houve grandes diferenças quando comparado com a estrutura padrão. Porém o espectro realizados após a digestão *in vitro* (Figura 15.d), percebe-se deslocamento e na intensidade dos picos da região da amida I e na região CH (2800-3000 cm^{-1}).

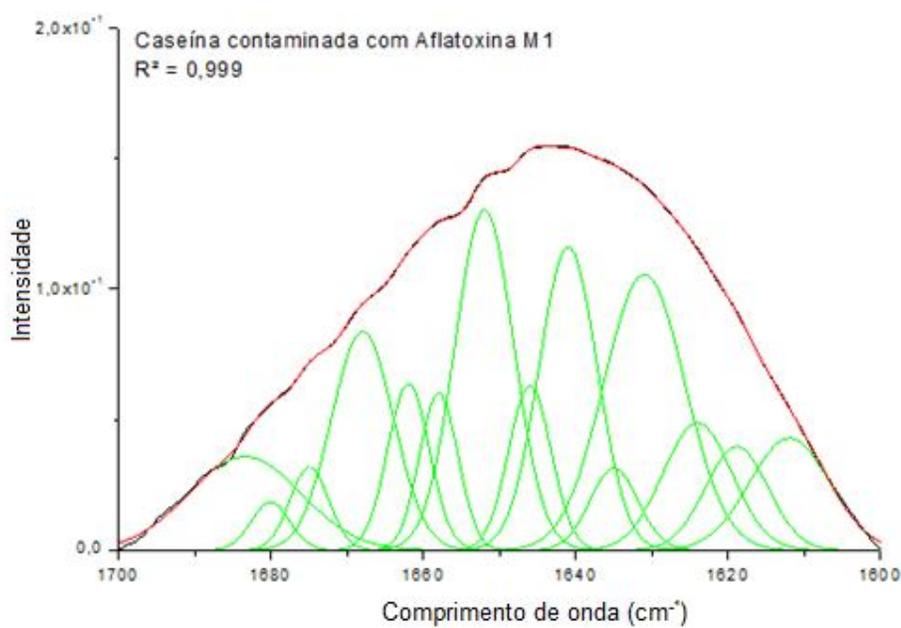
Também foi observado um efeito hipocrômico nos picos formado na região de 1644-1032, correspondem aos compostos orgânicos N-H e C-O (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009), produtos resultantes da digestão e degradação da proteína.

Ainda, para reforçar o estudo da interação entre a AFM₁ e as proteínas do leite (caseína bovina e leite desnatado) frente a cada processo submetido, utilizou-se a análise da estrutura secundária, sendo a partir da Figura 16 foram obtidos os resultados da Tabela 8.

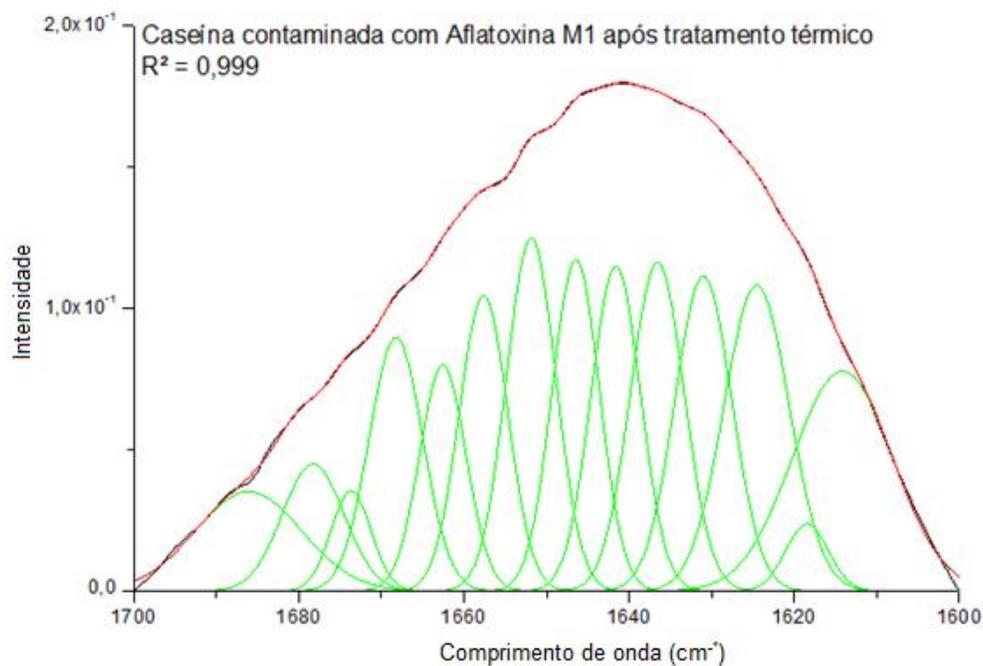
a)



b)



c)



d)

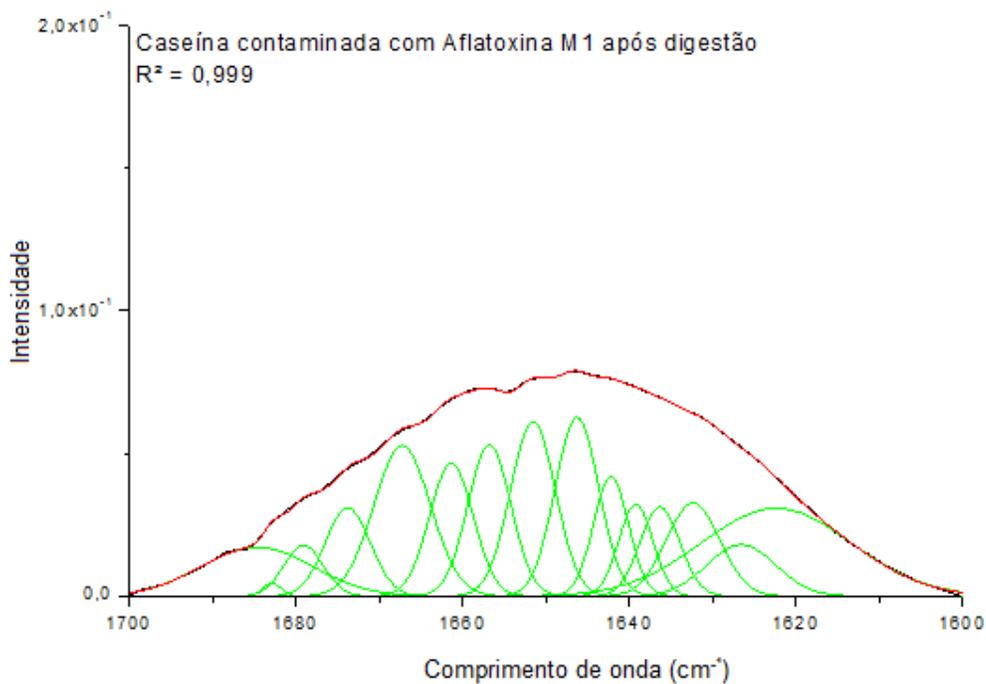


Figura 16– Análise de deconvolução das estruturas secundárias obtidas do FTIR da caseína (a), contaminado com AFM1 (b), após tratamento térmico (c) e após digestão (d).

Tabela 8 – Análise das estruturas secundárias da caseína contaminada com AFM₁ em diferentes processos

Componentes amida I (cm ⁻¹)	Caseína pura (%)	Caseína com AFM ₁ (%)	Caseína com AFM ₁ pasteurizada (%)	Caseína com AFM ₁ após a digestão(%)
β-folha (1638–1612)	41,9±3,6 ^a	35,3±2,0 ^b	41,1±1,4 ^a	31,3±1,0 ^b
Randômicas (1648–1641)	17,8±1,1 ^a	24,6±2,7 ^a	17,1±0,6 ^a	25,0±1,1 ^a
α-hélice (1658–1653)	16,2±3,6 ^a	12,4±1,9 ^a	16,2±0,5 ^a	20,1±2,9 ^a
β-volta (1678–1662)	16,1±2,3 ^a	19,2±2,2 ^a	18,6±0,3 ^a	17,6±0,5 ^a
β-anti (1691–1682)	7,7±0,6 ^a	8,3±1,1 ^a	6,6±1,6 ^a	5,9±0,7 ^a

^{a,b,c} Letras diferentes, na mesma linha, representam diferença significativa ($p < 0,05$ Teste Tukey).

Avaliando quantitativamente após a contaminação da caseína com AFM₁ observou-se uma alteração significativa ($p < 0,05$) na estrutura β-folha passando de 41,9±3,6 para 35,3±2,0%. Após o tratamento térmico, praticamente todas as estrutura ficaram próximas à composição da estrutura original. Segundo Farrel et al. (2001) encontraram resultados similares neste estudo onde avaliaram a estrutura secundárias da β-caseína na região da amida I e II, através da análise de segunda derivada, com curvas gaussianas, obtendo 28-32% β-volta, 32-34% β-folha sendo que estes componentes ficaram estáveis após o tratamento térmico.

Após a digestão *in vitro* a principal mudança significativa ($p < 0,05$) ocorrida na amostra de caseína contaminada com AFM₁ foi no componente β-folha que inicialmente continha 41,9±3,6% passando para 31,3±1,0%; porém, não há na literatura estudos comparando as estruturas secundárias em amostras submetidas a esse tipo de tratamento.

Para os ensaios de leite desnatado, leite desnatado contaminada com AFM₁, leite desnatado após o tratamento térmico e após a digestão *in vitro*, também foram avaliadas na região do Infravermelho conforme Figura 17.

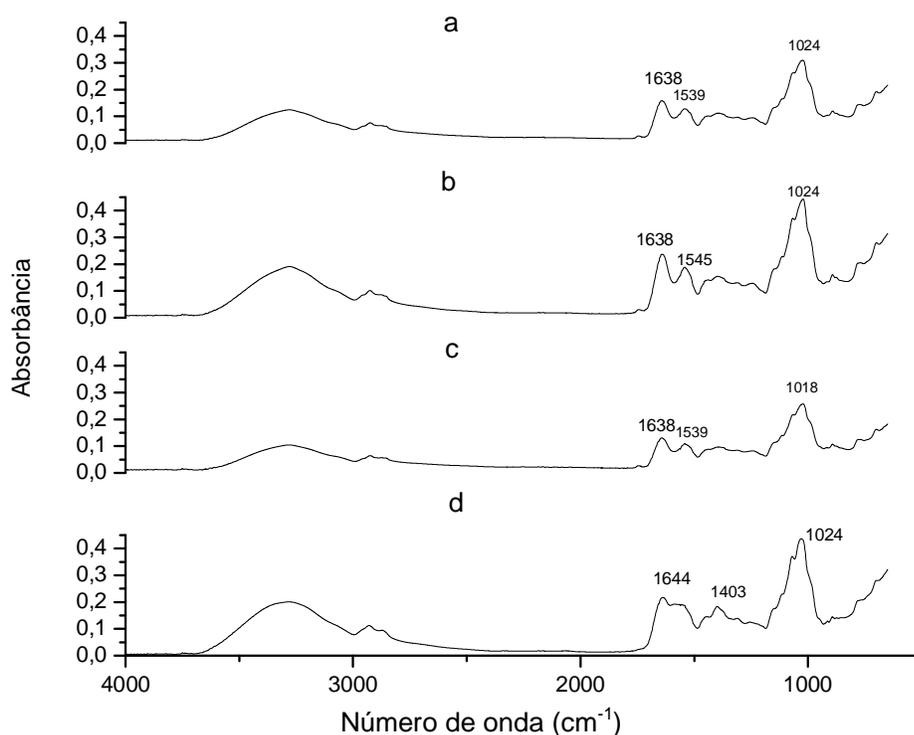
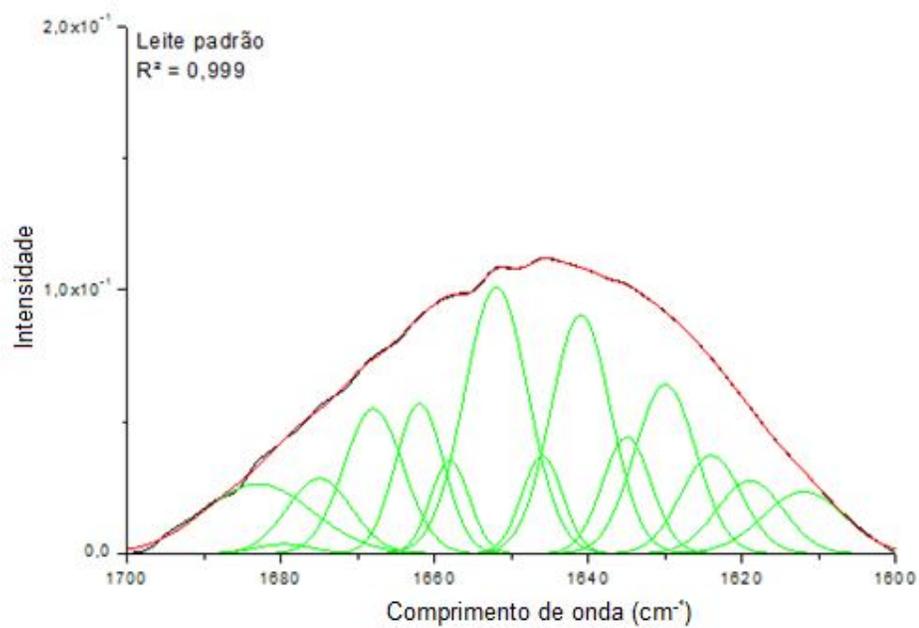


Figura 17 – Análise de FTIR do leite (a), do leite contaminado com AFM₁ antes do tratamento térmico (b), após o tratamento térmico (c) e após a digestão *in vitro* (d).

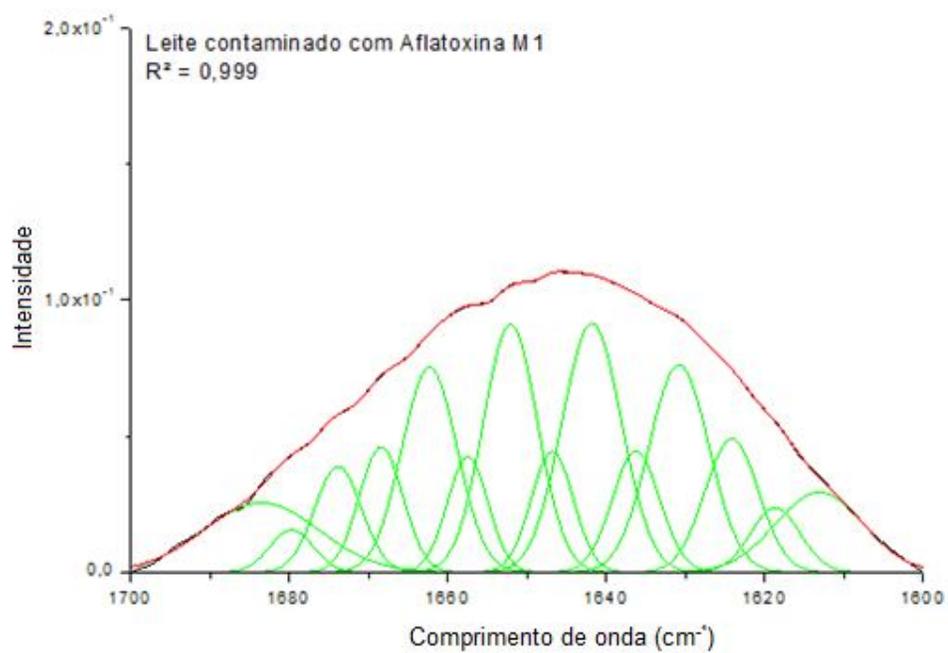
Para verificar a interação entre a AFM₁ e a proteína do leite frente a cada processo submetido, os resultados estão na Tabela 9 obtidos das Figuras 18.

Para amostra de leite desnatado contaminado com AFM₁ os espectros obtidos foram similares ao comportamento com a amostra de caseína após a adição da AFM₁ (Figura 17.b) nos ensaios houve um aumento da intensidade na região da β -folha (1638–1612) em relação aos componentes da Amida I. Após a digestão *in vitro* (Figura 17.d) houve um efeito hipocrômico nas regiões de 1644 - 1024 correspondem aos compostos orgânicos N-H e C-O (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009), produtos resultantes da digestão e degradação da proteína.

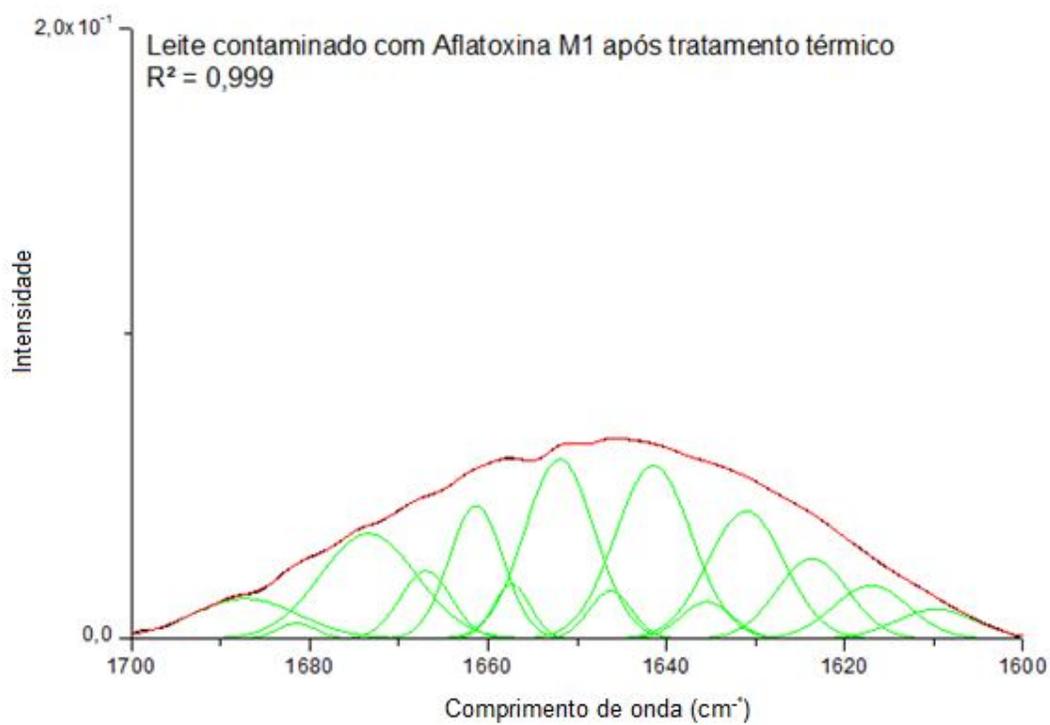
a)



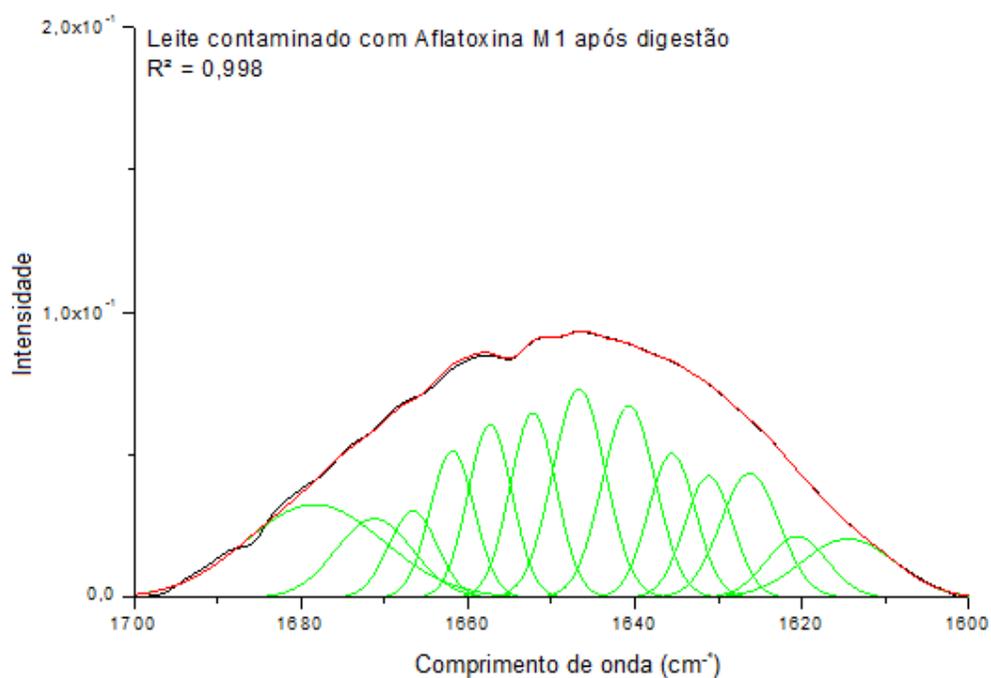
b)



c)



d)



Figuras 18 – Análise de deconvolução das estruturas secundárias obtidas do FTIR do leite desnatado (a), contaminado com AFM1 (b), após tratamento térmico (c) e após digestão (d).

Tabela 9 – Análise das estruturas secundárias do leite contaminado com AFM₁ em diferentes processos

Componentes amida I (cm ⁻¹)	Leite puro (%)	Leite com AFM ₁ (%)	Leite com AFM ₁ pasteurizado (%)	Leite com AFM ₁ após a digestão(%)
β-folha (1638–1612)	34,7±2,4 ^a	33,5±1,2 ^a	31,8±2,5 ^a	29,9±1,2 ^a
Randômicas (1648–1641)	19,7±3,7 ^a	18,4±0,4 ^a	16,6±3,6 ^a	20,3±1,5 ^a
α-hélice (1658–1653)	16,5±0,5 ^a	19,2±1,7 ^a	20,4±2,8 ^a	18,0±3,7 ^a
β-volta (1678–1662)	21,0±0,4 ^a	21,3±2,5 ^a	24,4±2,5 ^a	27,1±3,7 ^a
β-anti (1691–1682)	7,9±0,21 ^a	7,3±2,1 ^a	6,6±0,7 ^a	4,4±3,8 ^a

^a. Letras iguais na mesma linha representam que não houve diferença significativa (p < 0,05, Teste Tukey).

Avaliando as estruturas secundárias quantitativamente, mesmo que o efeito matriz não tenha sido significativo (p > 0,05), pode ter ocorrido um efeito da matriz que influenciou no resultado obtido, sendo que a principal mudança na estrutura da amida I após a digestão *in vitro* foi observada na estrutura β-folha, β-volta e β-anti que inicialmente continha 34,7±2,4%, 21,0±0,4% e 7,9±0,21% passando para 29,9±1,2%, 27,1±3,7% e 4,4±3,8 respectivamente.

Essas mudanças são nas mesmas estruturas observadas nas amostras de caseína e leite contaminadas com AFB₁. Estudos semelhantes foram identificados por Essemine et al. (2011) que ao avaliar a ligação entre a proteína do leite β-lactoglobulina com poliaminas observou redução da β-folha de 57 para 51-55% após a interação do complexo formado, indicando uma possível desdobração parcial da proteína.

5.2.3 Análise de DSC em amostras de caseína e no leite UAT desnatado contaminados com AFM₁

Para os diferentes ensaios de caseína bovina e leite desnatado contaminadas com AFM₁ foram submetido à análise de DSC, que originou picos exotérmicos (conforme figura 19), sendo que os resultados encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10 – Análise de DSC dos ensaios de caseína bovina e leite desnatado controle (sem AFM₁), contaminadas com AFM₁ e submetidas aos processos de tratamento térmico e digestão *in vitro*.

Amostra	t _i (°C)	T _p (°C)	ΔH (J.g ⁻¹)	Amostra	t _i (°C)	T _p (°C)	ΔH (J.g ⁻¹)
Caseína padrão	-139,7	-165,9	-15,39	Leite padrão	-168,9	-175,1	-8,81
Caseína contaminada com AFM ₁	-152,9	-184,8	-16,31	Leite contaminado com AFM ₁	-98,8	-125,6	-10,36
Caseína contaminada com AFM ₁ após o tratamento térmico	-155,4	-175,1	-13,14	Leite contaminado com AFM ₁ após o tratamento térmico	-151,1	-172,9	-9,96
Caseína contaminada com AFM ₁ após a digestão	-93,3	-97,2	-15,32	Leite contaminado com AFM ₁ após a digestão	-174,0	-176,6	-7,69

Nota: t_i temperatura em que iniciou a formação do pico, T_p temperatura do pico e ΔH é variação da entalpia.

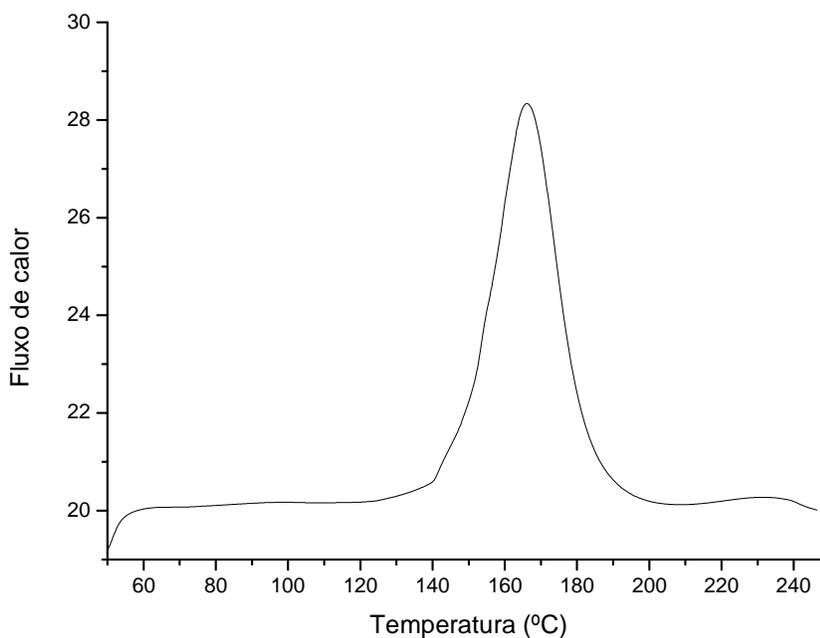


Figura 19– Pico exotérmico formado durante a análise de DSC da amostra de caseína

A amostra de caseína bovina apresentou uma temperatura do pico 165,9 °C e a do leite desnatado 175,1 °C, sendo que os resultados estão próximos ao do

obtido por Mocanu et al. (2012), que ao avaliarem o comportamento térmico da caseína verificaram que o primeiro estágio de degradação ocorreu em torno de 172°C. Após a adição da AFM₁, houve um aumento na variação de entalpia (16,31 J.g⁻¹ para a caseína e 10,36 J.g⁻¹ para o leite) que pode ser um indicativo da associação da micotoxina às proteínas do leite em estudo.

Noisuwan et al. (2008) relatam a ocorrência da variação de entalpia quando adicionado a proteína do arroz com a proteína do leite, sugerindo a formação de complexo.

Após o tratamento térmico, ambos ensaios, de caseína bovina e leite desnatado, apresentaram uma redução na variação de entalpia (ΔH), 13,14 J.g⁻¹ e 9,96 J.g⁻¹, respectivamente, provavelmente devido as modificações ocasionadas pelo tratamento térmico sobre as proteínas em estudo.

Após a digestão *in vitro*, ambos os ensaios, de caseína bovina e leite desnatado, apresentaram um aumento variação de entalpia (ΔH), de 15,32 J.g⁻¹ e 7,69 J.g⁻¹, respectivamente.

5.2.4 Análise de espectroscopia de fluorescência em amostras de caseína e no leite UAT desnatado contaminados com AFM₁

Os resultados referentes aos espectros de fluorescência AFM₁ entre a caseína bovina e leite desnatado estão representados nas Figuras 20 e 21, respectivamente. É possível verificar que, em ambas as amostras, a maior intensidade deve-se as amostras antes da adição de AFM₁. Com a adição da AFM₁, houve redução da fluorescência, o mesmo observado por Tan et al. (2015) que ao adicionar cloranfenicol em proteínas do soro bovino, observaram que após a adição de várias concentrações do cloranfenicol houve redução da intensidade da fluorescência. Segundo Hasni et al. (2011), quando outras moléculas interagem com a caseína, neste caso em especial estudaram a interação dos polifenóis do chá com a caseína, a fluorescência do triptofano pode mudar, dependendo do impacto de tal interação sobre a conformação da proteína.

Após a digestão *in vitro* a intensidade de fluorescência em ambas amostras diminuíram drasticamente, estes resultados também podem ser comparados na análise de DSC onde a variação de entalpia (ΔH) foram semelhante a estrutura original, visto que as proteínas foram degradadas, restando apenas uma porcentagem de AFM₁ na amostra, conforme constatado no item 5.2.1.

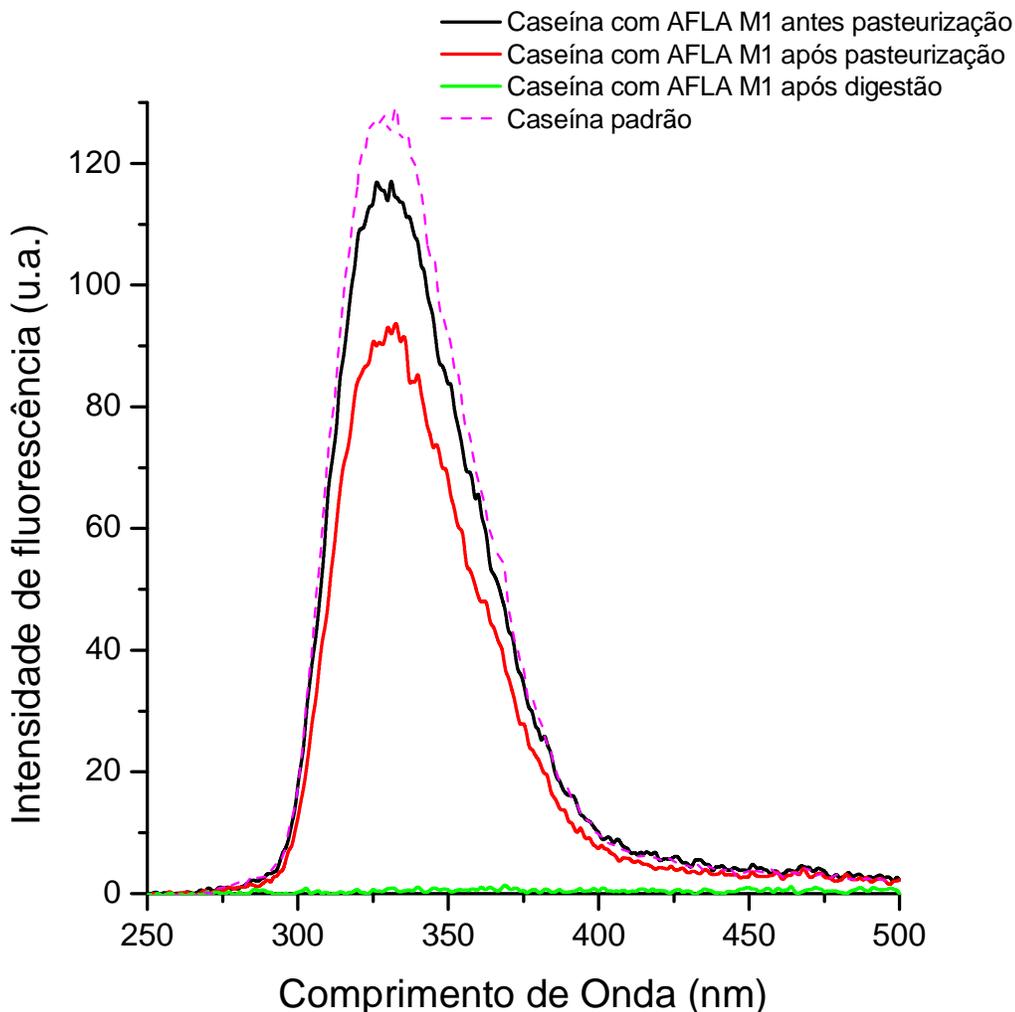


Figura 20. Espectro de emissão de fluorescência no estado sólido das amostras de padrão de caseína, contaminada com AFM₁, após a pasteurização e após digestão *in vitro*

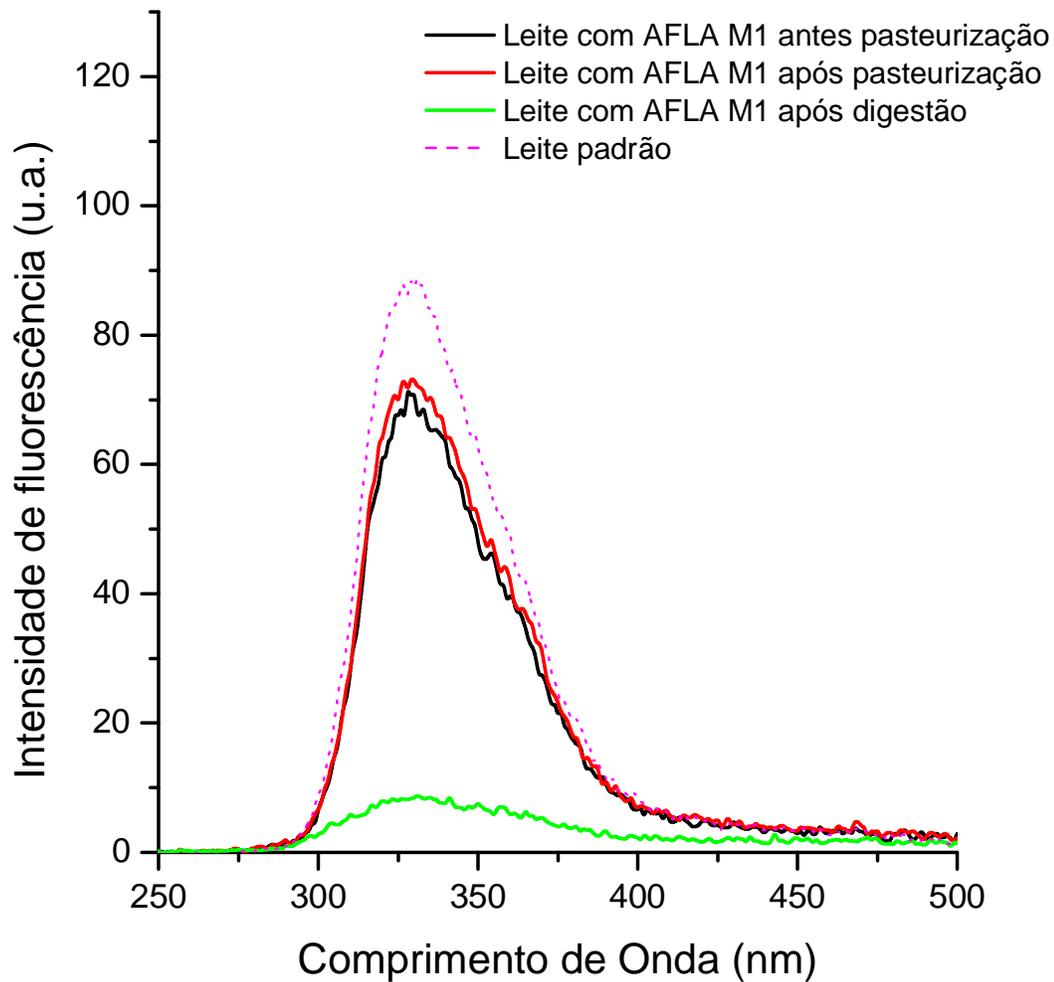


Figura 21. Espectro de emissão de fluorescência no estado sólido das amostras de padrão de leite, contaminado com AFM1, após a pasteurização e após digestão *in vitro*

5.3 CORRELAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS EMPREGADAS PARA VERIFICAR A INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS DO LEITE E AS AFLATOXINAS

Os resultados obtidos corroboram com a hipótese estudada, ou seja, que as AFB₁ e AFM₁ são capazes de interagir com as proteínas do leite e que esta interação é pouco influenciada pelo tratamento térmico e a proteína que não é assimilada permanece ligada à AFB₁.

Essa interação foi observada em ambas as amostras de leite e caseína contaminada com AFB₁ e AFM₁ devida à mudança de intensidade de fluorescência nos diferentes tratamentos empregados (item 5.1.4 e 5.2.4 respectivamente), sendo que após a adição das aflatoxinas nas amostras e após o tratamento térmico, ambos ensaios diminuíram a intensidade de fluorescência devido o complexo formado. Também, após a digestão *in vitro*, há apenas uma mínima intensidade de fluorescência a qual se deve a remanescentes concentração de aflatoxinas comprovada nos itens 5.1.1 e 5.2.1.

Outra forte característica de interação é que na análise de DSC (item 5.1.3 e 5.2.3) onde a variação de entalpia (ΔH) foi influenciada após a adição das aflatoxinas, após tratamento térmico e digestão *in vitro* comprovando a ligação entre proteína-aflatoxina. Também, através da análise espectroscópica (item 5.1.2 e 5.2.2), os resultado corroboram com as demais análises, sendo que após os processos submetidos ocorrem mudanças quantitativa da estrutura secundária e o componente da amida I que mais teve mudanças na composição foi a β , possivelmente a estrutura mais sensível e que se liga a aflatoxina.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que as proteínas do leite são capazes de interagir com as aflatoxinas B₁ e M₁.

O emprego do tratamento térmico similar à pasteurização não promoveu redução da concentração das micotoxinas em estudo; ao contrário, as concentrações foram maiores para os ensaios após o tratamento térmico quando comparado ao ensaio antes do tratamento térmico. Isso pode ter acontecido devido ao fato de que a temperatura promoveu modificações estruturais nas proteínas do leite, em especial nas frações β -folha, β -volta e β -anti, resultados estes reforçados pelo DSC e espectroscopia de fluorescência, o que favoreceu a extração das aflatoxinas em estudo pelo método empregado.

A bioacessibilidade das AFB₁ e M₁ foi de 91,2% e 70,5% e 90,9% e 69,7%, respectivamente, para a amostra de caseína bovina e leite desnatado, indicando que após o processo de digestão *in vitro* uma parte da micotoxina ainda permanece ligada à fração proteica do leite constatado na análise de quantificação das aflatoxinas.

REFERÊNCIAS

ASHIQ, S.; HUSSAIN, M.; AHMAD, B. *Natural occurrence of mycotoxins in medicinal plants: A review*. **Fungal Genetics and Biology**. March 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087184514000218>. Acessado dia 26 de abril de 2014.

AKKAYA, M. R.; BAL, M. A. Efficacy of Modified Yeast Extract and HSCAS Containing Mycotoxin Adsorbent on Ruminal Binding Characteristics of Various Aflatoxins. **Kafkas Univ Vet Fak Derg** 18 (6): 951-955, 2012. DOI: 10.9775/kvfd.2012.6838.

ATANDA, O.; OGUNTUBO, A.; ADEJUMO, O.; IKEORAH, J.; AKPAN, I. Aflatoxin M₁ contamination of milk and ice cream in Abeokuta and Odeda local governments of Ogun State, Nigeria. **Chemosphere** 68 (2007) 1455–1458. www.elsevier.com/locate/chemosphere. Acessado dia 20 de agosto 2014.

AUERBACH, H.; MAAS, R.F.M.; OP Den CAMP, H.J.M.; POL, A; and FINK-GREMMELS, J. 1998. Biodegradation of Aflatoxin B₁ by bovine rumen microorganisms *in vitro* and its effects on rumen fermentation. Proceedings of Mycotox 98 (Toulouse). **Revue de Médecine Vétérinaire** 573. 1998.

BAGGINI, S. P. **Las enfermedades transmitidas por los alimentos (parte 21)**. Marzo 2015. Disponível em: http://bagginis.blogspot.com.br/2015/03/las-enfermedades-transmitidas-por-los_20.html, acesso 19 de abril de 2016.

BAKIRCI, I. (2001). A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey. **Food Control**, 12, 47 e 51.

BEAUCHEMIN, C. N.; N'SOUKPOE-KOSSI, T. J.; THOMAS, T.; THOMAS, R.; CARPENTIER, H. A.; TAJMIR-RIAHY Polyamine analogues bind human serum albumin. **Biomacromolecules**, 8 (2007), pp. 3177–3183

BECKER, T. A.; NEGRELO, I. F.; RACOULTE, F.; DRUNKLER, D. A. Avaliação da qualidade sanitária de leite integral informal, pasteurizado, UHT e em pó comercializados na cidade de Medianeira e Serranópolis do Iguaçu – Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 707-716, 2010.

BECKER, T. A. Fumonisina B1 em arroz: validação de método e efeito de tratamento térmico nos níveis da micotoxina. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

BIANCO, G.; RUSSO, R.; MARZOCCO, S.; VELOTTO, V. AUTORE, G. SEVERINO, L. *Modulation of macrophage activity by aflatoxins B1 and B2 and their metabolites aflatoxins M1 and M2*. **Revista Toxicon**. 2012. P.44-50. (Disponível em: www.elsevier.com/locate/toxicon March 2012. Acessado dia 13 de maio de 2014).

BILANDZIC, N.; BOZIC, D.; DOKIC, M.; SEDAK, M.; KOLANOVIC, B.S.; VARENINA, I.; CVETNIC, Z. *Assessment of aflatoxin M1 contamination in the milk of four dairy species in Croatia*. **Revista Food Control**. p. 18-21. 2014. (Disponível em: www.elsevier.com/locate/foodcont. Acesso dia 27 de junho de 2014).

BOURASSA, P.; N'SOUKPOÉ-KOSSI, C. N.; TAJMIR-RIahi, H. A. Binding of vitamin A with milk a- and b-caseins. **Food Chemistry**, v. 138, p. 444-453, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002*. **Dispõe sobre os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel**. 2002a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (ANVISA). **Resolução nº 274, de 15 de outubro de 2002. Regulamento técnico Mercosul sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim, no milho**. Diário Oficial da União, Brasília. 2002b.

BRASIL (2003) – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE n. 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em: maio 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (ANVISA). Resolução nº 7 de 18 de fevereiro de 2011. **Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal - RIISPOA**. Brasília, 1980. 116 p

BERTHILLER, F.; CREWS, C.; DALL'ASTA, C.; SAEGER, S.; HAESAERT, G.; KARLOVSKY, P.; OSWALD, I.; P. SEEFELDER, W.; SPEIJERS, G.; STROKA, J.; *Masked mycotoxins: A review. Mol. Nutr. Food Res.* 2013, 57, 165–186. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. . Acessado dia 26 de abril de 2014.

BRITZI, M.; FRIEDMAN, S.; MIRON, J.; SOLOMON, R.; CUNEAH, O.; SHIMSHONI, J. A.; SOBACK, S.; ASHKENAZI, R.; ARMER, S.; SHLOSBERG, A. *Article Carry-Over of Aflatoxin B₁ to Aflatoxin M₁ in High Yielding Israeli Cows in Mid- and Late-Lactation. Revista Toxins* 2013, 5, 173-183. (Disponível em www.mdpi.com/journal/toxins. Acessado dia 06 de maio de 2014).

BOTURA M.B. Otimização de métodos analíticos para determinação de aflatoxinas em rações e leite de cabra, e sua ocorrência no Estado da Bahia. Salvador, Bahia 2005, 112 p. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária Tropical) – Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, 2005.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 de setembro de 2003a.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa Nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 de dezembro de 2006.

BYLER, M. D.; FARRELL, H. M. JR. Infrared Spectroscopic Evidence for Calcium Ion Interaction with Carboxylate Groups of Casein. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 1719-1723, 1989.

BYLER, D. M.; SUSI, H. (1986). Examination of the secondary structure of proteins by deconvoluted FTIR spectra. **Biopolymers**, 25, 469–487.

CAMPOS, F. P.; BOSE, M. L. V.; BOIN, C.; LANNA, D.P.D; MORAIS, J. P. G. Comparação do Sistema de Monitoramento Computadorizado de Digestão *In Vitro* com os Métodos *In Vivo* e *In Situ*. 2. Uso do Resíduo da Matéria Seca de Forragens. **Rev. bras. zootec.**, 29(2):531-536, 2000

CAMPAGNOLLO, F.B.; GANEVB, K. C.; KHANEGHAHA, A. M.; PORTELAC, J. B.; CRUZC, A. G.; GRANATOD, D.; CORASSINE, C. H.; OLIVEIRAE,C.A.F; SANT'ANAA, A. S. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M₁: A review. **Food Control**. Volume 68, October 2016, Pages 310–329

CARVAJAL, M.; ROJO, F.; MÉNDEZ, I.; BOLAÑOS, A. Aflatoxin B₁ and its interconverting metabolite aflatoxicol in milk: the situation in Mexico. **Food Additives and contaminants**, v. 20, p. 1077-1086, 2003.

CARVAJAL, M. *Transformación de la aflatoxina B₁ de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB₁-ADN*. Vol. 16. Núm. 02. Enero 2013 - Junio 2013. doi: 10.1016/S1405-888X(13)72082-5. TIP. **Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**.

CATTANEO, T. M. P.; MARINONI, L.; IAMETTI, S.; MONTI, L. (2013). Behavior of Aflatoxin M₁ in dairy wastes subjected to different technological treatments: ricotta cheese production, ultrafiltration and spray-drying. **Food Control**, 32, 77e82.

CHENG J.; MA Y.; LI X.; YAN T.; CUI J. Effects of milk protein-polysaccharide interactions on the stability of cream mix model systems **Food Hydrocolloids**, Volume 45, March 01, 2015, Pages 327-336.

CREPPY, E.E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe, **Toxicology Letters** 127 (2002) 19–28.

CIGIĆ, I. K.; PROSEN, H. *An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins*. **Revista Molecular Sciences**. Ano 2009. Vol 10. p. 62-115. Disponível em: www.mdpi.com/journal/ijms. Acessado dia 20 de junho de 2014.

DEAN, A. L.; MARIETTE, F.; LUCAS, M.; and MARIN, M. Assessment of the State of Water in Reconstituted Milk Protein Dispersions by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). **Food Process Research Unit**, 17 avenue de cucilleh, CS 64427, 35044 (2001).

DENARI, G. B. Contribuições ao ensino de análise térmica. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos. Brasil (2013).

DUARTE, S. C.; ALMEIDA, A. M.; TEIXEIRA, A. S.; PEREIRA, A. L.; FALCÃO, A. C.; PENA, A.; LINO, C. M. Aflatoxin M₁ in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal exposure. **Food Control**, v. 30, p. 411-417, 2013.

DZUMAN, Z.; ZACHARIASOVA, M.; LACINA, O.; VEPRIKOVA, Z.; SLAVIKOVA, P.; HAJŠLOVA, J. *A rugged high-throughput analytical approach for the determination and quantification of multiple mycotoxins in complex feed matrices*. **Revista Talanta**.

2013 Disponível em:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914013010576>. Acessado dia 26 de abril de 2014.

ESSEMINE, J.; HASNI, I.; CARPENTIER, R.; THOMAS, T. J.; TAJMIR-RIahi, H.A. Binding of biogenic and synthetic polyamines to β -lactoglobulin. **International Journal of Biological Macromolecules** 49 (2011) 201–209

EK, K.; KA, L. *Aflatoxin B₁ and M₁ contamination of animal feeds and milk from urban centers in Kenya*. **Revista African Health Sciences** 2009; p 218-226. (Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21503172>. Acessado dia 25 de maio 2014).

FARRELL J. H. M.; WICKHAM, E.D.; UNRUH, Q.I; HOAGLAND, P.D. *Secondary structural studies of bovine caseins: temperature dependence of β -casein structure as analyzed by circular dichroism and FTIR spectroscopy and correlation with micellization*. 2001. V. 15. **Food Hydrocolloids**. p.341-354.

FANG, Y.; FENG, Y.; WU, T.; SRINIVAS, S.; YANG, W.; FAN, J.; YANG, C.; WANG, S. *Aflatoxin B₁ Negatively Regulates Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway through Activating miR-33a*. **Revista PloS One**. Ano 2013. (Disponível em: <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0073004>. Acessado em 20 de junho 2014).

FARIAS, A. X. de.; SILVA, O. F.; MORAES, M. H. de; SOUZA, M. L. M.; MONTELLO, A. P. *Aflatoxinas M₁ em leite: um risco para a saúde pública*. Rio de Janeiro: **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, 2005.

FERNÁNDEZ, C.; AUSAR, S. F.; BADINI, R. G.; CASTAGNA, L. F.; BIANCO, I. D.; BELTRAMO, D. M. (2003). An FTIR spectroscopy study of the interaction between α -s-casein-bound phosphoryl groups and chitosan. **International Dairy Journal**, 13, 897–901. [http://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00115-8](http://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00115-8)

FERRARO, V.; MADUREIRA, A.R.; SARMENTO, B.; GOMES, A. PINTADO, M. E. Study of the interactions between rosmarinic acid and bovine milk whey protein α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin and Lactoferrin. **Food Research International**. August 2015. www.elsevier.com/locate/foodres

FERREIRA, M. M.C. *Simulação in vitro do processo digestivo de patulina em sumos de fruta*. **Universidade de Lisboa**. 2014. Disponível em: http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/15578/1/ulfc107462_tm_mariana_ferreira.pdf. Acessado dia 04 de novembro de 2015.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. **Food Additives and Contaminants**, v.25, p. 172-80, 2008.

FITZSIMONS, S. M.; MORRIS, E. R.; MULVIHILL, D.M. (2003). Resolution of the denaturation and aggregation processes during whey protein gelation by differential scanning calorimetry. In 33rd **food science and technology research conference**, University College Cork, Cork, Ireland, 11–12 September 2003.

FONSECA, H. Micotoxinas on line. Piracicaba-SP, 2014. **FACT SHEETS** sobre Aflatoxinas., Disponível em: <http://www.micotoxinas.com.br/Aflafacts.pdf> . Acessado 20 de abril de 2016.

FORATO, L. A., BERNARDES, R.; COLNAGO, L. A. Estudo de métodos de aumento de resolução de espectros de FTIR para análise de estruturas secundárias de proteínas. **Quim. Nova**, v. 21, n.2, p. 146-50, 1997.

GARRIDO N.S.; IHA M.H.; SANTOS M. R; DUARTE R. M. Occurrence of aflatoxins M(1) and M(2) in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brazil. **Food Addit Contam.** 2003 Jan;20(1):70-73.

GALVANO, F.; GALORAFO, V.; GALVANO, G. Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products: a worldwide review. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 1076–1090, 1996.

GANGNARD, S.; ZUEV, Y.; GAUDIN, J.-C.; FEDOTOV, V.; CHOISSET, Y. Modifications of the charges at the N-terminus of bovine β -casein: Consequences on its structure and its micellisation. **Food Hydrocolloids**, 21 (2007), pp. 180–190

GORJI, E. G.; ROCCHIB, E.; SCHLEININGA, G.; BENDER-BOJALILC, D.; FURTMÜLLERD, P. G.; PIAZZAB, L.; ITURRIE, J. J.; TOCA-HERRERA, J. L.; Characterization of resveratrol–milk protein interaction. **Journal of Food Engineering**. Volume 167, Part B, December 2015, Pages 217–225

GURBAY, A.; SABUNCUOGLU, A.; GIRGIN, G.; SAHIN, G.; YIGIT, S.; YURDAKOK, M.; TEKINALP, G. Exposure of newborns to AFM1 and B1 from mothers' breast milk in Ankara, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.314-319, 2010.

HASKARD, C.A.; EL-NEZAMI, H.; KANKAANPA P.E.; SALMINEN S.; AHOKAS J.T. Surface Binding of Aflatoxin B1 by Lactic Acid Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 3086–3091, 2001.

HASNI, I.; BOURASSA, P.; HAMDANI, S.; SAMSON, G.; CARPENTIER, R.; TAJMIR-RIAAHI, H. Interaction of milk α - and β -caseins with tea polyphenols. **Food Chemistry**. November 2010. www.elsevier.com/locate/foodchem.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. Princípios de Análise Instrumental. 6 ed. **Bookman**, 2009. 1056p.

HOLZAPFEL C.W.; STEYN P.S. Purchase IF. Isolation and structure of aflatoxins M₁ and M₂. **Tetrahedron Lett.** 1966 Jun;25:2799–2803

HÖPPNER, A.M.; DOSTER, W.; VOGEL, R.F.; GÄNZLE, M.G. *Protective Effect of Sucrose and Sodium Chloride for Lactococcus lactis during Sublethal and Lethal High-Pressure Treatments*. **Applied and Environmental Microbiology**. V.70, n. 4, p.2013-2020, 2004.

HORWITZ, W. Official Methods of Analysis International, 17th ed., **Association of Official Analytical Chemists AOAC**, USA, 2000.

HU, G.; ZHENG, Z.; LIUB, Z.; DENG, Y.; ZHAO, Y.; Structure and IgE-binding properties of α -casein treated by high hydrostatic pressure, UV-C, and far-IR radiations. **Food Chemistry**. Volume 204, 1 August 2016, Pages 46–55

HU, J.; SARI, O.; EICHER, S.; RIJA, R. A. Determination of specific heat of milk at different fat content between 1 °C and 59 °C using micro DSC (2009). **Journal of Food Engineering**, 90 (3), pp. 395-399. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2008.07.009

HUR, S.J.; LIM, B.O.; E.A.; DECKER; MCCLEMENTS, D. J. In vitro human digestion models for food applications. **Food Chemistry**. Volume 125, Issue 1, 1 March 2011, Pages 1–12. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610010241>. Acessado em 20 de novembro 2015.

ILHA, M. H.; BARBOSA, C. B.; OKADA, I. A.; TRUCKSESS, M. W. Aflatoxin M₁ in milk and distribution and stability of aflatoxin M₁ during production and storage of yoghurt and cheese. **Food Control**, Volume 29, Issue 1, January 2013, Pages 1-6

IHA, M. H.; ABE, L. T.; OKADA, M. M.; FAVARO, R. M. D.. Occurrence of aflatoxins M₁ and M₂ in goat milk marketed commercialized in the region of Ribeirão Preto-SP, Brazil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)** [online]. 2007, vol.66, n.1

IARC, 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene, and styrene IARC **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, vol. 82 (2002) pp. 171–300.

IARC. International Cancer Research: Cancer Epidemiology. Volume 100F (2012) Chemical Agents and Related Occupations. Human Immunodeficiency Viruses and Human T-Cell **Lymphotropic Viruses**.

ISO. International Standard Organization. Milk – Determination of casein-nitrogen content – Part 1: **Indirect method** (Reference method). ISO 17997-1, 2004.

_____. International Standard Organization. Milk and milk products – Determination of nitrogen content and crude protein calculation – **Kjeldahl principle**. ISO/DIS 8986-1&2, 2011.

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. **Pecuária de corte**. 2011. Disponível em: <http://pt.engormix.com/MA-pecuaria-corte/forragem/artigos/qualidade-sanitaria-graos-forragens-t754/089-p0.htm>. Acessado 07 de agosto de 2014.

KABAK, B.; BRANDON, E. F. A.; VAR, I.; BLOKLAND, M.; SIPS, A. J. A. M. (2009). Effects of probiotic bacteria on the bioaccessibility of aflatoxin B1 and ochratoxin A using an *in vitro* digestion model under fed conditions. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, 44, 472e480.

KABAK, B.; OZBEY, F. (a) Assessment of the bioaccessibility of aflatoxins from various food matrices using an *in vitro* digestion model, and the efficacy of probiotic bacteria in reducing bioaccessibility. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 44, p. 472 - 480, 2012-a.

KABAK, B., & OZBEY, F. (2012) (b). Aflatoxin M 1 in UHT milk consumed in Turkey and first assessment of its bioaccessibility using an *in vitro* digestion model. **Food Control**, 28, 338–344. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012> (b)

KHAN, S.N.; ISLAM, B.; YENNAMALLI, R.; SULTAN, A.; SUBBARAO, N.; KHAN, A.U. Interaction of mitoxantrone with human serum albumin: Spectroscopic and molecular modeling studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 35 (5) (2008), pp. 371–382

KANAKIS, C. D.; HASNI, I.; BOURASSA, P.; TARANTILIS, P. A.; POLISSIOU, M. G.; TAJMIR-RIahi, H-L. Milk b-lactoglobulin complexes with tea polyphenols. **Food Chemistry**, v. 127, 1046-1055, 2011.

KHANIKI, R. J. Chemical Contaminants in Milk and Public Health Concerns: A Review. **International Journal of Dairy Science**, v.2, p. 104-115, 2007.

KHOURY, A. E.; 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** 22 (2011) 1695e1699. Disponivel em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713511001289#>. Acessado dia 10 de agosto 2014.

KONG, J.; YU, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, 39 (2007), pp. 549–559.

KUMOSINSKI, T.F.; UNRUH, J. J. Quantitation of the global secondary structure of globular proteins by FTIR spectroscopy: comparison with X-ray crystallographic structure. **Talanta**, 43 (1996), pp. 199–219.

LEE, D. E.; LEE K.G. Analysis of aflatoxin M₁ and M₂ in commercial dairy products using high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector. **Food Control**. Volume 50, Pages 467–471. April 2015.

LI, M.; MAA, Y.; NGADI, M. O. Binding of curcumin to b-lactoglobulin and its effect on antioxidant characteristics of curcumin. **Food Chemistry**, v. 141, p.1504-1511, 2013.

LIU, Y.; YANG, Z.; DU, J.; YAO, X.; LEI, R.; ZHENG, X. Interaction of curcumin with intravenous immunoglobulin: A fluorescence quenching and Fourier transformation infrared spectroscopy study. **Immunobiology**, v. 213, p. 651-661, 2008.

LONDOÑO, V. A. G.; BOASSOB, A. C.; PAULAC, M. C. Z.; GARCIAD, M. P.; SCUSSELD, V. M.; RESNIKA, S.; PACÍNF, A. Aflatoxin M₁ survey on randomly collected milk powder commercialized in Argentina and Brazil. **Food Control**. Volume 34, Issue 2, December 2013, Pages 752–755

LÓPEZ, C.; RAMOS, L.; RAMADÁN, S.; BULACIO, L.; PEREZ, J. Distribution of aflatoxin M₁ in cheese obtained from milk artificially contaminated. **International Journal of Food Microbiology, Amsterdam**, v. 64, p. 211-215, 2001.

MACIERZANKA, A.; BÖTTGER, F.; LANSONNEUR, L.; GROIZARD, R.; JEAN, S. A.; RIGBY, N. M.; CROSS, K.; WELLNER, N.; MACKIE, A. R. The effect of gel structure on the kinetics of simulated gastrointestinal digestion of bovine β -lactoglobulin. **Food Chemistry**. Vol. 134, Issue 4, 15 October 2012, Pages 2156–2163.

MANAFI, M. H.; ALLAHYARI, K.; POURGHAZI, M.; AMOLI-DIVA, M.; TAHERIMASLAK, Z. Surfactant-enhanced spectrofluorimetric determination of total aflatoxins from wheat samples after magnetic solid-phase extraction using modified Fe₃O₄ nanoparticles. **Spectrochim. Acta A**, 146 (2015), pp. 43–49

MARINHO, M. T.; BERSOT, L. S.; NOGUEIRA, A.; COLMAN, T. A. D.; SCHNITZLER, E. Antioxidant effect of dehydrated rosemary leaves in ripened semi-hard cheese: A study using coupled TGeDSCeFTIR (EGA). - **Food Science and Technology** 63 (2015) 1023 e 1028.

MAUL, R.; PIELHAU, R.; KOCH, M. Evaluation of an extraction method and spin column cleanup procedure for Fusarium mycotoxins and their masked derivatives from grain matrix. **Food Control**. Vol. 40. June 2014, Pages 151–156.

MAVUNGU, J. D. D.; SAEGER, D. Masked mycotoxins in food and feed: challenges and analytical approaches. Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and Feed. **Technology and Nutrition**. 2011, P. 385–400.

MOBILI P.; LONDERO, A.; MARIA T. M. R.; EUSEBIO M. E. S.; ANTONI, G. L.; FAUSTO R. Characterization of S-layer proteins of Lactobacillus by FTIR spectroscopy and differential scanning calorimetry. **Vib Spectrosc** 50:68–77, (2009).

MICHELANGELO, A.; STEVEN J. L.; ŠTAJNBAHER, D.; SCHENCK, F.; FAST, J.; Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC International**, Volume 86, Number 2, March 2003, pp.412-431.

MEHRANFAR, F.; BORDBAR, A. K.; PARASTAR, H., A combined spectroscopic, molecular docking and molecular dynamics simulation study on the interaction of quercetin with B-casein nanoparticles. **Revista Photochemistry and Photobiology**, p. 100-107, 2013. Disponível em: www.elsevier.com.br/locate/jphotobiol. Acessado 20 de setembro de 2014.

MOCANU, A.; MOLDOVEANU, M.; ODOCHIAN, C.; PAIUS, M. ; APOSTOLESCU, N.; NECULAU, R., Study on the thermal behavior of casein under nitrogen and air

atmosphere by means of the TG-FTIR technique. **Thermochimica Acta**, 546 (2012), pp. 120–126

MOHAMMADI H. A review of Aflatoxin M₁, Milk, and Milk products. In: Gerardo R, Gonzalez G, editors. **Aflatoxins- Biochemistry and Molecular Biology**. Croatia: Intech; 2011.

NAVARRO , R. B.; SANTOS, G. T.; ALMEIDA, R. Sistemas intensivos de produção de leite e segurança alimentar: aflatoxinas e resíduos de organofosforados e carbamatos. MARINGÁ- PR. 2011. Disponível em: **www.sites.uem.br/ppz/trabalhos-de-conclusao/dissertacoes/.../at.../file**. Acessado dia 05 de agosto de 2014.

NOISUWAN, A.; BRONLUND, J.; WILKINSON, B.; HEMAR. Y. Effect of milk protein products on the rheological and thermal (DSC) properties of normal rice starch and waxy rice starch. **Food Hydrocolloids**, 22 (2008), pp. 174–183

OLIVEIRA, C. P.; SOARES, N. F. F.; OLIVEIRA, T. V.; JUNIOR, J. C. B.; SILVA, W.A. Aflatoxin M₁ occurrence in ultra high temperature (UHT) treated fluid milk from Minas Gerais/Brazil. **Food Control**. Volume 30, Issue 1, March 2013, Pages 90–92

OLIVEIRA, S.C.; DEGLAIRE, A.; MENARD, O.; BELLANGER, A.; ROUSSEAU, F.; HENRY, G.; DIRSON, E.; CARRIÈRE, F.; DUPONT, D.; BOURLIEU, C. *Holder pasteurization impacts the proteolysis, lipolysis and disintegration of human milk under in vitro dynamic term newborn digestion*. **Food Research International**. (2015).

Organização Mundial da Saúde (OMS). International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 11. **MYCOTOXINS**. Geneva, 1979. Disponível em <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc011.htm>. Acessado dia 10 de agosto 2014

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. Introdução à espectroscopia. São Paulo: **Cengage Learning**, 2010. 700 p

PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P. H. F.da.; COSTA JÚNIOR, L. C. G.; OLIVEIRA, L. L. de. Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos. 2. ed. Juiz de Fora: **EPAMIG**, 234 p, 2001.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P. De; PRADO, G.; ROSA, C. A. D. R.; VELOSO, T.; SOUZA, L. A. F. De; RIBEIRO, J. M. M. (2005). Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais - Brasil. *Ciência E Agrotecnologia*. <http://doi.org/10.1590/S1413-70542005000100013>. Ano 2005. **Ciência e Agrotecnologia**, 29(1), 106-112.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S. de; LIMA, A. S. and MOREIRA, A. P. A. Occurrence of aflatoxin M₁ in parmesan cheese consumed in Minas Gerais, Brazil. **Ciênc. agrotec.** 2008, vol.32, n.6, pp.1906-1911. ISSN 1981-1829

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B. E ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica** 2011; 3(1):51-64. Cromatografia DOI: 10.4322/sc.2011.004 ISSN 1984-4433

RAI, M. K.; BONDE, S. R.; INGLE, A. P.; GADE, A. K. *Mycotoxin: rapid detection, differentiation and safety.* **Revista Pharm Educ.** Ano 2012. Disponível em: <http://www.pcte.edu.in/jper/issues/2012-june-volume-3-issue-1/Paper-4.pdf>. Acessado dia 30 de maio de 2014.

ROCHA, L. O. Distribuição de fungos e micotoxinas em grãos de milho recém colhidos e variabilidade genética das cepas de *Fusarium vertillioides* e *Aspergillus flavus* isoladas. Dissertação (doutorado em microbiologia) Universidade Estado São Paulo. **Instituto de Ciências Biomédicas**, São Paulo, 2010. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-18102010-131401/pt-br.php>

ROSA, A. F. Ocorrência natural de AFM1 e parâmetros de qualidade do leite em propriedades do estado de São Paulo. **Nova Odessa-SP**, 2014. Disponível: www.iz.sp.gov.br/pdfs/1398346673.pdf. Acessado em 14 de janeiro de 2015.

RODRÍGUEZ, N.; ORTIZ, M. C.; SARABIA, L. A.; HERRERO, A. Multianalyte screening method for sulfonamides in milk based on front-face fluorescence spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, Volume 657, Issue 2, 11 January 2010, p. 136-146.

RUSTOM, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, v. 59, p. 57-67, 1997

SAKATA, R. A. P.; SABBAG, S. P., MAIA, J. T. L. S. Ocorrência de aflatoxinas em produtos alimentícios e o desenvolvimento de enfermidades. **Revista Enciclopédia Biosfera**, vol.7, ano 2011. Pág. 1478. (Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2011b/ciencias%20da%20saude/ocorrencia.pdf>. Acessado dia 02 de julho de 2014).

SANTILI, A. B. N. Ocorrência de AFM1 em leite cru de três mesorregiões produtoras do Estado de São Paulo e sua correlação com parâmetros de qualidade do leite. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2010. Disponível em:

<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-13122010-102303/pt-br.php>.
Acesso em: 10 julho. 2014.

SANTOS, J. S.; OKANO, W.; ARRAIS, B. C. D.; COSTABEBER, I. H.; SANTANA, E. H. W., AFM1 em Produtos Lácteos e Uso de Bactérias Ácido Láticas para Biocontrole em Leite. **UNICIÊNCIAS**, v. 18, n. 1, 2014.

SANTOS, D. M.; NOGUEIRA, A. R. A.; NEVES, E. F. A.; CAVALHEIRO, É. T. G.; NÓBREGA, J. A. (2002). Análise química inorgânica de leite esimulação do reagente CFA-C. **Eclética Química**, 27(spe), 61-76.

SARTORI, A. V.; MATTOS, J. S.; SOUZA, Y. P.; SANTOS, R. P.; MORAES, M. H. P.; NÓBREGA, A. W. Determination of aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1 and G2 in peanut by modified QuEChERS method and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Sociedade, Ciência & Tecnologia**. v. 3, n. 3 (2015)

SCAGLIONI, P. T. Redução dos níveis de AFB₁ e M₁ em leite utilizando a casca de arroz como adsorvente. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014

SHUNDO, Luzia. Otimização da determinação de AFM1 em leite por coluna de imunoafinidade, cromatografia em camada delgada e sua ocorrência. 2004. Tese de Doutorado. São Paulo (Estado). Secretaria da Saúde. Coordenação dos Institutos de Pesquisa. **Programa de Pós-Graduação em Ciências**.

SHUNDO, L.; SABINO, M. Aflatoxin M₁ In Milk By Immunoaffinity Column Cleanup With Tlc/Hplc Determination Instituto Adolfo Lutz, Seção de Química Biológica, São Paulo, SP, Brasil. 2006. **Brazilian Journal of Microbiology** (2006) 37:164-167 ISSN 1517-8382 164

SMELA M .E; SOPHIE S.; CURIER E.; BAILEY A.; JOHN M. E. The chemistry and biology of aflatoxin B₁. Carcinogenesis. 2001;22:535–545. **Pub Med**.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Princípios de análise instrumental. 5. ed. Porto Alegre: **Bookman**, 2002. 836 p.

STOEV, S.D. Food borne mycotoxicoses, risk assessment and underestimated hazard of masked mycotoxins and joint mycotoxin effects or interaction. Doi:10.1016. **Environmental Toxicology and Pharmacology** Volume 39, Issue 2, March 2015, Pages 794–809.

TAN, Z.; XU, H.; LI, G.; YANG, X.; CHOI, M. M. F. *Fluorescence quenching for chloramphenicol detection in milk based on protein-stabilized Au nanoclusters*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 149 (2015) 615–620

TAVAKOLI, H. R.; RIAZIPOUR, M.; KAMKAR, A.; SHALDEHI, H.; RNEJAD, A. S. M. Occurrence of aflatoxin M₁ in white cheese samples from Tehran, Iran. **Food Control** 23 (2012) 293 e 295. www.elsevier.com/locate/foodcont. Acessado dia 15 de agosto 2014.

TRUCKSESS, M. W.; POHLAND, A. E. *Mycotoxin Protocols*, (eds.), Humana, **Totowa**, New Jersey, 2001.

VDOVENKO, M. M.; LU, C.; YU, F.; SAKHAROV, I. Y. *Development of ultrasensitive direct chemiluminescent enzyme immunoassay for determination of aflatoxin M1 in milk*. **Revista Talanta**. Ano 2013. (Disponível em: www.elsevier.com/locate/foodchem. Acessado dia 20 de maio de 2014).

VERSANTVOORT, C. H. M. OOMEN, A.G., KAMP, E.V., ROMPELBERG, C.J.M. SIPS, A.J.A, “Applicability of an in Vitro Digestion Model in Assessing the Bioaccessibility of Mycotoxins from Food,” **Food and Chemical Toxicology**, Vol. 43, No. 1, 2005, pp. 31-40.

YENI, F., ACAR, S., POLAT, Ö.G., SOYER, Y., ALPAS, H. *Rapid and standardized methods for detection of food borne pathogens and mycotoxins on fresh produce*. **Revista Food Control** 2013. www.elsevier.com/locate/foodcont. Acesso dia 30 de maio 2014.

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

ZAMORA, N. C. Efecto de la extrusión sobre la actividad de Factores antinutricionales y digestibilidad in vitro de Proteínas y en almidón harinas de *Canavalia ensiformis*. **Arco.Latinoam.Nutr**; 53 (3): 293-298, setembro 2003

ZHANG, Y.; ZHONG, Q. *Probing the binding between norbixin and dairy proteins by spectroscopy methods*. **Food Chemistry**, p. 611-616, 2013. Disponível em: www.elsevier.com.br/locate/foodchem. Acessado 20 de setembro de 2014.

ZHANG, J.; LIU, Y.; LIU, X.; LI, Y.; YIN, X. The folic acid/ β -casein complex: characteristics and physicochemical implications. **Food Research International**, 57 (0) (2014), pp. 162–167

ZHANG,H et al. Interaction of milk whey protein with common phenolic acids. **Journal of Molecular Structure**: 1058 (2014) 228–233.

WILD C.; GONG Y. (2010) Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. **Carcinogenesis**, 31:71-82.

WILLIAMS J. H.; PHILLIPS T. D.; JOLLY P. E.; STILES J. K. JOLLY C. M.; AGGARWAL D. (2004) Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **American Journal of Clinical Nutrition**, 80(5):1106–1122.