



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

Mestrado integrado em Medicina Veterinária

Dissertação Final de Mestrado

Aflatoxinas: caracterização e relevância na bovinicultura de leite e na alimentação humana

Maria João Monteiro dos Santos

Coimbra, Julho de 2024



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

Mestrado integrado em Medicina Veterinária

Dissertação Final de Mestrado

Aflatoxinas: caracterização e relevância na bovinicultura de leite e na alimentação humana

Coimbra, julho de 2024

Maria João Monteiro dos Santos

Presidente do Júri

Prof^ª. Doutora Sofia Ferreira Anastácio

Arguente

Prof^ª. Doutora Sofia Alexandra Giesta
Cancela Duarte

Orientador

Prof^ª. Doutora Elisabete Martins

Orientador Interno

Prof^ª. Doutora Elisabete Martins



Dissertação de Mestrado de Ciclo de
Estudos Conducente ao Grau de Mestre
em Medicina Veterinária na EUVG



Agradecimentos

Gostaria de expressar um sincero e profundo agradecimento aos meus pais, Rui e Sofia, por sempre me proporcionarem todas as ferramentas e o apoio necessários para que eu pudesse perseguir e concretizar os meus sonhos. A sua dedicação e incentivo inabaláveis foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Às minhas queridas irmãs, Joana e Matilde, a minha gratidão pela paciência e compreensão demonstradas ao longo destes seis anos. A vossa presença constante e encorajadora foi um pilar de força nos momentos mais desafiadores.

À minha orientadora, Elisabete Martins, dirijo um agradecimento especial pela orientação, apoio e dedicação incansável durante esta última e crucial etapa da minha jornada académica. A sua sabedoria e orientação foram essenciais para a conclusão deste percurso.

Índice geral

Índice de figuras	v
Índice de tabelas	v
Lista de siglas, símbolos e abreviaturas	vi
Resumo	2
Abstract	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. CARACTERIZAÇÃO DAS AFLATOXINAS.....	5
2.1. ORIGEM E PRODUÇÃO.....	5
2.2. ESTRUTURA QUÍMICA E VIA DE BIOSÍNTESE	6
3. IMPACTO NA BOVINICULTURA DE LEITE	11
3.1. OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS EM ALIMENTO PARA ANIMAIS.....	11
3.2. CONSEQUÊNCIAS NA SAÚDE DE VACAS LEITEIRAS	12
3.3. AFLATOXINA M1 NO LEITE	14
4. IMPACTO PARA O HOMEM	16
4.1. CONSEQUÊNCIAS NA SAÚDE HUMANA	16
4.2. IMPACTO ECONÓMICO	18
5. MÉTODOS DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AFLATOXINAS.....	19
5.1. AMOSTRAGEM	19
5.2. EXTRAÇÃO E LIMPEZA	19
5.3. TÉCNICAS DE CROMATOGRAFIA	20
5.4. TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS.....	21
5.5. MÉTODOS RECENTES.....	22
6. ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO E CONTROLO.....	23
6.1. ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO	23
6.2. DESCONTAMINAÇÃO DE AFLATOXINAS EM ALIMENTOS.....	24
6.3. REGULAMENTAÇÃO	27
7. CONCLUSÃO	30
8. BIBLIOGRAFIA	32

Índice de figuras

Figura 1 - Estrutura química de AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1 e AFM2.....	7
Figura 2 - Vias de metabolismo da Aflatoxina B1 em bovinos	9
Figura 3 - Vias de metabolismo da Aflatoxina B1 no Homem	10

Índice de tabelas

Tabela 1 - Limites máximos legais, definidos pela FDA e UE, para diferentes géneros alimentícios	29
---	----

Lista de siglas, símbolos e abreviaturas

AFB1- Aflatoxina B1

AFB2a- Aflatoxina B2a

AFB-GSH- Aduto de aflatoxina-glutationa

AFBO- AFB1-8,9-epóxido

AFD1- Aflatoxina D1

AFG1- Aflatoxina G1

AFG2- Aflatoxina G2

AFL- Aflatoxicol

AFM1- Aflatoxina M1

AFM2- Aflatoxina M2

AFP1- Aflatoxina P1

AFQ1- Aflatoxina Q1

AST- Aspartato aminotransferase

ATP- Adenosina trifosfato

AuNPs- Nanopartículas de ouro

CYP1A2- Citocromo P450 1A2

CYP3A4- Citocromo P450 3A4

CYP450- Citocromo P450

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ELISA- Ensaio de imunoabsorção enzimática

EUA- Estados Unidos da América

FDA- Agência de administração de alimentos e medicamentos

GC- Guanina-citosina



GGT- γ - glutamil transpeptidase

GSH- Glutathiona

HACCP- Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos

HPLC- Cromatografia em camada fina de alto desempenho

IAC- Colunas de imunoafinidade

IARC- Agência internacional de pesquisa sobre o Cancro

LC-MS/MS- Cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massa

LLE- Extração líquido-líquido

LOD- Limite de deteção

LSE- Extração liquido-sólido

NADPH- Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

RNA- Ácido ribonucleico

SDH- Sorbitol desidrogenase

SPE- Método de extração em fase sólida

TA - Timina-adenina

TLC- Cromatografia em camada fina

UV- Ultravioleta



Aflatoxinas: Caracterização e relevância na bovinicultura de leite e na alimentação

Maria Santos ^a, Elisabete Martins ^a

^a Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal (mariaj19santos@hotmail.com; elisabete.martins@euvg.pt)

Resumo

As aflatoxinas são micotoxinas produzidas por fungos do género *Aspergillus*. Representam uma ameaça a nível mundial afetando negativamente a saúde humana e a bovinicultura leiteira, podendo resultar em perdas económicas substanciais. A aflatoxina B1 (AFB1) é caracterizada como sendo o carcinogénico natural mais potente, com capacidade de desenvolver carcinoma hepatocelular. Por sua vez, a aflatoxina M1 (AFM1), derivada da AFB1, reveste-se de particular interesse na bovinicultura leiteira, devido à sua excreção através do leite.

Esta revisão tem por objetivos caracterizar as aflatoxinas, começando por descrever a sua estrutura química, vias de contaminação e processos metabólicos associados a AFB1 e seus metabolitos; caracterizar os principais efeitos adversos que provocam, tanto na saúde de bovinos produtores de leite como para a saúde do Homem; caracterizar os principais métodos utilizados para a sua deteção e quantificação e ainda caracterizar estratégias de controlo e mitigação das mesmas nas culturas. Adicionalmente pretende fazer uma abordagem das aflatoxinas num cenário futuro, enfatizando a importância de práticas agrícolas adequadas, aprimoramento das metodologias de deteção, formas de mitigação e desintoxicação e ainda a importância de regulamentações rigorosas de forma a garantir a segurança alimentar.

Palavras-chave

Micotoxinas, Aflatoxinas, AFB1, AFM1, Controlo e mitigação, Deteção, Limite Máximo, Prevenção

Abstract

Aflatoxins are mycotoxins produced by fungi of the genus *Aspergillus*. They represent a global threat, negatively affecting human health and dairy cattle farming, potentially resulting in substantial economic losses. Aflatoxin B1 (AFB1) is characterized as the most potent natural carcinogen, capable of developing hepatocellular carcinoma. On the other hand, aflatoxin M1 (AFM1), derived from AFB1, is of particular interest in dairy farming due to its excretion through milk.

This review aims to characterize aflatoxins, starting by describing their chemical structure, contamination pathways, and metabolic processes associated with AFB1 and its metabolites; to characterize the main adverse effects they cause, both on the health of dairy cattle and on human health; to characterize the main methods used for their detection and quantification, and to characterize strategies for their control and mitigation in crops. Additionally, it aims to address aflatoxins in a future scenario, emphasizing the importance of appropriate agricultural practices, improvement of detection methodologies, mitigation and detoxification methods, and the importance of strict regulations to ensure food safety.

Key words

Mycotoxins, Aflatoxins, AFB1, AFM1, Control and mitigation, Detection, Maximum Limit, Prevention

1. INTRODUÇÃO

As micotoxinas são metabolitos secundários produzidos por fungos. Estes metabolitos apresentam significativa toxicidade para o Homem e para animais, mesmo que numa concentração reduzida, dado o seu baixo peso molecular (Iqbal, Asi e Ariño, 2013). Apesar da existência de registos de casos de ergotismo (doença causada pela ingestão de produtos contendo cereais contaminados com alcaloides produzidos pelo fungo *Claviceps purpurea*) (IARC, 2002), causados por micotoxinas já na idade média, foi apenas no início da década de 1960, que se começou a dar um maior ênfase ao seu estudo, ao identificar-se a aflatoxina como agente causador da doença “X”. A doença “X” afetou perus, no Reino Unido, que foram alimentados com farinha de amendoim contaminada proveniente do Brasil, e provocou a morte de mais de cem mil aves, com necrose hepática aguda (Pickova *et al.*, 2021). São relatados surtos por todo o mundo tanto em animais como em humanos. Um dos surtos mais graves, em humanos, aconteceu no Quênia em 2004, com 125 mortes (Jiang *et al.*, 2021).

As aflatoxinas são um importante grupo de micotoxinas, produzidas por fungos do género *Aspergillus*, notavelmente *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Estes fungos geralmente infetam culturas de cereais, incluindo o trigo, milho e arroz, assim como nozes, algodão, amendoim (Coppock, Christian e Jacobsen, 2018), produtos de soja e especiarias (Fink-Gremmels, 2008). A presença de aflatoxinas em alimentos destinados ao Homem e aos animais é de particular preocupação devido à sua elevada toxicidade, incluindo propriedades carcinogénicas, mutagénicas e imunossupressoras, representando um risco significativo tanto para a saúde animal quanto humana (Kensler *et al.*, 2010). Além disso, representam um enorme impacto económico na agricultura (Jiang *et al.*, 2021).

Na bovinicultura de leite a contaminação por aflatoxinas é duplamente preocupante, afetando não apenas a saúde e a produtividade dos bovinos, mas também porque representa uma via indireta através da qual estas toxinas podem entrar na cadeia alimentar humana, pelo consumo de leite contaminado e produtos lácteos derivados (Coppock, Christian e Jacobsen, 2018).

As alterações climáticas e o aumento populacional representam grandes desafios para a manutenção da segurança alimentar. As mudanças climáticas podem favorecer a proliferação de fungos produtores de aflatoxinas em culturas alimentares (Miraglia *et al.*, 2009).

Com o constante aumento da população global, torna-se cada vez mais desafiante para os países em desenvolvimento descartar alimentos contaminados, resultando frequentemente na utilização destes produtos comprometidos, tanto na alimentação humana como na animal. A segurança alimentar

refere-se à disponibilidade suficiente de alimento, acesso a alimentos seguros, suficientemente nutritivos e com qualidade. Quando um destes pontos falha incorre a insegurança alimentar e a desnutrição (Mahato *et al.*, 2019).

Assim, consideramos pertinente a realização da caracterização do estado da arte do conhecimento científico em aflatoxinas numa perspetiva do prado ao prato, com foco na bovinicultura leiteira e correspondentes produtos de origem animal, efeitos na saúde animal e humana e metodologias de deteção, controlo e mitigação.

O objetivo desta dissertação é então, caracterizar as aflatoxinas no que diz respeito à sua estrutura química, mecanismos de toxicidade, métodos de deteção e quantificação, bem como explorar estratégias de controlo e mitigação para minimizar sua presença em produtos destinados ao consumo humano e animal.

2. CARACTERIZAÇÃO DAS AFLATOXINAS

2.1. ORIGEM E PRODUÇÃO

As micotoxinas são metabolitos secundários produzidos por fungos. Estes metabolitos são denominados de secundários por não serem essenciais para a sobrevivência do organismo (Iqbal, Asi e Ariño, 2013). São produzidas por diversas espécies de fungos do género *Aspergillus*, sendo as espécies mais comuns a *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius* (Kumar *et al.*, 2017). *A. flavus* tipicamente produz aflatoxina B1 (AFB1) e aflatoxina B2 (AFB2), enquanto o *A. parasiticus* produz aflatoxina G1 (AFG1), aflatoxina G2 (AFG2) podendo também produzir AFB1 e AFB2. A aflatoxina M1 (AFM1) e a aflatoxina M2 (AFM2), são metabolitos da AFB1 e AFB2, respetivamente (Kumar *et al.*, 2017). A AFB1 é considerada o carcinogénico natural mais potente (Creppy, 2002) e foi classificado como cancerígeno humano do Grupo 1 pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (IARC) (IARC, 2002).

Estes fungos têm uma distribuição ubiqüitária na natureza, o que faz com que em condições ideais possam ocorrer em determinadas culturas durante diferentes fases de produção, principalmente durante as fases de pós-colheita. *A. parasiticus* é bastante comum em culturas de amendoim, enquanto *A. flavus* é mais predominante em culturas de noz, milho e algodão (Varga, Frisvad e Samson, 2009). A contaminação de culturas por aflatoxinas pode ocorrer em diferentes fases da cadeia alimentar, incluindo no campo, na fase de colheita, no armazenamento e no processamento (Kumar *et al.*, 2021).

A produção de aflatoxinas é favorecida por diversos fatores, sendo a humidade relativa e a temperatura considerados os mais críticos. A contaminação por aflatoxinas acontece com maior frequência em regiões tropicais e subtropicais, onde a humidade relativa é alta e a temperatura média se encontra entre os 25°C e 35°C. A produção de aflatoxinas diminui de forma significativa em temperaturas abaixo dos 25°C e fica completamente inibida acima dos 37°C, considerando-se como temperatura de 29-30°C ideal para a síntese destas (Bhatnagar *et al.*, 2006). Outro fator importante na produção de micotoxinas é a atividade da água que quanto maior for, melhores serão as condições para o crescimento de fungos e síntese de toxinas. A síntese de toxinas é inibida se a atividade da água for inferior a 0,70-0,75. A temperatura e a atividade da água não só promovem o crescimento de fungos produtores de aflatoxinas como também desempenham um papel fundamental na transcrição de dois genes reguladores (aflR e aflS) na via de biossíntese de aflatoxinas (Schmidt-Heydt *et al.*, 2009). Existem outros fatores que afetam a síntese de micotoxinas, como o pH, cujo intervalo ideal se situa entre 3,4 e 5,5 (Bhatnagar *et al.*, 2006). As elevadas concentrações de dióxido de carbono e baixos níveis de oxigénio inibem a produção de aflatoxinas (Taniwaki *et al.*, 2010).

As práticas de cultivo inadequado, como cultivo intensivo, plantas com elevado stress de crescimento, irrigação inadequada e culturas com diversidade genética diminuída também podem favorecer a contaminação das culturas por micotoxinas (Brown *et al.*, 1999). Os danos físicos da semente, que podem ocorrer em diversas etapas, como durante colheita inadequada, ou lesões provocadas por insetos, tornam as culturas mais vulneráveis à contaminação por aflatoxinas (Abrehame *et al.*, 2023). Na fase pós-colheita também podem ocorrer contaminações devido a secagem tardia (Pickova *et al.*, 2021) ou a armazenamento inadequado num local com elevada humidade (Lahouar *et al.*, 2016).

2.2. ESTRUTURA QUÍMICA E VIA DE BIOSSÍNTESE

É importante conhecer-se a estrutura química das aflatoxinas para que se possa entender a sua toxicidade. Já estão descritos cerca de 20 tipos de aflatoxinas, sendo as mais importantes a AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1 e AFM2 (Pickova *et al.*, 2021). As aflatoxinas são derivadas de difuranocumarínicos, compostas por um grupo de bifurano ligado ao núcleo de cumarina, e são divididas em dois grandes grupos, de acordo com a sua estrutura química. Aflatoxinas como as AFB1, AFB2, AFM1 e AFM2 são classificadas como difurocumarociclopentenonas, enquanto as AFG1 e AFG2 são difurocumarolactonas (Bbosa *et al.*, 2013). As aflatoxinas do tipo B estão ligadas a um anel ciclopentenona e as aflatoxinas do tipo G estão ligadas a um anel lactona (Jaimez *et al.*, 2000). As denominações AFB e AFG tiveram por base a cor que estes compostos exibem sob luz ultravioleta. A AFB produz fluorescência azul (*blue*)

enquanto AFG produz fluorescência verde (*green*) (Coppock, Christian e Jacobsen, 2018). O que diferencia a AFB1 da AFB2, a AFG1 da AFG2 e a AFM1 da AFM2 é a presença de ligações duplas na posição 8,9 no anel furano terminal em AFB1, AFG1 e AFM1 (Abrehame *et al.*, 2023). A AFB1 é considerada a aflatoxina com maior toxicidade, seguida de AFG1, AFB2 e por último, a AFG2 que é considerada a menos preocupante (Jaimez *et al.*, 2000).

As aflatoxinas M1 e M2 são metabolitos hidroxilados de AFB1 e AFB2, respectivamente. A biotransformação descrita de AFB1 em AFM1 ocorre por meio de enzimas do citocromo P450 (CYP450) em vacas alimentadas com dieta contaminada com AFB1 (Alshannaq e Yu, 2017).

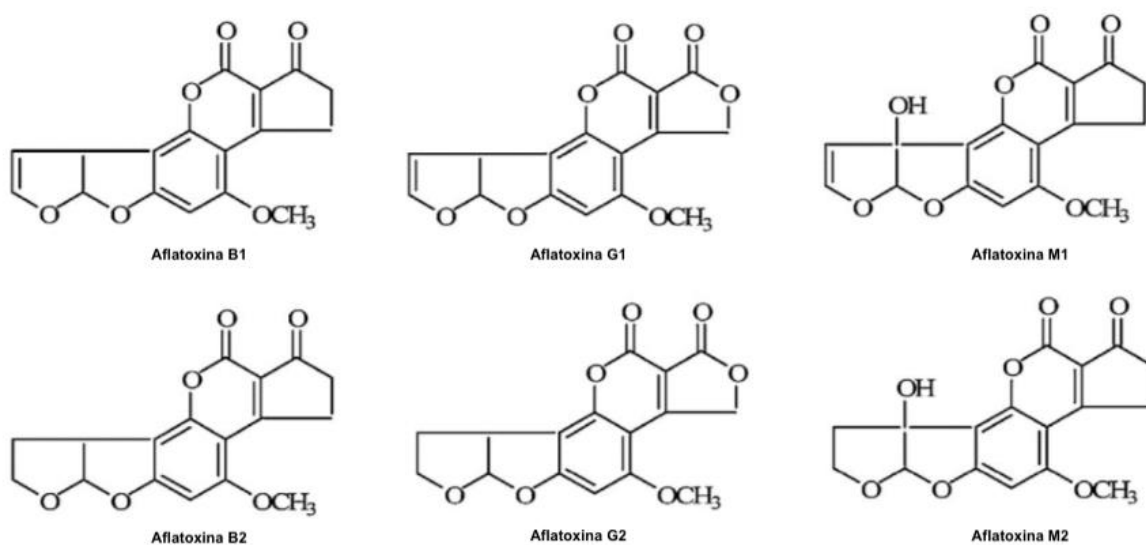


Figura 1 - Estrutura química de AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1 e AFM2 (adaptado de Jiang *et al.*, 2021).

A via de biossíntese de aflatoxinas é constituída por pelo menos 18 etapas enzimáticas e 25 genes que codificam as enzimas e vias regulatórias (Mahato *et al.*, 2019). A via é iniciada com acetil coenzima A e melonil coenzima A que formam hexanoilcoenzima A, que após conversões adicionais produz ácido norsolorínico. Existem desde o ácido norsolorínico até à O-metilesterigmatocistina, vários intermediários (averantina; 5'-hidroxiaverantina; averufina; acetato versiconal; versiconal; versicolorina B; versicolorina A; demetilesterigmatocistina e esterigmatocistina) que levam à formação de AFB1, AFG1, AFB2 e AFG2 (Yu, Bhatnagar e Ehrlich, 2002). Todas as etapas de síntese de AFB1 e AFG1 são iguais às de AFB2 e AFG2, exceto que as últimas formam dihidrodemetilesterigmatocistina a partir da versicolorina B (Yu, 2012).

2.3. ABSORÇÃO, METABOLISMO E EXCREÇÃO

Apesar da ingestão ser a principal via de entrada de aflatoxinas no organismo, esta também é possível através da inalação de poeiras contaminadas (Abrehame *et al.*, 2023) e em situações muito raras por absorção lenta através da pele (Kumar *et al.*, 2017).

As aflatoxinas são absorvidas por difusão passiva no trato gastrointestinal, principalmente ao nível dos enterócitos do duodeno (Abrehame *et al.*, 2023) para o sistema porta hepático (Benkerroum e Ismail, 2022). Um estudo onde foi administrada uma dose única oral de AFB1 em vitelos demonstrou que a AFB1 é detetada de imediato no plasma após a administração, e que o pico de AFB1 no plasma ocorre após quatro horas da administração (Zhang *et al.*, 2018).

O órgão mais importante na biotransformação das aflatoxinas é o fígado, tanto no Homem como em bovinos. Pela toxicidade que apresenta, a biotransformação da AFB1 tem sido alvo de muitos estudos (Abrehame *et al.*, 2023). O metabolismo da AFB1 pode ser dividido em três fases, a fase de bioativação, de desintoxicação e desconjugação. Na fase I (de bioativação), ocorre a oxidação da AFB1 em metabolitos hidroxilados, tais como, AFM1, Aflatoxina P1 (AFP1), Aflatoxina Q1 (AFQ1) e AFB-8,9-epóxido (Abrehame *et al.*, 2023). O AFB-8,9-epóxido pode ocorrer sob a forma de dois isómeros, a forma endo e a exo. A síntese de AFB-8,9-exo-epóxido, é mediada pelas enzimas do CYP450, presentes principalmente no fígado, mas também em tecidos respiratórios e intestinais (Abrehame *et al.*, 2023). As principais isoformas do CYP450 em humanos são o CYP3A4 e CYP1A2. O AFB-8,9-exo-epóxido apresenta uma elevada toxicidade e carcinogenicidade devido à sua instabilidade, que faz com que tenha a capacidade de se ligar facilmente a ácidos nucleicos para formar adutos (forma molecular resultante da adição direta de duas ou mais moléculas distintas) estáveis com RNA, DNA e proteínas. A AFB-8,9-exo-epóxido tem capacidade de estabelecer ligações covalentes com a guanina no DNA, mais comumente na posição N7 das guaninas, que leva a transversões de guanina-citosina (GC) para timina-adenina (TA) (Wild e Turner, 2002). O CYP1A2 pode catalisar a epoxidação de AFB1, que resulta na formação de endo-epóxido, e a hidroxilação de AFB1, formando AFM1 (Rushing e Selim, 2019). Os CYP3A4 e CYP1A2 não só são mediadores da oxidação de AFB1 para epóxidos e AFM1, como também levam à formação de AFQ1 (metabolito hidroxilado) e AFP1 (metabolito por desmetilação), que tal como AFM1 são potenciais produtos de desintoxicação uma vez que representam substratos menos potentes para epoxidação do que AFB1 (Abrehame *et al.*, 2023).

A fase II, ocorre no fígado e envolve processos de desintoxicação que podem ocorrer por diversas vias. A principal ocorre através da conjugação de exo-epóxido com glutathiona (GSH), mediada pela glutathiona S-transferase. Outra via de desintoxicação ocorre sem o envolvimento de nenhuma enzima,

pela hidrólise de exo-epóxido com formação de AFB1-8,9-di-hidrodiol, que passará a dialdeído. Os dialdeídos AFB1 não se ligam ao DNA, mas formam bases de Schiff com grupos de amina primários, como é o caso da lisina, para formar adutos proteicos, tais como, o aduto aflatoxina-albumina (Gratz, 2007).

Nos bovinos, parte da AFB1 ingerida é degradada pela microbiota ruminal e transformada em aflatoxicol (Zentai *et al.*, 2023). A enzima de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) pode reduzir a AFB1 a aflatoxicol, mas este produto de desintoxicação pode ser reoxidado de volta a AFB1 por ação de uma desidrogenase microsomal. Assim, o aflatoxicol funciona como um reservatório *in vivo* de AFB1 (Abrehame *et al.*, 2023). Os ruminantes são considerados menos sensíveis às micotoxinas que os animais monogástricos devido à presença do rúmen e respetiva microbiota capaz de proceder à desintoxicação de parte de AFB1 (Zentai *et al.*, 2023). A restante AFB1 passa ao intestino, onde, por difusão passiva, vai para o sangue e é transportada para o fígado. Tal como descrito no Homem, é também no fígado que ocorre a formação de diversos metabolitos tais como AFM1, AFB1-8,9-epóxido, entre outros (Zentai *et al.*, 2023).

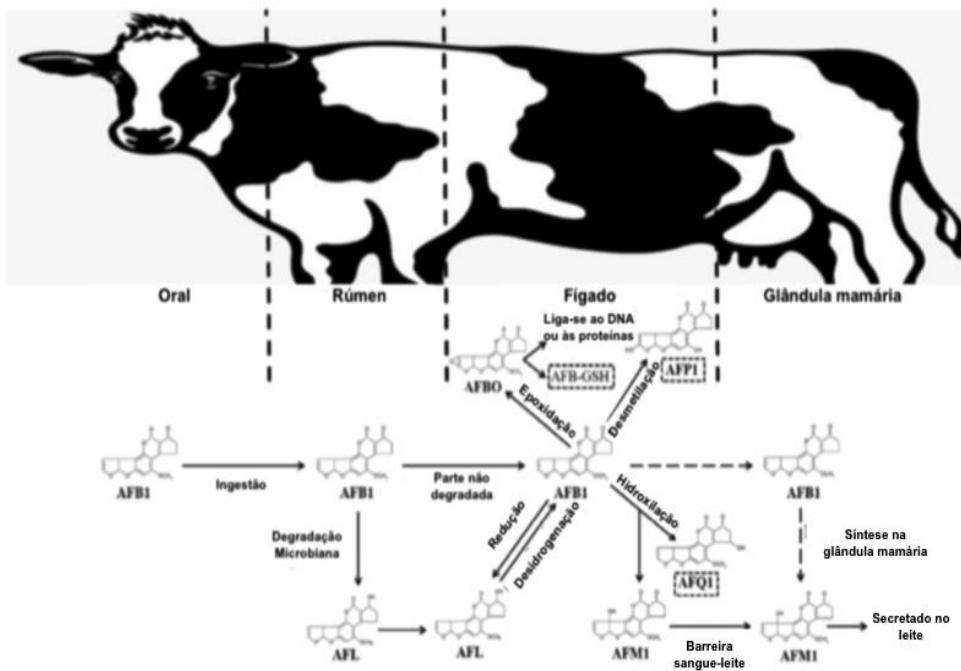


Figura 2 - Vias de metabolismo da Aflatoxina B1 em bovinos (adaptado de Min *et al.* 2021).

AFL: aflatoxicol; AFB-GSH: aduto de aflatoxina-glutationa; AFBO: AFB1-8,9-epóxido.

Considera-se que as variações na expressão do sistema do CYP450 e da glutatona transferase contribuem para as diferenças observadas na suscetibilidade interespecies à aflatoxina (Schrenk *et al.*, 2020). Dentro da mesma espécie também pode haver variações, como é o caso do CYP3A5, cuja expressão em humanos é variável (Awuchi *et al.*, 2022) podendo inclusive estar ausente, como se verifica em 40% dos indivíduos afro-americanos (Wild e Turner, 2002).

A fase III, de desconjugação bacteriana, ocorre quando os epóxidos conjugados e hidroxilados, são excretados através da bÍlis pelo trato intestinal, sendo alguns reabsorvidos devido à desconjugação microbiana intestinal (Abrehame *et al.*, 2023).

A excreção de AFB1 e dos seus metabolitos acontece principalmente através das fezes e da urina (Abrehame *et al.*, 2023). A AFM1 é excretada no leite, em mamíferos lactantes, e através da urina (Zhang *et al.*, 2018). Outros metabolitos de AFB1 como a AFQ1, a AFP1 e a AFB1-N7-guanina livre também são excretados através da urina (Schrenk *et al.*, 2020). Antes da excreção, os metabolitos podem ser acumulados no fígado, rins e outras partes do organismo (Kuilman, Maas e Fink-Gremmels, 2000). No caso de animais para consumo humano, a acumulação em partes edÍveis torna-se um problema de saúde pública (Zentai *et al.*, 2023).

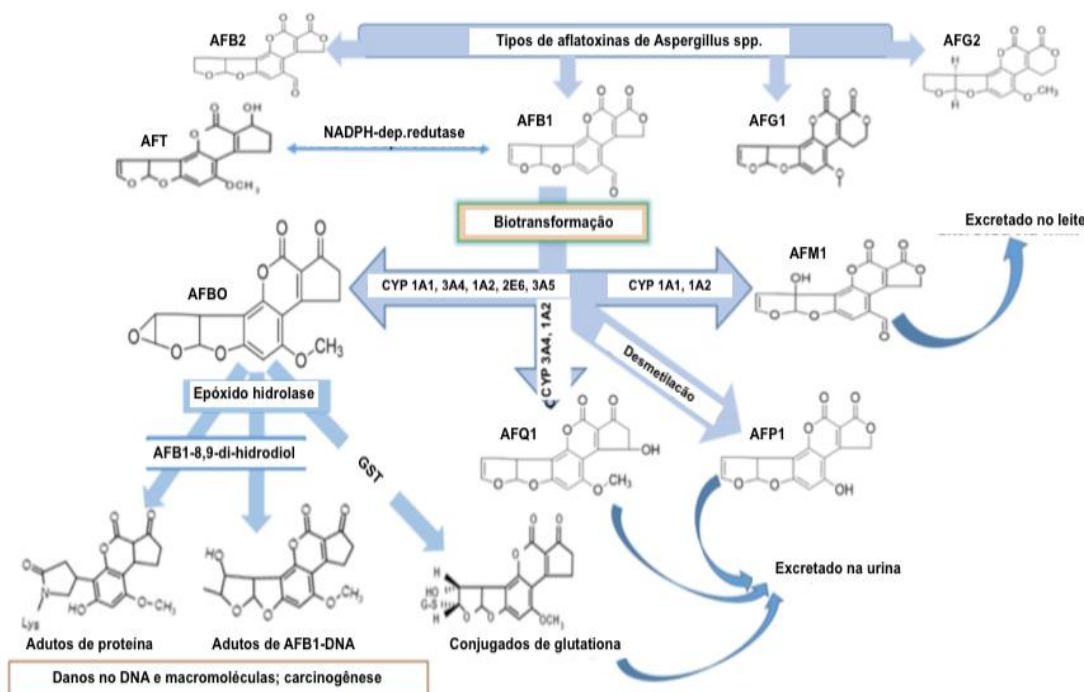


Figura 3 - Vias de metabolismo da Aflatoxina B1 no Homem (Adaptado de Abrehame *et al.*, 2023).

CYP: Citocromo P450; GST: Glutatona S-transferase; AFT: Aflatoxicol.

3. IMPACTO NA BOVINICULTURA DE LEITE

3.1. OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS EM ALIMENTO PARA ANIMAIS

A intoxicação de bovinos leiteiros por aflatoxinas ocorre principalmente pela ingestão de alimento contaminado. A presença de aflatoxinas é mais comum quando os alimentos são produzidos em climas quentes e húmidos (Jiang *et al.*, 2021). Podem ser encontradas em diversas culturas frequentemente utilizadas para a alimentação de ruminantes, como, cereais (por exemplo o milho), produtos de soja, sementes de girassol e sementes de algodão. O milho é das culturas mais propícias à contaminação por aflatoxinas (Fink-Gremmels, 2008).

Atualmente a ração total mista (TMR, do inglês *total mix ration*) é o principal método utilizado na alimentação de bovinos leiteiros de alta produção. O TMR é constituído por diferentes proporções de silagem, matérias-primas, subprodutos, grãos e suplementos. É importante em sistemas de produção animal conhecer-se bem a origem das matérias-primas e produtos utilizadas, assim como, as condições em que foram armazenadas e como foi efetuado o processamento. A contaminação de aflatoxinas no TMR pode ter origem em diversos ingredientes sendo por isso importante conhecer todos os componentes (Martins *et al.*, 2024). A silagem de milho é das forragens mais utilizadas na alimentação de vacas leiteiras e é também uma fonte significativa de contaminação. A composição rica em proteínas e polissacarídeos das espigas e folhas do milho, é considerada um fator predisponente à proliferação e crescimento de fungos (Martins *et al.*, 2024). De acordo com Battilani, P. *et al.* (2016), prevê-se que nos próximos anos ocorra na Europa central e sul, um aumento do risco de contaminação do milho por aflatoxinas, devido às alterações climáticas. Os países do norte da Europa, atualmente considerada uma zona “segura”, relativamente à ocorrência de contaminação por aflatoxinas, podem vir a defrontar-se com a presença das mesmas em consequência das alterações climáticas (Battilani *et al.*, 2016).

Num programa de vigilância mundial de risco de ocorrência de micotoxinas em matérias-primas de alimentação animal (DSM® world mycotoxin survey 2023, www.dsm.com), o risco é expresso como a percentagem de amostras que testam positivo (acima do limite, em ppm: Aflatoxinas-2; Zearalenona-50; Desoxinivalenol-150; T2-50; Fumonisin-500; Ocratoxina A-10) para pelo menos uma micotoxina. De acordo com este relatório, no ano de 2023, o sul da Europa apresentou um risco de contaminação por micotoxinas de 51% a 75%, sendo as micotoxinas com maior prevalência as fumonisin, seguidas da zearalenona e da desoxinivalenol e como quarta micotoxina mais prevalente está a aflatoxina, com uma prevalência de 49%. Nas amostras analisadas a AFB1 foi a aflatoxina mais

detetada seguida de AFB2. Na Ásia 66% das amostras de alimento para animais estavam contaminadas com aflatoxinas. Em amostras de ração para ruminantes as micotoxinas mais prevalentes foram a desoxivalenol, seguida da zearalenona, com as fumonisinas em 3º lugar e as aflatoxinas em 4º lugar com 26% das amostras contaminadas. Verificou-se também que 61% das amostras apresentaram co-contaminação (dsm-firmenich, 2024). Também Huang, S. *et al.* (2017) referem que os alimentos destinados a animais estão normalmente contaminados por mais que um tipo de micotoxinas, principalmente em rações para ruminantes que são constituídas por várias fontes de cereais, forragens e diferentes tipos de fungos. A combinação de diferentes micotoxinas pode resultar em efeitos tóxicos aditivos, sinérgicos ou antagónicos, sendo, contudo, o conhecimento relativo aos efeitos tóxicos provocados pela co-contaminação por micotoxinas ainda limitado. Considera-se que a aflatoxina em culturas de cereais está maioritariamente conjugada com a fumonisina e ocratoxina A. A co-contaminação de culturas, principalmente de milho, por aflatoxinas e fumonisinas é mais prevalente na Ásia, África e América do sul (Smith *et al.*, 2016).

Num estudo realizado no norte de Itália entre 2013 e 2021 observou-se que 5,7% das amostras de ingredientes utilizados na alimentação animal recolhidas excederam os limites legais regulamentados pela UE para a AFB1. Os constituintes das rações que apresentaram uma maior percentagem de contaminação por AFB1 foram a farinha, grão de milho e a semente de algodão (Ferrari *et al.*, 2022).

A Diretiva 2002/32/CE do Parlamento Europeu, do Conselho de 7 de maio de 2002, estabeleceu o limite de 5,0 µg/kg de AFB1 no alimento composto destinado a vacas de produção leiteira, expresso num teor de humidade de 12%.

3.2. CONSEQUÊNCIAS NA SAÚDE DE VACAS LEITEIRAS

A suscetibilidade de cada animal às aflatoxinas varia consoante diversos fatores, tais como, a dose a que são expostos, a duração da exposição, idade, fase de produção, fatores de nutrição (Gott e Schwandt, 2021) e a intoxicação por diferentes micotoxinas simultaneamente (Fink-Gremmels, 2008). Consideram-se os vitelos mais suscetíveis às aflatoxinas do que bovinos adultos, principalmente pela menor capacidade do fígado para desintoxicar a AFB1 e por ainda funcionarem como animais monogástricos, contudo podem apresentar sinais clínicos semelhantes. A exposição precoce de vitelos a AFM1 prejudica o seu desenvolvimento e a produtividade futura (Min *et al.*, 2021).

A aflatoxicose em bovinos pode ser classificada como aguda ou crónica (Marroquín-Cardona *et al.*, 2014). As aflatoxicoses agudas estão normalmente associadas à ingestão de doses elevadas de

aflatoxinas, mais comum em surtos esporádicos onde há o consumo de alimento altamente contaminado (Kebede, Balina e Tamiru, 2018). A aflatoxicose crônica resulta de uma ingestão de níveis baixos a moderados de alimento contaminado com aflatoxinas, durante um período prolongado (Abreham *et al.*, 2023). Em bovinos as aflatoxinas provocam principalmente doença hepática. Nas aflatoxicoses agudas os principais sinais clínicos descritos são anorexia, perda de peso e redução da produção de leite. Em situações crônicas há redução do desempenho reprodutivo, imunossupressão e redução da eficiência alimentar (Robens e Richard, 1992). Também pode ocorrer redução da fertilidade tanto em fêmeas como em machos. Em machos está descrita a diminuição da viabilidade espermática resultante da diminuição da integridade das membranas plasmática e mitocondrial e da integridade do DNA. Nas fêmeas as aflatoxinas prejudicam o oócito e o embrião antes da implantação, devido ao aumento de produção de espécies reativas de oxigênio que provocam (Jiang *et al.*, 2021).

A imunossupressão é outra das consequências da aflatoxicose. Reduz a resistência a doenças e a eficácia da resposta vacinal. Alguns estudos relatam pneumonia em vitelos que consideraram ser consequência da imunossupressão e secundária ao edema (Coppock, Christian e Jacobsen, 2018).

A aflatoxicose aguda provoca alterações nos parâmetros clinicopatológicos com aumento da atividade das enzimas hepáticas no soro, consequência de lesão hepática. As enzimas γ -glutamil transpeptidase (GGT), a aspartato aminotransferase (AST) e a sorbitol desidrogenase (SDH) são aquelas cujo aumento é mais frequentemente associado a aflatoxicose (Coppock, Christian e Jacobsen, 2018). O momento da determinação dos níveis de enzimas hepáticos é importante na interpretação dos resultados na patogênese da aflatoxicose. Durante a recuperação a diminuição da atividade da GGT ocorre mais lentamente que a da AST. Frequentemente a aflatoxicose também se acompanha pelo aumento dos níveis séricos de bilirrubina e consequente icterícia (Coppock, Christian e Jacobsen, 2018). Em situações muito agudas de aflatoxicose, ocorre diminuição da produção de fatores de coagulação pelo fígado, o que pode provocar hemorragias graves ao nível do trato gastrointestinal, serosas, epicárdio, endocárdio, músculo-esquelético, zona perirrenal e bexiga. Foram também descritos casos de fotossensibilidade associada a intoxicação por aflatoxinas, assim como, edema perirrenal e da vesícula biliar (Coppock, Christian e Jacobsen, 2018).

Na histopatologia é possível observar em casos de aflatoxicose, a proliferação do ducto biliar, fibrose do fígado e necrose de hepatócitos. Histologicamente, em bovinos, observa-se necrose centrolobular e hiperplasia das células do ducto biliar. O padrão de necrose do fígado varia entre espécies (Coppock, Christian e Jacobsen, 2018).

Foi relatado um surto de aflatoxicose em 1980, num grupo de noventa bezerros da raça Hereford, alimentados com feno de amendoim contaminado. Os bezerros afetados apresentaram sinais clínicos diversos, tais como anorexia, icterícia, fotossensibilidade em pele não pigmentada, edema submandibular e alguns animais tiveram episódios de diarreia e disenteria. O primeiro vitelo morreu apenas cinco dias após a colocação do feno de amendoim na dieta. As necropsias realizadas a três animais revelaram fígados castanhos-amarelados, icterícia severa, vesícula biliar aumentada com conteúdo biliar aquoso, queratoconjuntivite e edema de tecidos subcutâneos, mesentério e parede abomasal. Os fígados analisados histologicamente apresentaram hepatócitos aumentados, vacuolização, necrose de hepatócitos, principalmente nas áreas centrolobular, e proliferação de ductos biliares nos espaços porta (Mckenzie, Blaney e Fitzpatrick, 1981).

Num estudo realizado em dez vacas Holsteins, em ordenha, foram administradas aflatoxinas duas vezes ao dia, através de fístula ruminal. Seis das dez vacas receberam 13 mg de AFB1 puro por dia, três vacas receberam 13 mg de AFB1 impuro por dia, e uma recebeu 25 mg de AFB1 puro por dia, durante sete dias. A forma impura continha AFB1, assim como outras aflatoxinas e metabolitos produzidos por *A. parasiticus*. As vacas onde se verificou uma maior diminuição na produção de leite foram aquelas às quais foi administrado AFB1 impuro. A forma não pura de AFB1 é a mais provável de contaminar os alimentos no campo ou numa exploração. Considera-se que ocorrem maiores variações quando é administrada a forma impura devido aos efeitos de sinergismo de diferentes tipos de aflatoxinas, bem como outros metabolitos (Applebaum *et al.*, 1982).

3.3. AFLATOXINA M1 NO LEITE

A AFM1 é um metabolito hidroxilado da AFB1, em mamíferos. A conversão de AFB1 ingerida para AFM1 ocorre no fígado sendo posteriormente conjugada a ácido glucorónico e excretada através da bÍlis ou entra na circulação sistémica. A AFM1 circulante pode ser excretada através da urina ou no leite (Fink-Gremmels, 2008). A AFM1 ao entrar na circulação sanguínea atinge a glândula mamária onde é excretada no leite por difusão passiva ou transporte ativo (Min *et al.*, 2021).

O nível de conversão de AFB1 para AFM1 varia entre espécies. A conversão de AFB1 ingerido para AFM1 excretado no leite, em bovinos de leite, varia entre 0,3% a 6,2% (Iqbal *et al.*, 2015). As AFM1 aparecem no leite 12 a 48 horas após ingestão de alimentos contaminados por AFB1 (Coppock, Christian e Jacobsen, 2018; Zentai *et al.*, 2023) e após ser retirada a fonte de contaminação da dieta desaparecem dentro de três a quatro dias (Zentai *et al.*, 2023).

A fase da lactação é um dos fatores que faz variar a quantidade de AFM1 excretada no leite. As vacas no início de lactação excretam maiores concentrações de AFM1 que vacas no final de lactação, momento em que a quantidade de leite produzida diminui naturalmente. Uma das hipóteses que justifica uma maior concentração de AFM1 no leite de vacas em início de lactação é o facto da permeabilidade do úbere nesta fase estar aumentada (Zentai *et al.*, 2023). Existem outros fatores que fazem variar a excreção de AFM1 no leite tais como, tipo de dieta, nível de contaminação do alimento, quantidade ingerida, raça, nível de produção, saúde dos bovinos e variações sazonais (Iqbal *et al.*, 2015). Num estudo de Britzi *et al.* (2013), administrou-se diariamente AFB1 por via oral a 12 vacas de leite de alta produção, ordenhadas três vezes ao dia, no meio da lactação ou no final da lactação, cuja média diária de lactação era de $44,7 \pm 5,7$ kg e $29,8 \pm 2,6$ kg, respetivamente. Durante o período em que foi administrada AFB1 a concentração de AFM1 no leite de vacas a meio da lactação foi de 0,06-0,21 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e em vacas em final de lactação foi de 0,03–0,09 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Os níveis de AFM1 diminuíram rapidamente após remoção da AFB1 na alimentação. Um dia após a última administração de AFB1 os níveis de AFM1 no leite eram já inferiores a 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em todas as amostras de leite (Britzi *et al.*, 2013).

As AFM1 têm a capacidade de se ligarem às proteínas do leite, com cerca de 75% da AFM1 retidas no interior da caseína e 25% no soro do leite (Coppock, Christian e Jacobsen, 2018). A AFM1 é um metabolito extremamente estável mesmo em processos de fermentação, aquecimento e armazenamento. Por essa razão produtos lácteos processados, tais como queijo, leite em pó e iogurtes são também possíveis fontes de AFM1 na alimentação humana. Existem, contudo, alguns métodos de processamento que fazem diminuir os níveis de AFM1, como é o caso da produção de iogurte. Considera-se que a diminuição dos níveis de AFM1 no iogurte se deva à diminuição de pH do meio, produção de subprodutos resultantes da fermentação e pela presença de *Lactobacillus* sp. (Iqbal *et al.*, 2015).

Apesar de ter sido definido, um limite de 0,050 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para AFM1 no “leite cru”, leite tratado termicamente e leite para o fabrico de produtos lácteos, na UE (Regulamento (CE) Nº.1881/2006 da comissão, de 19 de dezembro de 2006), alguns estudos têm vindo a demonstrar que os limites regulamentados, por exemplo pela FDA, para o alimento de vacas de leite, não protegem contra a violação dos limites máximos de AFM1 (tabela 1) no leite resultante (Churchill, 2017). Um estudo recentemente realizado nos EUA, utilizou três grupos de 12 vacas Holstein de alta produção, em início e meio de lactação, para estudar os níveis de conversão de AFB1 em AFM1, excretado no leite. Estas vacas ingeriram farinha de milho, com diferentes concentrações de AFB1, mas nunca acima do limite

máximo legalmente estabelecido. Confirmou-se durante este estudo que, mesmo durante a ingestão de quantidades de AFB1 abaixo do nível regulamentado para a ração de animais, houve uma conversão para AFM1 e excreção para o leite que atingiu valores acima do que é o limite máximo regulamentado para este produto (Churchill, 2017).

4. IMPACTO PARA O HOMEM

4.1. CONSEQUÊNCIAS NA SAÚDE HUMANA

A exposição humana às aflatoxinas resulta mais frequentemente da ingestão de alimentos derivados de culturas contaminadas e de produtos de origem animal, como leite e carne (Wayne, 2019). Há também a possibilidade da exposição de bebês às aflatoxinas através da exposição materna durante a gravidez. Em alguns estudos já foram detetadas AFB1 e metabolitos de AFB1 no sangue do cordão umbilical de alguns bebês. Considera-se inclusive, que a placenta humana tem a capacidade de formar aflatoxicol (Partanen *et al.*, 2009).

As consequências da exposição do homem a aflatoxinas e seus metabolitos são variadas, podendo provocar efeitos agudos e até causar morte, ou efeitos crônicos, nos quais se inclui o carcinoma hepatocelular (Groopman, Kensler e Wild, 2008).

Na década de 1970 foi relatado um surto no Oeste da Índia resultante de aflatoxinas presentes no milho, onde foram declaradas pelo menos 97 mortes. Já na década de 1980 no Quênia está descrito um surto de aflatoxicose, também causado pelo consumo de milho contaminado. Um dos maiores surtos de aflatoxicose também ocorreu no Quênia em Abril de 2004, com origem em milho contaminado, tendo sido descritos 317 casos e 125 mortes (Groopman, Kensler e Wild, 2008).

Em vários surtos de aflatoxicose aguda em humanos, que ocorrem principalmente em países em desenvolvimento, foram descritos sinais clínicos como vômitos, dor abdominal, edema pulmonar, hipoglicemia, convulsões, coma e icterícia (Kensler *et al.*, 2010). O fígado normalmente sofre processos de necrose e ocorre deposição de gordura (Abrehame *et al.*, 2023). Histologicamente o fígado revela, com frequência, extensa proliferação dos ductos biliares (Groopman, Kensler e Wild, 2008).

Apesar da AFM1 apresentar menor toxicidade do que a AFB1, apresenta também uma elevada carcinogenicidade, mutagenicidade, genotoxicidade, teratogenicidade e imunossupressão, mesmo quando em baixas concentrações (Patyal *et al.*, 2020), sendo por isso também classificada como cancerígeno humano do Grupo 1 pelo IARC (2012). A AFM1 é prejudicial para a saúde do homem, mas

são as crianças o maior motivo de preocupação, tendo em conta que é esta a faixa etária que consome maiores quantidades de leite e produtos lácteos e que têm uma baixa capacidade para eliminação de toxinas e um menor peso corporal (Patyal *et al.*, 2020). Vários estudos descrevem como consequência da exposição crónica a aflatoxinas, uma menor taxa de crescimento em crianças (Groopman, Kensler e Wild, 2008) assim como imunodepressão (Wayne, 2019). O atraso no crescimento em crianças associado à exposição de AFM1 é a consequência mais relatada. Em países Subsaarianos da África, onde a incidência de aflatoxinas é elevada, foi relatada, nos anos de 2015 e 2016, em crianças com menos de cinco anos de idade, uma prevalência de nanismo de cerca de 38% e 22% de emaciação. As etiologias associadas ao nanismo e emaciação são variadas, mas é importante não ignorar que a exposição a aflatoxinas é uma delas. É relatado, em crianças que foram expostas a AFB1, imunomodulação e doenças gastrointestinais que provocam má digestão e má absorção de nutrientes. As doenças inflamatórias intestinais e sistémicas podem originar alterações das funções do sistema nervoso central levando a condições neuropsiquiátricas, como por exemplo o autismo (Benkerroum e Ismail, 2022). Foi também já confirmado que AFM1 tem a capacidade de se ligar ao DNA provocando mutações (Min *et al.*, 2021).

Um dos metabolitos da AFB1 é a aflatoxina B1-8,9-epóxido, que tem capacidade de se ligar ao DNA provocando mutações (Turner *et al.*, 2002). Na maioria dos cancros humanos está presente uma mutação no gene P53, considerado o gene supressor de tumor. Através de vários estudos percebeu-se que existe uma prevalência de mutações no codão 249, do gene P53, em casos de carcinoma hepatocelular, que ocorre maioritariamente em pacientes com infeção pelo vírus da hepatite B e simultaneamente em zonas com elevados níveis de exposição a AFB1 (Groopman e kensler, 2005). Considera-se, portanto, que pessoas cronicamente infetadas com o vírus da hepatite B estão mais predispostas a cancro no fígado quando expostas a aflatoxinas (Turner *et al.*, 2002). A deteção de mutações específicas do gene P53 em carcinomas hepatocelulares não só tem fornecido muitas informações acerca da sua etiologia, como também, tem vindo a ser investigada como forma de deteção precoce do cancro (Groopman e Kensler, 2005). O carcinoma hepatocelular é uma das principais causas de morbilidade e mortalidade por doença oncológica em todo o mundo, principalmente em zonas como Ásia e África Subsariana. Mais de 80% dos casos de carcinoma hepatocelular ocorrem em países em desenvolvimento, onde a exposição a aflatoxinas é mais elevada (Kensler *et al.*, 2010).

4.2. IMPACTO ECONÓMICO

O impacto económico causado pelas aflatoxinas está associado a diversos fatores, desde a redução da qualidade de alimentos para humanos e animais, redução da produtividade de animais de produção causada pela aflatoxicose, custos associados ao tratamento de aflatoxicoses ou associados a métodos de deteção, quantificação e métodos de controlo. Adquirir alimentos seguros normalmente exige também maior custo do alimento (Marroquín-Cardona *et al.*, 2014). Todos os produtos destinados a alimentação humana, por vezes já processados e no mercado, que são detetados com contaminações por aflatoxinas acima do regulamentado, têm de ser retirados do mercado (Marroquín-Cardona *et al.*, 2014). Esses alimentos ou matérias-primas podem ser utilizadas para fins menos rentáveis, como alimentos para animais, ou podem mesmo ser destruídas o que também resulta em custos adicionais (Rushing e Selim, 2019).

Parte da oferta mundial de alimento é produzida por países em desenvolvimento. Os produtos originários destes países, são inspecionados e analisados antes da exportação, a qual fica interdita no caso de terem níveis de aflatoxinas acima do regulamentado pelo país recetor. Esses mesmos produtos ficam frequentemente no país de origem para consumo interno em alimentação tanto humano como animal, o que representa um problema para a saúde pública (Marroquín-Cardona *et al.*, 2014).

É impossível determinar com precisão o impacto económico das micotoxinas. A sua quantificação foi estimada por modelos complexos pela FDA nos EUA. O modelo incluiu apenas os custos consequentes da contaminação por aflatoxinas, fumonisinas e desoxinivalenol. Estimou-se que as perdas de colheita sejam de 932 milhões de dólares por ano. Os custos associados ao controlo e mitigação das micotoxinas são avaliados em 466 milhões de dólares e estimou-se um prejuízo anual na produção animal de cerca de 6 milhões de dólares (Council for Agricultural Science and Technology, 2003). O milho é a cultura com maior relevância a nível económico nos EUA, contribuindo com cerca de 75 mil milhões de dólares para a economia do país, sendo a aflatoxina a micotoxina mais preocupante (Mitchell *et al.*, 2016). Estimou-se que a perda provocada pelas aflatoxinas em culturas alimentares de milho e amendoim foi cerca de 47 milhões de dólares e para culturas de milho destinadas à alimentação animal foi de 225 milhões de dólares por ano, somando ainda os custos associados à produtividade e saúde animal de cerca de 4 milhões de dólares por ano (Council for Agricultural Science and Technology, 2003).

5. MÉTODOS DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AFLATOXINAS

Existem diversas metodologias para identificar e quantificar aflatoxinas quer nos alimentos, quer no leite (no caso da AFM1). Os métodos utilizados dependem do objetivo pretendido e do tipo de amostra utilizada, mas normalmente requerem etapas de amostragem, preparação da amostra com etapas de extração e purificação e só depois se realiza a análise de identificação e/ou de quantificação (Trucksess e Diaz-Amigo, 2019; Jaimez *et al.*, 2000).

5.1. AMOSTRAGEM

A etapa de amostragem é de extrema importância para qualquer que seja o método analítico de determinação ou quantificação de aflatoxinas. É importante recolher uma amostra o mais representativa possível da totalidade, o que implica a recolha de diferentes subamostras (Jaimez *et al.*, 2000; Coppock, Christian e Jacobsen, 2018). As aflatoxinas em produtos sólidos têm uma distribuição muito heterogénea podendo haver acumulação em “pontos críticos”. A imprecisão associada à análise de aflatoxinas diminui quanto maior for o tamanho da amostra, o grau de moagem, tamanho e número de subamostras (Vaz *et al.*, 2020). A comissão europeia regulamentou os métodos para realização de amostragem em análises oficiais; cada tipo de amostra tem especificidades diferentes, sendo a principal variável o volume a ser recolhido. Quanto maior a dimensão do produto em questão maior será a dificuldade em recolher uma amostra representativa. Assim definiu-se que nos lotes de produtos com partículas grandes o peso da amostra global deve ser superior ao das amostras de lotes com produtos mais pequenos. O leite, pela sua natureza líquida, está associado a um menor grau de imprecisão por amostragem inadequada. No caso do leite o regulamento da comissão europeia 401/2006 estabelece que para realizar uma amostragem correta devem ser colhidas três a dez subamostras de, no mínimo, 100 g perfazendo uma amostra global de no mínimo 1 L (Regulamento (CE) Nº 401/2006 da Comissão, de 23 de fevereiro de 2006).

5.2. EXTRAÇÃO E LIMPEZA

As aflatoxinas são caracterizadas por serem solúveis em solventes polares, como tal para efetuar a extração de aflatoxinas utilizam-se solventes orgânicos polares (por exemplo: acetona, o acetonitrilo, o clorofórmio e o metanol) misturados com água que promove a penetração do solvente polar no alimento. Podem ser utilizados solventes apolares para remoção de componentes lipofílicos (Jaimez *et al.*, 2000). Os métodos de extração mais utilizados são a extração líquido-líquido (LLE), extração líquido-sólido (LSE) e método de extração em fase sólida (SPE). O método LLE e LSE são métodos

simples e baratos que se baseiam na solubilidade de aflatoxinas, como tal é importante ter um solvente de extração apropriado. O método SPE é um tipo de extração baseado em colunas onde se utilizam quantidades significativas de solventes orgânicos tóxicos, além disso é um método demorado (Abrehame *et al.*, 2023; Miklós *et al.*, 2020).

A limpeza é uma etapa essencial para o procedimento de detecção e/ou quantificação, principalmente quando há contaminação cruzada por várias aflatoxinas, podendo ser efetuada através de colunas de imunoafinidade (IAC). A amostra é colocada numa coluna de imunoafinidade que contém anticorpos específicos. A aflatoxina liga-se aos anticorpos durante o percurso na coluna. Após limpeza da coluna apenas as aflatoxinas ficam retidas. Posteriormente, as aflatoxinas são recuperadas com a utilização de solventes polares, que quebram as ligações entre as aflatoxinas e os anticorpos. Esta técnica tem elevada especificidade e é considerada simples de se realizar (Vaz *et al.*, 2020).

5.3. TÉCNICAS DE CROMATOGRAFIA

A técnica de cromatografia é dos métodos analíticos mais utilizado para a detecção de aflatoxinas. Este método baseia-se em propriedades fotofísicas das aflatoxinas, que apresentam absorção em 360nm (Abrehame *et al.*, 2023). Existem diversas técnicas de cromatografia sendo as mais frequentemente utilizadas a cromatografia em camada fina (TLC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Estes são métodos com elevada sensibilidade, porém são técnicas dispendiosas que exigem vários cuidados na preparação das amostras (Jaimez *et al.*, 2000). Antes da HPLC surgir, a TLC era a técnica mais utilizada para análise de aflatoxinas. A TLC é constituída por uma fase estacionária e uma fase móvel que consiste numa mistura de solventes. Coloca-se a amostra na fase estacionária, a placa cromatográfica é colocada na vertical num reservatório de solvente que se move por capilaridade. Quando o solvente atinge a extremidade superior retira-se o reservatório de solvente, e é pulverizado um reagente sobre a placa, para posterior visualização das aflatoxinas em luz UV (Miklós *et al.*, 2020; Mahfuz *et al.*, 2018). No entanto o método de HPLC é considerado mais sensível do que TLC, que é mais barato, mas é suscetível a algumas imprecisões por ação de humidade, temperatura, proporções erradas de solventes entre outros fatores (Abrehame *et al.*, 2023).

A técnica de HPLC é atualmente o método de eleição para determinação de aflatoxinas. Inicialmente a HPLC era realizada em fase estacionária normal e com radiação UV, porém não permitia detetar níveis suficientemente baixos de aflatoxinas. Atualmente a HPLC tem sido usado com absorção UV, fluorescência, espectrometria de massa e detetores amperimétricos. Esta técnica é constituída por uma fase móvel, que é um solvente, e uma fase estacionária líquida imobilizada. A separação dos

compostos ocorre quando a amostra colocada entre as duas fases atravessa a coluna pela diferença de coeficientes de partição. A fase estacionária pode ser em fase normal ou em fase reversa. Na fase normal a fase móvel é apolar e a fase estacionária é polar, como tal, os componentes polares ficam na fase estacionária e são eluídos posteriormente. No caso de ser HPLC com fase reversa, utilizado mais frequentemente, a fase móvel é polar e a estacionária é apolar logo os componentes apolares são os últimos a serem eluídos. Para melhorar os limites de deteção procede-se com frequência a uma limpeza pré ou pós-coluna (exemplo: IAC) (Mahfuz *et al.*, 2018).

Uma forma modificada de HPLC é a cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massa (LC-MS/MS), que apresenta limites de deteção baixos e capacidade de detetar vários tipos de micotoxinas numa mesma amostra (Abrehame *et al.*, 2023; Mahfuz *et al.*, 2018), porém é uma técnica muito dispendiosa e complexa (Miklós *et al.*, 2020).

5.4. TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS

O método de Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) baseia-se na interação entre um anticorpo e um antígeno e é normalmente utilizado como método de triagem semi-quantitativa (Miklós *et al.*, 2020). O método de ELISA apresenta boa precisão e sensibilidade e normalmente não requer pré-tratamento da amostra (Abrehame *et al.*, 2023).

Num estudo realizado por Zheng *et al.* (2005) cujo objetivo era avaliar um Kit de ELISA *AgraQuant*[®] para a deteção de aflatoxinas em cereais e derivados (arroz, trigo, milho, entre outros) comparando com o método HPLC, foi demonstrada uma boa exatidão e precisão para este tipo de produtos. Foi possível a quantificação de aflatoxinas entre 4-40 µg/kg, com LOD no arroz de 2,8 µg/kg.

Existem múltiplos formatos de ELISA, entre eles, os competitivos, direto ou indireto (Motta e Duarte, 2010). No formato competitivo indireto a placa está revestida com anticorpos específicos e são utilizados anticorpos secundários e um conjugado toxina-enzima (Vaz *et al.*, 2020). No método competitivo direto, o anticorpo primário, que se encontra na placa já está marcado com a enzima, não sendo, por isso, necessário anticorpo secundário (Vaz *et al.*, 2020).

O método de ELISA tem sido amplamente utilizado na deteção de AFM1 em diversos produtos lácteos como fórmulas infantis, leite em pó, iogurtes, queijo entre outros (Vaz *et al.*, 2020). É ainda utilizado rotineiramente na triagem de diferentes especiarias (Mahfuz *et al.*, 2018) e também já foi aplicada a diversos alimentos como farinha de milho (Okechukwu *et al.*, 2023).

5.5. MÉTODOS RECENTES

Cada método de deteção apresenta limitações, por isso continua a haver grandes esforços para inovar e apresentar novas abordagens para detetar e quantificar níveis de aflatoxinas de forma rápida, fácil, barata, sem que seja exigida preparação da amostra prévia e com elevada sensibilidade e especificidade.

A utilização de microchips para a deteção de aflatoxinas tem sido alvo de estudo por ser um método rápido, de alto rendimento e com necessidade de pouca quantidade de amostra e reagentes. A utilização de microchips para a deteção de aflatoxinas envolve tecnologias avançadas, como é o caso de biossensores e nanotecnologia (Man *et al.*, 2017). O biossensor é uma ferramenta composta por um sistema de reconhecimento e deteção. Os elementos de reconhecimento incluem aptâmeros, anticorpos, microrganismos, células e enzimas. O sistema de deteção converte o reconhecimento biológico num sinal magnético, ótico ou eletrónico. Um aptâmero é uma sequência específica de DNA ou RNA, e são estes os componentes de reconhecimento com capacidade de se ligarem a elementos específicos. Em comparação com os anticorpos, os aptâmeros demonstram maior afinidade, elevada estabilidade química, produção simples e facilidade de marcação. Já foram desenvolvidos diferentes aptasensores (biossensor que utiliza aptâmero para o reconhecimento) para deteção de AFB1 e AFM1, tais como, fluorescência, calorimetria, eletroquímico e quimiluminescente. Os métodos eletroquímicos e óticos são os mais aplicados no desenvolvimento de aptasensores, sendo que os aptasensores óticos apresentam maior sensibilidade que os eletroquímicos (Danesh *et al.*, 2018). Os biossensores são dispositivos portáteis, simples, rápidos, económicos e específicos para o alvo determinado. No entanto, características como a sensibilidade e a estabilidade devem ainda ser melhoradas (Vaz *et al.*, 2020).

A nanotecnologia pode ser aplicada para a deteção de aflatoxinas através da utilização de nanopartículas de metais preciosos incluindo nanopartículas de ouro (AuNPs) para desenvolvimento de biossensores. As AuNPs quando aplicadas na superfície de um biossensor provocam um aumento na área de superfície específica e a ligação entre AuNPs e o anticorpo origina um aumento de peso que faz com que haja amplificação do sinal do biossensor (Adányi *et al.*, 2018).

6. ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO E CONTROLO

6.1. ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO

Para planear estratégias apropriadas de prevenção de contaminação por aflatoxinas deve-se ter em conta os fatores que influenciam o crescimento de fungos em todas as fases de produção e a via de síntese de micotoxinas (Trucksess e Diaz-Amigo, 2019).

Uma forma que parece ser óbvia para prevenir a exposição a micotoxinas é descartar alimentos com bolor visível, porém é importante ter em conta que as micotoxinas são invisíveis a olho nu (Marroquín-Cardona *et al.*, 2014).

A utilização de um sistema de análise de perigos e controlo de pontos críticos (HACCP) desempenha um papel importante na prevenção e gestão de aflatoxinas, podendo ser aplicado em toda a cadeia de produção alimentar (Kumar *et al.*, 2017).

Uma das formas de prevenção de contaminação, ainda antes da colheita, passa pelas boas práticas agrícolas, através de um fornecimento adequado de nutrientes, evitar uma elevada densidade das plantas, rotação de culturas, uso de inseticidas, fertilizantes, boa irrigação das culturas, para que não haja stress hídrico, e plantio oportuno (Kumar *et al.*, 2017). A escolha das culturas deve ter por base as características dos solos e as condições climáticas, de forma a diminuir ao máximo o stress das plantas, impedindo que se tornem suscetíveis à contaminação por fungos (Monteiro, Gonçalves e Fradinho, 2022).

Na fase de colheita é importante determinar o momento certo para a sua realização, manter o produto protegido contra danos físicos durante o processo, realizar limpeza e secagem adequada. Quando parte da cultura se encontra danificada deve-se proceder à sua remoção (Trucksess e Diaz-Amigo, 2019).

É importante que durante o armazenamento e transporte a humidade seja controlada, assim como a presença de insetos e roedores (Trucksess e Diaz-Amigo, 2019). Além disso, manter baixos os níveis de oxigénio e elevada concentração de dióxido de carbono é também uma forma de prevenção do desenvolvimento de fungos na fase de armazenamento (Jard *et al.*, 2011; Taniwaki *et al.*, 2010).

O milho é um produto que no momento da colheita apresenta elevados níveis de humidade sendo importante proceder à secagem pós-colheita, o mais breve possível (Monteiro, Gonçalves e Fradinho, 2022). Após a colheita, o milho deve ser armazenado durante o inverno a uma humidade de 16 a 17%;

quando para armazenamento a longo prazo o milho pode ser seco a 14% (Iowa State University, 2009), com atividade da água inferior a 0,70 (IARC, 2002).

Alguns antifúngicos baseiam-se na interação entre fungos produtores de micotoxinas e outros microrganismos, como bactérias. Algumas bactérias como *Bacillus subtilis* podem ser utilizadas como inibidoras de fungos produtores de aflatoxinas. *B. subtilis* secreta metabolitos secundários, tais como a iturina A, com capacidade de danificar a membrana celular dos fungos (Peles *et al.*, 2021).

A utilização de variedades não aflatoxigénicas de *A. flavus* e *A. parasiticus*, em culturas suscetíveis a fungos produtores de aflatoxinas, antes da colheita, tem sido uma estratégia promissora no controlo biológico de aflatoxinas nas culturas, durante a pré-colheita (Raksha Rao, Vipin e Venkateswaran, 2020). Este método baseia-se na competição pelos locais de infeção e por nutrientes essenciais, entre as estirpes não aflatoxigénicas e as aflatoxigénicas encontradas na natureza (Council for Agricultural Science and Technology, 2003).

Uma das formas de prevenção que tem vindo a ser desenvolvida, recorre à engenharia genética para a adoção de culturas com resistência genética a fungos como *Aspergillus*. Num estudo foram analisadas quatro linhagens diferentes de milho onde foi comparada a acumulação de aflatoxinas medidas em grãos de milho maduros. A linhagem MP312E apresenta resistência a *A. flavus* e baixo nível de acumulação de aflatoxinas. As linhagens B73 e VA35 são suscetíveis a *A. flavus* com grande taxa de acumulação de aflatoxinas nos grãos. O cruzamento das linhagens Va35 (suscetível) e MP715 (resistente) constitui a linhagem MP04:86 que quanto à resistência e acumulação de aflatoxinas adota os genes resistentes. As linhagens B73 e VA35 são suscetíveis a *A. flavus*, com grande taxa de acumulação de aflatoxinas nos grãos. Posteriormente foram comparados os genes expressos entre os grupos de linhagens de milho resistentes e suscetíveis e percebeu-se que havia vários padrões génicos em comum nas espécies resistentes (Kelley *et al.*, 2012).

6.2. DESCONTAMINAÇÃO DE AFLATOXINAS EM ALIMENTOS

Quando as estratégias de prevenção falham e o alimento fica contaminado por aflatoxinas, podem-se implementar métodos de descontaminação. A descontaminação pode ser de natureza física, química ou biológica (Iqbal, Asi e Ariño, 2013). Os processos de descontaminação têm como objetivo destruir ou inativar aflatoxinas, não devendo provocar alterações no valor nutritivo do alimento nem nas propriedades organolépticas dos produtos. Não deve também ocorrer síntese de novos compostos tóxicos. Os regulamentos não permitem que haja descontaminação de alimentos, destinados a

consumo humano, que tenham valores de aflatoxinas acima dos limites máximos regulamentados (Jard *et al.*, 2011).

Os métodos físicos de descontaminação de aflatoxinas incluem triagem com classificação e separação de componentes externos indesejáveis e grãos de visível menor qualidade, porém este método é intrinsecamente complexo pela dificuldade em distinguir produtos contaminados dos não contaminados. A imersão de grãos em água, inclui um método físico de triagem, com descarte de grãos flutuantes, permitindo também a remoção de alguns grãos contaminados (Luo, Liu e Li, 2018).

A utilização de métodos de aquecimento como vapor sob pressão e torrefação a seco podem também reduzir os níveis de contaminação por aflatoxinas de algumas culturas. Porém deve-se ter em consideração que as aflatoxinas têm elevada resistência térmica (podendo a temperatura para destruição das mesmas alcançar os 280°C) e que elevadas temperaturas podem modificar a qualidade nutritiva do alimento (Peng, Marchal e Poel, 2018).

A irradiação é outro exemplo de método físico utilizado, que se baseia no aquecimento ou na hidrólise para redução de micotoxinas. A AFB1 apresenta elevada sensibilidade á irradiação gama, apresentado por isso, maior facilidade em ser eliminada por este método que outras micotoxinas. Este método apresenta, porém, algumas desvantagens tais como, o custo do procedimento e alterações nutricionais do alimento (Peng, Marchal e Poel, 2018). Este método é utilizado frequentemente em substratos alimentares tais como amendoins, grãos e alimentos para animais (Rushing e Selim, 2019).

A utilização de adsorventes tem sido dos métodos mais utilizados no controlo de aflatoxinas em bovinos de leite. Os adsorventes são adicionados ao alimento para os animais e quando ingeridos são ativados no trato gastrointestinal, ligam-se às aflatoxinas presentes e conseqüentemente há uma menor distribuição destas no organismo. Os adsorventes devem ser eficazes em diferentes níveis de pH para que possam manter-se estáveis ao longo de todo o trato gastrointestinal e serem posteriormente excretados através das fezes (Luo, Liu e Li, 2018). A eficiência de adsorção das aflatoxinas depende da estrutura química e propriedades físicas (tamanho e distribuição dos poros, área de superfície e carga) do adsorvente, assim como das características da aflatoxina presente no alimento (Huwig *et al.*, 2001). Os adsorventes são classificados como orgânicos e inorgânicos. O carvão ativado é um adsorvente inorgânico, que tem uma excelente capacidade de adsorção, alta relação superfície/massa e tendo em conta a sua porosidade é mais eficaz em ambientes aquosos. Existem adsorventes de várias subclasses de silicatos, entre eles os filossilicatos, a que pertencem os aluminossilicatos de cálcio e sódio hidratados (HSCAS) (Huwig *et al.*, 2001). As bentonitas pertencem

também ao grupo dos silicatos e são um material argiloso com grande capacidade de se ligar a AFB1 (Huwig *et al.*, 2001; Luo, Liu e Li, 2018). Um outro grupo de substâncias, as zeólitas, tem demonstrado ser muito eficientes a nível ruminal em bovinos, tendo grande capacidade de adsorção de AFB1 (Huwig *et al.*, 2001).

A descontaminação de natureza química envolve diversos agentes químicos, como bases, agentes oxidantes e ácidos orgânicos. A amonização é um método que utiliza uma base para provocar a hidrólise e descarboxilação da AFB1 formando AFD1, que apresenta menor mutagenicidade. Contudo esta técnica exige equipamentos complexos (Rushing e Selim, 2019) e não está permitida na Comunidade Europeia para alimentos destinados ao consumo humano (Luo, Liu e Li, 2018; Jard *et al.*, 2011). Este método é utilizado, com frequência, nos EUA para a descontaminação da semente de algodão destinada a ração para animais (WHO e FAO, 2018) e para o tratamento de cereais, particularmente do milho (Colović *et al.*, 2019).

A ozonização tem demonstrado ser um método eficaz na descontaminação e por isso está aprovado como técnica de processamento. O ozono gasoso já demonstrou ser muito eficaz na degradação de aflatoxinas, principalmente da AFB1 e AFG1. A eficácia desta técnica depende não só da natureza das aflatoxinas como da concentração de ozono (Agriopoulou *et al.*, 2016). Além desta ser uma técnica utilizada na descontaminação de alimentos para animais tem vindo também a ser utilizada em produtos alimentícios para o Homem (Colović *et al.*, 2019), designadamente na indústria de pimenta vermelha, milho, amendoim, pistacho, figos secos e outros alimentos secos (WHO e FAO, 2018).

A acidificação de alimentos contaminados com recurso aos ácidos cítrico, láctico e clorídrico entre outros tem também sido um método químico muito eficaz. Neste método ocorre desintoxicação de AFB1 em AFB2a, significativamente menos tóxico que AFB1. Este é um método simples onde não são necessários equipamentos específicos (Rushing e Selim, 2019).

Apesar da eficácia individual dos diversos métodos descritos, a combinação de várias técnicas tem-se vindo a demonstrar mais eficaz. Num estudo, onde se combinou aquecimento e ozonização para tratamento de amendoins contaminados, observou-se uma redução de AFB1 de 77% em apenas dez minutos, quando tratados a 75°C. A acidificação conjugada com o aquecimento tem também demonstrado eficácia na degradação de AFB1, sendo um tratamento relativamente rápido, económico e simples (Rushing e Selim, 2019).

Os métodos de natureza biológica recorrem a bactérias, fungos e leveduras para biodegradar micotoxinas. Fungos como *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Rhizopus* sp. e *Mucor* sp. são exemplos de fungos com capacidade de transformar AFB1 num metabolito menos tóxico (Guan *et al.*, 2008). Diversas leveduras ou paredes de leveduras são também empregadas na captura de aflatoxinas; as suas paredes celulares possuem vários pontos de ligação para as aflatoxinas. Exemplos de leveduras com essa capacidade são *Trichosporon mycotoxinivorans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma strains* e *Armillariella tabescens*, contudo nem todas estão até ao momento autorizadas (Guan *et al.*, 2008). A bactéria *Lactobacillus rhamnosus GG* é altamente resistente ao ácido gástrico e à bÍlis, tem propriedades de adesão á parede intestinal, podendo reduzir a adesão de bactérias patogénicas. Produz substâncias antagónicas para agentes patogénicos de origem alimentar e tem alta capacidade de sequestrar aflatoxinas (Zhang *et al.*, 2018).

Têm sido desenvolvidas novas estratégias para reduzir os níveis de aflatoxinas, entre elas a utilização de óleos essenciais naturais que são ecológicos e eficientes. Pensa-se que os mecanismos dos óleos essenciais estejam relacionados com a rutura da membrana e organização celular dos fungos. Diversos óleos naturais como o óleo de curcuma e o de menta picante já demonstraram ser bons antifúngicos (Luo, Liu e Li, 2018). O óleo de curcuma impede o crescimento de fungos e a germinação de esporos. Provoca a interrupção das vias de biossíntese de esterol, responsável pela integridade da membrana celular, e inibe a ATPase mitocondrial do *A. Flavus*, o que levará a uma diminuição do nível de ATP intracelular e a alterações da permeabilidade e estrutura da membrana celular, levando a morte celular. Além disso, foi também demonstrado que este óleo pode modular a expressão de genes reguladores envolvidos na via de biossíntese de aflatoxinas (Hu *et al.* 2016).

Vários estudos sugerem que materiais magnéticos podem ser eficazes na remoção de aflatoxinas em alimentos (Luo, Liu e Li, 2018). Foi realizado um estudo onde se desenvolveram nanocompósitos magnéticos de carbono preparados a partir de resíduos de milho, conseguindo uma taxa de reabsorção de cerca de 90% (Zahoor e Ali Khan, 2016).

6.3. REGULAMENTAÇÃO

Foram estabelecidos vários limites máximos para aflatoxinas e outras micotoxinas em diversos géneros alimentícios, no Regulamento (CE) nº 1881/2006.

No artigo 1º do Regulamento (CE) nº 1881/2006 da Comissão de 19 de dezembro, está estabelecido que alimentos com níveis de aflatoxinas superiores aos limites máximos não devem ser colocados no

mercado, e de acordo com o artigo 3º do Regulamento, alimentos com aflatoxinas a um nível superior aos limites máximos não devem ser utilizados como ingredientes alimentares nem serem misturados com géneros alimentícios que cumpram os limites máximos.

Foram estabelecidos limites máximos para AFB1 de forma isolada e para a soma de AFB1, AFB2, AFG1 e AFB2 em determinados alimentos com casca rija, como caroços de damasco, amendoins e outras sementes oleaginosas, frutos secos, cereais e algumas espécies de especiarias, ou produtos transformados dos mesmos. Como está referido na tabela 1, existem limites máximos específicos de AFB1 em alimentos transformados à base de cereais, destinados a bebés e crianças. Os limites máximos de AFM1 determinados para leite cru, leite tratado termicamente e leite utilizado em produtos à base de leite, fórmulas infantis e fórmulas de transição para crianças, bem como em produtos dietéticos são de 0,05 µg/kg (Regulamento (UE) nº 2023/915 da Comissão, de 25 de abril de 2023).

Apesar de grandes esforços por parte de agências e organizações, a regulamentação para definir limites máximos de aflatoxinas no alimento não está ainda harmonizada a nível mundial. Muitos países, principalmente países em desenvolvimento, ainda carecem de regulamentações específicas para controlar níveis de micotoxinas. Num futuro próximo pode ser útil definirem-se limites máximos a nível mundial para aflatoxinas em alimentos (Marroquín-Cardona *et al.*, 2014).

Tabela 1 - Limites máximos legais, definidos pela FDA e UE, para diferentes géneros alimentícios (Adaptado de FDA, (2019), FDA, (2021), Regulamento (UE) nº 2023/915 da Comissão, de 25 de abril de 2023 e Regulamento (CE) nº 1881/2006 da Comissão, de 19 de dezembro de 2006).

Géneros alimentícios e Alimentos para animais	Teores máximos (µg/kg)				
	FDA (EUA)		UE		
	Soma de B1, B2, G1, G2	M1	B1	Soma de B1, B2, G1, G2	M1
Géneros alimentícios destinados a consumo humano	20,0	—	Varia entre 2,0 e 12,0 consoante alimento e tratamento prévio	Varia entre 4,0 e 15,0 consoante alimento e tratamento prévio	—
Leite cru, leite tratado termicamente e leite para o fabrico de produtos lácteos	—	0,50	—	—	0,05
Fórmulas para lactentes e fórmulas de transição, incluindo leite para bebés e leite de transição	—	—	—	—	0,025
Alimentos transformados à base de cereais e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens	—	—	0,10	—	—
Alimento destinado a consumo de bovinos de carne	300,0	—	20,0 (para um teor de humidade de 12 %)	—	—
Alimento destinado a consumo de bovinos de leite	20,0	—	5,0 (para um teor de humidade de 12 %)	—	—

7. CONCLUSÃO

A contaminação por aflatoxinas em culturas alimentares e em produtos de origem animal, como o leite poderá representar uma séria ameaça para a saúde humana e animal. A AFB1, classificada pela IARC como carcinogénica do Grupo 1, é a aflatoxina alvo de maior preocupação (Marchese *et al.*, 2018). A contaminação de alimentos para bovinos com AFB1 resulta na excreção de AFM1 no leite, o que representando também um sério risco para a saúde pública, especialmente para crianças, (Patyal *et al.*, 2020) o que destaca a necessidade de uma rigorosa monitorização e controle de qualidade nos produtos lácteos.

Na deteção e quantificação de aflatoxinas, são necessários métodos mais rápidos, precisos e acessíveis. Além disso, os métodos de amostragem ainda são considerados uma fragilidade, pela heterogeneidade na distribuição dos grãos contaminados (Vaz *et al.*, 2020).

Prevê-se que a mudança nos padrões climáticos possa favorecer o crescimento de fungos produtores de aflatoxinas. Neste sentido é importante sensibilizar os agricultores e decisores, principalmente nos países em desenvolvimento, para a implementação de métodos de prevenção eficazes e de práticas que visem a produção de produtos agrícolas mais seguros, como sejam adequadas práticas agrícolas (por exemplo: rotação de culturas com frequência, fornecimento adequado de nutrientes), armazenamento adequado dos produtos, entre outros (Kumar *et al.*, 2017).

Também o crescimento populacional, a demanda crescente por alimentos e a conseqüente pressão sobre a produção agrícola pode provocar o aumento da incidência de contaminações por aflatoxinas. (Mahato *et al.*, 2019).

Políticas harmonizadas e regulamentações mais rigorosas podem ajudar a garantir que os alimentos comercializados internacionalmente estejam livres de contaminação (Marroquín-Cardona *et al.*, 2014). Além disso, a pesquisa científica deve continuar a explorar novas formas de desintoxicação para alimentos contaminados, garantindo que esses produtos possam ser utilizados de forma segura, minimizando desperdícios e perdas económicas.

No futuro o controlo de aflatoxinas resultará de uma combinação de boas práticas para prevenção de contaminação desde o prado ao prato, de programas de garantia de qualidade do produto com pesquisa rigorosa e quantificação das aflatoxinas, assegurando que quando acima dos limites máximos

regulamentados os produtos não são utilizados na alimentação humana e animal, e além disso, quando os produtos estiverem contaminados espera-se que, para um menor desperdício de alimento, existam formas de descontaminação eficazes, acessíveis e ecológicas.

8. BIBLIOGRAFIA

Abreham, S., Manoj, V. R., Hailu, M., Chen, Y., Lin, Y., Chen, Y. (2023) "Aflatoxins: Source, Detection, Clinical Features and Prevention," *Processes*, Vol.11, no.1. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pr11010204>.

Adányi, N., Nagy, Á., Takács, B., Szendrő, I., Szakacs, G., Szűcs, R., Tóth-Szeles, E., Lagzi, I., Weiser, D., Bódai, V., Sátorhelyi, P., Erdélyi, B. (2018) "Sensitivity enhancement for mycotoxin determination by optical waveguide lightmode spectroscopy using gold nanoparticles of different size and origin," *Food Chemistry*, Vol.267, pp. 10–14. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.089>.

Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA, FDA. (2019) "Guias de Política de Conformidade – CPG Sec. 683.100. Níveis de ação para aflatoxinas em alimentos para animais: orientação para funcionários da FDA", Rockville.

Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA, FDA. (2021) "Guia de Política de Conformidade Seção. 555.400. Aflatoxinas na alimentação humana: orientação para funcionários da FDA", Rockville.

Agriopoulou, S., Koliadima, A., Karaiskakis, G., Kapolos, J. (2016) "Kinetic study of aflatoxins' degradation in the presence of ozone," *Food Control*, Vol.61, pp.221–226. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.013>.

Alshannaq, A. e Yu, J.H. (2017) "Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, Vol.14, no.6. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>.

Applebaum, R., Brackett, R., Wiseman, D., Marth, E. (1982) "Responses of Dairy Cows to Dietary Aflatoxin: Feed Intake and Yield, Toxin Content, and Quality of Milk of Cows Treated with Pure and Impure Aflatoxin," *Journal of Dairy Science*, Vol.65, no.8, pp.1503–1508. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82374-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82374-6).

Awuchi, C., Ondari, E., Nwozo, S., Odongo, G., Eseoghene, I., Twinomuhwezi, H., Ogbonna, C., Upadhyay, A., Adeleye, A., Okpala, C. (2022) "Mycotoxins' Toxicological Mechanisms Involving Humans, Livestock and Their Associated Health Concerns: A Review," *Toxins*, Vol.14, no.3. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins14030167>.

Battilani, P., Toscano, P., Van Der Fels-Klerx, H., Moretti, A., Camardo Leggieri, M., Brera, C., Rortais, A., Goumperis, T., Robinson, T. (2016) "Aflatoxin B 1 contamination in maize in Europe increases due to climate change," *Scientific Reports*, Vol.6. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep24328>.

Bbosa, G. S., Kitya, D., Lubega, A., Ogwal-Okeng, J., Anokbonggo, W., Kyegombe, D. B. (2013) "Review of the Biological and Health Effects of Aflatoxins on Body Organs and Body Systems," in *Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects*. InTech, no.12, pp.239-265 Disponível em: <https://doi.org/10.5772/51201>.

Benkerroum, N. e Ismail, A. (2022) "Human Breast Milk Contamination with Aflatoxins, Impact on Children's Health, and Possible Control Means: A Review," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, Vol.19, no. 24. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph192416792>.

Bhatnagar, D., Cary, J., Ehrlich, K., Yu, J., Cleveland, T. (2006) "Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development," *Mycopathologia*, Vol. 162, pp. 155–166. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0050-9>.

Britzi, M., Friedman, S., Miron, J., Solomon, R., Cuneah, O., Shimshoni, J., Soback, S., Ashkenazi, R., Armer, S., Shlosberg, A. (2013) "Carry-over of aflatoxin B1 to aflatoxin M1 in high yielding Israeli cows in mid- and late-lactation," *Toxins*, Vol.5, no.1, pp.173–183. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins5010173>.

Brown, R.L., Chen, Z., Cleveland, T.E., Russin, J.S. (1999) "Mini-Review Advances in the Development of Host Resistance in Corn to Aflatoxin Contamination by *Aspergillus flavus*.". Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO.1999.89.2.113>.

Churchill, K.A. (2017) The carry-over of aflatoxins in dairy feed to milk of modern Holstein dairy cows. Dissertação de doutoramento. Cornell University. Disponível em: <https://ecommons.cornell.edu/server/api/core/bitstreams/21055a66-a606-4eda-813c-d2d2f71cfcad/content>.

Colovic, R., Puvača, N., Cheli, F., Avantaggiato, G., Greco, D., Đuragić, O., Kos, J., Pinotti, L. (2019) "Decontamination of mycotoxin-contaminated feedstuffs and compound feed," *Toxins*, Vol.11, no.11. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins11110617>.

Conselho da União Europeia (2002), “Diretiva 2002/32/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 7 de maio de 2002, relativa às substâncias indesejáveis nos alimentos para animais”, União Europeia.

Conselho da União Europeia (2006), “Regulamento (CE) Nº 401/2006 da Comissão de 23 de fevereiro de 2006 que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios”, União Europeia.

Conselho da União Europeia (2006), “Regulamento (CE) Nº. 1881/2006 da comissão de 19 de dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios” , União Europeia.

Conselho da União Europeia (2023), “Regulamento 2023/915 da Comissão de 25 de abril de 2023, relativo aos teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios e que revoga o Regulamento (CE) nº 1881/2006”, União Europeia.

Coppock, R.W., Christian, R.G., e Jacobsen, B.J. (2018) “Aflatoxins,” *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles: Third Edition*, pp.983–994. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00069-6>.

Council for Agricultural Science and Technology. (2003) “Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems. Council for Agricultural Science and Technology”. Disponível em: <https://www.cast-science.org/publication/mycotoxins-risks-in-plant-animal-and-human-systems/>.

Creppy, E.E. (2002) “Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe,” *Toxicology Letters*, Vol.12, no. 1–3, pp. 19–28. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00479-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00479-9).

Danesh, N., Bostan, H., Abnous, K., Ramezani, M., Youssefi, K., Taghdisi, S., Karimi, G. (2018) “Ultrasensitive detection of aflatoxin B1 and its major metabolite aflatoxin M1 using aptasensors: A review,” *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V., Vol.99, pp.117–128. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.12.009>.

dsm-firmenich (2024) The Global Threat January – December 2023. Disponível em: www.dsm.com/anh. (acedido a 20 de março de 2024)

Ferrari, L., Fumagalli, F., Rizzi, N., Grandi, E., Vailati, S., Manoni, M., Ottoboni, M., Cheli, F., Pinotti, L. (2022) "An Eight-Year Survey on Aflatoxin B1 Indicates High Feed Safety in Animal Feed and Forages in Northern Italy," *Toxins*, Vol.14, no. 11. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins14110763>.

Fink-Gremmels, J. (2008) "Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review," *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, Vol. 25, no. 2, pp. 172–180. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/02652030701823142>.

Food and Agriculture organization of the United Nations e World Health Organization (2018) "Safety evaluation of certain contaminants in food." WHO Food Additives series, No.74.

Gott, P. e Schwandt, E. (2021) "Mycotoxins in dairy cattle: What we know and what we can do", *AABP Proceedings*, Vol.54, no.2, pp.94-101. Disponível em: <https://bovine-ojs-tamu.tdl.org/AABP/article/view/8309/8189>.

Gratz, Silvia (2007) "Aflatoxin binding by probiotics experimental studies on intestinal aflatoxin transport, metabolism, and toxicity." Dissertação de Doutorado. University of Kuopio. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/15167214.pdf>.

Groopman, J.D. e Kensler, T.W. (2005) "Role of metabolism and viruses in aflatoxin-induced liver cancer," *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol.206, pp.131–137. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.09.020>.

Groopman, J.D., Kensler, T.W. e Wild, C.P. (2008) "Protective interventions to prevent aflatoxin-induced carcinogenesis in developing countries," *Annual Review of Public Health*, Vol.29, pp.187–203. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.29.020907.090859>.

Guan, S., Ji, C., Zhou, T., Li, J., Ma, Q., Niu, T. (2008) "Aflatoxin B 1 degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* and other microbes selected using coumarin medium," *International Journal of Molecular Sciences*, Vol.9, no.8, pp.1489–1503. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms9081489>.

Hu, Y., Zhang, J., Kong, W., Zhao, G., Yang, M. (2016) "Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*," *Food Chemistry*, Vol. 220, pp.1–8. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.179>.

Huang, S., Zheng, N., Fan, C., Cheng, M., Wang, S., Jabar, A., Wang, J., Cheng, J. (2017) "Effects of aflatoxin B1 combined with ochratoxin A and/or zearalenone on metabolism, immune function, and

antioxidant status in lactating dairy goats," *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, Vol.31, no.4, pp. 505–513. Disponível em: <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0279>.

Huwig, A., Freimund, S., Käppeli, O., Dutler, H. (2001) "Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents", *Toxicology Letters*, Vol.122, pp.179-188.

International Agency for Research on Cancer e World Health Organization. (2012) "Chemical agents and related occupations- A review of human carcinogens."

International Agency for Research on Cancer and World Health Organization. (2002) "Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene, and styrene. International Agency for Research on Cancer."

Iowa State University (2009) "Aflatoxins in Corn." Disponível em: www.iowagrains.org.

Iqbal, S.Z., Jinap, S., Pirouz, A.A., Ahmad Faizal, A.R. (2015) "Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review," *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd, Vol.46, no.1, pp. 110–119. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.08.005>.

Iqbal, S.Z., Asi, M.R. and Ariño, A. (2013) "Aflatoxins," in *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*. Elsevier Inc., Vol.1, pp. 43–47. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00022-X>.

Jaimez, J., Fente, C., Vazquez, B., Franco, C., Cepeda, A., Mahuzier, G., Prognon, P. (2000) "Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis", *Journal of Chromatography A*.

Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarch, A., Lebrihi, A. (2011) "Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation," *Food Additives and Contaminants - Part A*. Taylor and Francis Ltd., Vol.28, no.11, pp. 1590–1609. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.595377>.

Jiang, Y., Ogunade, I.M., Vyas, D., Adesogan, A.T. (2021) "Aflatoxin in dairy cows: Toxicity, occurrence in feedstuffs and milk and dietary mitigation strategies," *Toxins*, Vol.13, no.4. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/TOXINS13040283>.

Kebede, A., Balina, A. e Tamiru, Y. (2018) "Review on Aflatoxin and its Impacts on Livestock," *Journal of Dairy e Veterinary Sciences*, Vol.6, no.2. Disponível em: <https://doi.org/10.19080/jdvs.2018.06.555685>.

Kelley, R.Y., Williams, W.P., Mylroie, J.E., Boykin, D.L., Harper, J.W., Windham, G.L., Ankala, A., Shan, X. (2012) "Identification of maize genes associated with host plant resistance or susceptibility to aspergillus flavus infection and aflatoxin accumulation," *Plos one*, Vol.7, no.5. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036892>.

Kensler, T.W., Roebuck, B.D., Wogan, G.N., Groopman, J.D. (2010) "Aflatoxin: A 50-year Odyssey of mechanistic and translational toxicology," *Toxicological Sciences*, Vol.120. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq283>.

Kuilman, M.E.M., Maas, R.F.M. e Fink-Gremmels, J. (2000) "Cytochrome P450-mediated metabolism and cytotoxicity of aflatoxin B 1 in bovine hepatocytes", *Toxicology in Vitro*, pp.321-327.

Kumar, A., Pathak, H., Bhadauria, S., Sudan, J. (2021) "Aflatoxin contamination in food crops: causes, detection, and management: a review," *Food Production, Processing and Nutrition*. BioMed Central Ltd., Vol.3. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s43014-021-00064-y>.

Kumar, P., Mahato, D., Kamle, M., Mohanta, T., Kang, S. (2017) "Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management," *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A, Vol.7. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02170>.

Lahouar, A., Marin, S., Crespo-Sempere, A., Saïd, S., Sanchis, V. (2016) "Efectos de la temperatura, la actividad de água y el tiempo de incubación en el crecimiento fúngico y la producción de aflatoxina B1 por aislados toxicogénicos de *Aspergillus flavus* en sorgo," *Revista Argentina de Microbiología*, Vol.48, no.1, pp.78–85. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.10.001>.

Luo, Y., Liu, X. e Li, J. (2018) "Updating techniques on controlling mycotoxins - A review," *Food Control*. Elsevier Ltd, pp.123–132. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.016>.

Mahato, D., Lee, K., Kamle, M., Devi, S., Dewangan, K., Kumar, P., Kang, S. (2019) "Aflatoxins in Food and Feed: An Overview on Prevalence, Detection and Control Strategies," *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A., Vol. 10. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02266>.

Mahfuz, M., Gazi, M., Hossain, M., Islam, M., Fahim, S., Ahmed, T. (2018) “General and advanced methods for the detection and measurement of aflatoxins and aflatoxin metabolites: a review,” *Toxin Reviews*. Taylor and Francis Ltd, Vol.39, no.2, pp.123–137. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15569543.2018.1514638>.

Man, Y., Liang, G., Li, A., Pan, L. (2017) “Recent advances in mycotoxin determination for food monitoring via microchip,” *Toxins*, Vol.9, no.10. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins9100324>.

Marchese, S., Polo, A., Ariano, A., Velotto, S., Costantini, S., Severino, L. (2018) “Aflatoxin B1 and M1: Biological properties and their involvement in cancer development,” *Toxins*, Vol.10, no.6. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins10060214>.

Marroquín-Cardona, A., Johnson, N., Phillips, T., Hayes, A. (2014) “Mycotoxins in a changing global environment - A review,” *Food and Chemical Toxicology*. Elsevier Ltd, Vol.69, pp.220–230. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.025>.

Martins, D., Lemos, A., Silva, J., Rodrigues, M., Simões, J. (2024) “Mycotoxins evaluation of total mixed ration (TMR) in bovine dairy farms: An update,” *Heliyon*, Vol.10, no.4. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25693>.

Mckenzie, R.A., Blaney, B.J. e Filtzpatrickl, L.A. (1981) “Case reports- acute aflatoxicosis in calves fed peanut hay,” *Australian Veterinary Journal*, Vol.57, pp.284-286.

Miklós, G., Angeli, C., Ambrus, Á., Nagy, A., Kardos, V., Zentai, A., Kerekes, K., Farkas, Z., Józwiak, Á., Bartók, T. (2020) “Detection of Aflatoxins in Different Matrices and Food-Chain Positions,” *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A, Vol.11. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01916>.

Min, L., Fink-Gremmels, J., Li, D., Tong, X., Tang, J., Nan, X., Yu, Z., Chen, W., Wang, G. (2021) “An overview of aflatoxin B1 biotransformation and aflatoxin M1 secretion in lactating dairy cows”, *Animal Nutrition*, Vol.7, no.1, pp.42-48. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.11.002>

Miraglia, M., Marvin, H.J.P., Kleter, G.A., Battilani, P., Brera, C., Coni, E., Cubadda, F., Croci, L., De Santis, B., Dekkers, S., Filippi, L., Hutjes, R.W.A., Noordam, M.Y., Pisante, M., Piva, G., Prandini, A., Toti, L., Van den Born, G.J., Vespermann, A. (2009) “Climate change and food safety: An emerging issue with special

focus on Europe,” *Food and Chemical Toxicology*, Vol.47, no.5, pp.1009–1021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.02.005>.

Mitchell, N.J., Bowers, E., Hurburgh, C., Wu, F. (2016) “Potential economic losses to the US corn industry from aflatoxin contamination,” *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, Vol.33, no.3, pp.540–550. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1138545>.

Monteiro, A., Gonçalves, R. e Fradinho, M. (2022) “Manual Substâncias Indesejáveis.” Lisboa. Disponível em: www.iaca.pt.

Motta, T. e Duarte, K. (2010) “ELISA na detecção de aflatoxinas em alimentos.” *Pubvet*, Vol.4, no. 42. Disponível em: <https://www.pubvet.com.br/uploads/b5ab16d77e2843e60ddba4a4f0ad968b.pdf>

Okechukwu, V., Adelusi, O., Kappo, A., Njobeh, P., Mamo, M. (2023) “Aflatoxins: Occurrence, biosynthesis, mechanism of action and effects, conventional/emerging detection techniques,” *Food Chemistry*. Elsevier Ltd., Vol.436. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137775>.

Partanen, H.A., El-Nezami, H.S., Leppänen, J.M., Myllynen, P.K., Woodhouse, H.J., Vähäkangas, K.H. (2009) “Aflatoxin B1 transfer and metabolism in human placenta,” *Toxicological Sciences*, Vol.113, no.1, pp.216–225. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp257>.

Patyal, A., Gill, J., Bedi, J., Aulakh, R. (2020) “Potential risk factors associated with the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced under different farm conditions,” *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, Vol.55, no.9, pp.827–834. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03601234.2020.1787019>.

Peles, F., Sipos, P., Kovács, S., Gyori, Z., Pócsi, I., Pusztahelyi, T. (2021) “Biological control and mitigation of aflatoxin contamination in commodities,” *Toxins*, Vol.13, no.2. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins13020104>.

Peng, W.X., Marchal, J.L.M. e Van der Poel, A.F.B. (2018) “Strategies to prevent and reduce mycotoxins for compound feed manufacturing,” *Animal Feed Science and Technology*. Elsevier B.V., Vol. 237, pp. 129–153. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.01.017>.

Pickova, D., Ostry, V., Toman, J., Malir, F. (2021) "Aflatoxins: History, significant milestones, recent data on their toxicity and ways to mitigation," *Toxins*, Vol.13, no.6. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins13060399>.

Raksha Rao, K., Vipin, A. v. e Venkateswaran, G. (2020) "Mechanism of inhibition of aflatoxin synthesis by non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*," *Microbial Pathogenesis*, Vol.147. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104280>.)

Robens, J.F. e Richard, J.L. (1992) Aflatoxins in Animal and Human Health, *Reviews of Environmental contamination and Toxicology*, Vol.127, pp.69-94. Disponível em: https://www.academia.edu/96959082/Aflatoxins_in_Animal_and_Human_Health.

Rushing, B.R. e Selim, M.I. (2019) "Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods," *Food and Chemical Toxicology*. Elsevier Ltd, Vol.124, pp.81–100. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.047>.

Schmidt-Heydt, M. Abdel-Hadi, A., Magan. N., Geisen, R. (2009) "Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature," *International Journal of Food Microbiology*, Vol.135, no. 3, pp.231–237. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.026>.

Schrenk, D., Bignami. M., Bodin. L., Chipman, J., Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L., Leblanc, J., Nebbia, C., Nielsen, E., Ntzani, E., Petersen, A., Sand, S., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Marko, D., Oswald, I., Piersma, A., Routledge, M., Schlatter, J., Baert, K., Gergelova, P., Wallace, H. (2020) "Risk assessment of aflatoxins in food," *EFSA Journal*, Vol.18, no.3. Disponível em: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6040>.

Smith, M., Madec, S., Coton, E., Hymery, N. (2016) "Natural Co-occurrence of mycotoxins in foods and feeds and there in vitro combined toxicological effects," *Toxins*, Vol.8, no.4. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins8040094>.

Taniwaki, M., Hocking, A., Pitt, J., Fleet, G (2010) "Growth and mycotoxin production by fungi in atmospheres containing 80% carbon dioxide and 20% oxygen," *International Journal of Food Microbiology*, Vol.143, no.3, pp.218–225. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2010.08.030>.

Trucksess, M.W. e Diaz-Amigo, C. (2019) “Mycotoxins in foods,” *Encyclopedia of Environmental Health*. Elsevier, Vol.4, pp. 505–514. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63951-6.00700-2>.

Turner, P.C., Sylla, A., Diallo, M.S., Castegnaro, J., Hall, A.J., Wild, C.P. (2002) “The role of aflatoxins and hepatitis viruses in the etiopathogenesis of hepatocellular carcinoma: A basis for primary prevention in Guinea–Conakry, West Africa,” *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, Vol. 17, pp. 441-448.

Varga, J., Frisvad, J.C. e Samson, R.A. (2009) “A reappraisal of fungi producing aflatoxins,” *World Mycotoxin Journal*. Wageningen Academic Publishers, Vol.2, no.3, pp.263–277. Disponível em: <https://doi.org/10.3920/WMJ2008.1094>.

Vaz, A., Cabral Silva, A.C., Rodrigues, P., Venâncio, A. (2020) “Detection methods for aflatoxin m1 in dairy products,” *Microorganisms*, Vol.8, no.2. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020246>.

Wayne, L.B. (2019) “Mycotoxins in the Food Chain and Human Health Implications”, *Encyclopedia of Environmental Health*. Elsevier Inc., pp.898-905. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11776-2>

Wild, C.P. e Turner, P.C. (2002) “The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions”, *Mutagenesis*, Vol.17, no.6, pp.471-481.

Yu, J. (2012) “Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination,” *Toxins*, Vol.4, no.11, pp. 1024–1057. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins4111024>.

Yu, J., Bhatnagar, D., e Ehrlich, K.C. (2002) “Aflatoxin biosynthesis”, *Rev Iberoam Micol*, Vol.10, pp.191-200. Disponível em: <https://www.reviberoammicol.com/2002-19/191200.pdf>

Zahoor, M. e Ali Khan, F. (2016) “Aflatoxin B1 detoxification by magnetic carbon nanostructures prepared from maize straw,” *Desalination and Water Treatment*, Vol. 57, no.25, pp. 11893–11903. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1046147>.

Zentai, A., Jóźwiak, Á., Süth, M., Farkas, Z. (2023) “Carry-Over of Aflatoxin B1 from Feed to Cow Milk—A Review,” *Toxins*, Vol.15, no.3. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins15030195>.

Zhang, L., Liu, S., Zhao, X., Wang, N., Jiang, X., Xin, H., Zhang, Y. (2018) “Lactobacillus rhamnosus GG modulates gastrointestinal absorption, excretion patterns, and toxicity in Holstein calves fed a single dose of aflatoxin B 1,” *Journal of Dairy Science*, Vol.102, no.2, pp.1330–1340. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15444>.

Zheng, Z., Humphrey, C., King, R., Richard, J. (2005) “Validation of an ELISA test kit for the detection of total aflatoxins in grain and grain products by comparison with HPLC”, Springer. *Mycopathologia*, Vol.159, pp. 255-263

