**Universidade de São Paulo**
**Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**

# Ocorrência de Aflatoxina $M_1$ em leite cru de três mesorregiões produtoras do Estado de São Paulo e sua correlação com parâmetros de qualidade do leite

**Ana Beatriz Nappi Santili**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2010

Ana Beatriz Nappi Santili
Bacharel em Ciências dos Alimentos

# Ocorrência de Aflatoxina $M_1$ em leite cru de três mesorregiões produtoras do Estado de São Paulo e sua correlação com parâmetros de qualidade do leite

Orientadora:
Dra. **MARIA ANTONIA CALORI-DOMINGUES**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**
**DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Santili, Ana Beatriz Nappi
Ocorrência de Aflatoxina $M_1$ em leite cru de três mesorregiões produtoras do Estado de São Paulo e sua correlação com parâmetros de qualidade do leite / Ana Beatriz Nappi Santili. - - Piracicaba, 2010.
111 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Aflatoxinas - Ocorrência 2. Contaminação de alimentos 3. Leite - Qualidade 4. Micotoxinas Título

CDD 637.1277
S235o

**"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"**

À meus pais,

Solange e José Luiz,

pelo incentivo constante aos estudos.

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus pela vida e oportunidade.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela minha formação e oportunidade de crescimento profissional.

À Dra. Maria Antonia Calori Domingues (Tota) pela orientação, amizade e oportunidade. Seus ensinamentos foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, obrigada pela dedicação constante para a melhoria de cada linha, cada palavra aqui escrita. À você, minha grande admiração.

Ao Prof. Dr. Paulo Fernando Machado e Laerte Cassoli, pelas sugestões e esclarecimentos na parte de produção e composição do leite.

Às indústrias que forneceram as amostras de leite cru durante o período do experimento, sem as quais a realização deste não seria possível.

Ao Departamento de Zootecnia, em especial ao Prof. Marco Antonio Penatti, pela disponibilidade no fornecimento de amostras de leite para os testes iniciais e validação da metodologia.

À Clínica do Leite pela realização das análises de contagem bacteriana total, contagem de células somáticas e composição das amostras de leite cru.

Às estagiárias e amigas Raquel Syllo (Soja) e Fernanda Gregório (Balãga-moita) pela amizade e pelo empenho e dedicação na realização das análises de extração e quantificação das amostras. Vocês foram fundamentais. Muito Obrigada!

À amiga e técnica do Laboratório de Micotoxinas, Ivani Valarini Zambello, pela amizade, ensinamentos transmitidos e por ser uma segunda mãe para todos que lá passaram.

À todos os amigos e colegas do Laboratório de Micotoxinas do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP, pela amizade, companheirismo, conversas, almoços comunitários e comemorações. Foi muito bom!

Ao Prof. Dr. Carlos Tadeu Santos Dias do Departamento de Ciências Exatas da ESALQ/ USP, pelo auxílio na aplicação das análises estatísticas.

Ao amigo Miguel Shiota (Uniguiri) pela ajuda com a formatação e confecção dos elementos gráficos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) pela concessão do financiamento para realização deste projeto.

À CAPES pelo suporte financeiro, possibilitando dedicação integral ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Gislaine e Fábio, pela paciência e disponibilidade em esclarecer dúvidas e auxiliar no que foi preciso.

Aos Doutores: Eduardo Micotti da Glória, Beatriz Thie Yamanaka e Myrna Sabino e aos professores Doutores Severino Matias de Alencar e Paulo Fernando Machado pelo auxílio na correção e sugestões feitas para conclusão deste trabalho.

À bibliotecária Beatriz, da biblioteca do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, pelo auxilio na correção das referências.

Ao meu pai José Luiz, minha mãe Solange e minha irmã Maria Paula, minha família querida e que tanto amo, pelo amor, incentivo aos estudos e apoio incondicional em todos os momentos e decisões pessoais e acadêmicas.

Às grandes e pra sempre amigas Bianca (K-rícia), Thuanni (Etrusk), Francine (Kerunada), Rachel (Da moda), Luciana (Dieta), Marcela, Mariana e Natália (Nana) pela sinceridade de uma amizade, na qual percebemos que a distância não é suficiente para separar os verdadeiros amigos.

À minha prima Érika, por estar sempre presente apesar da distância, alegrando os meus dias e levantando o meu astral.

À minha amiga e colega Marília Chiavegato (Veneno), pelo companheirismo e pronta disponibilidade de ajudar sempre que preciso.

À República Alforria, onde morei durante a graduação e parte da pós-graduação, pelos ensinamentos de vida e convivência em grupo, que com certeza ajudaram a complementar minha formação pessoal e profissional.

Ao meu querido Fernando (Fréxi), pela paciência que teve e tem comigo, pelo carinho, companheirismo, atenção e compreensão. Principalmente pela força e confiança na minha capacidade, por ter participado e vibrado comigo na conclusão de cada etapa. Sem você tudo seria menos colorido!

E a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização e conclusão deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADA!!!

Não importa o que é o mundo, o importante são os seus sonhos.
Não importa o que você é, o importante é o que você quer ser
Não importa onde você está, importa pra onde você quer ir
Não importa o porquê, o importante é o querer.
Não importam suas mágoas, o importante mesmo são suas alegrias
Não importa o que já passou, O passado?...Guarde na sua lembrança
Nunca pense em julgar. Não veja, apenas olhe. Não escute, apenas ouça.
Não toque, sinta. Acredite naquilo que quiser. E, não adianta sonhar, se você não lutar.
O mundo é um espelho, não seja só o seu reflexo.
Só acreditando num futuro você conseguirá a paz para alcançar seus sonhos.
Afinal, o que importa? Você importa.

**Acredite em você!**

(autor desconhecido)

“Educação é aquilo que a maior parte das pessoas recebe,
muitos transmitem e poucos possuem.”

Karl Kraus

# SUMÁRIO

RESUMO ..... 13

ABSTRACT ..... 15

1 INTRODUÇÃO ..... 17

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ..... 19

2.1 LEITE: IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL E ECONÔMICA 19

2.2 PRODUÇÃO DE LEITE NO ESTADO DE SÃO PAULO – MESORREGIÕES 20

2.3 MICOTOXINAS: ASPECTOS GERAIS 25

2.4 AFLATOXINA $M_1$: ASPECTOS GERAIS 26

2.5 LEGISLAÇÃO QUANTO À PRESENÇA DE AFLATOXINA $M_1$ EM LEITE E DERIVADOS 28

2.6 OCORRÊNCIA MUNDIAL DE AFLATOXINA $M_1$ EM LEITE E DERIVADOS 28

2.7 OCORRÊNCIA DE AFLATOXINA $M_1$ EM LEITE E DERIVADOS NO BRASIL 30

2.8 PARÂMETROS DE QUALIDADE E COMPOSIÇÃO DO LEITE E SUA POSSÍVEL CORRELAÇÃO COM A PRESENÇA DE $AFM_1$ 33

3 MATERIAL E MÉTODOS ..... 37

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS 37

3.2 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS EMPREGADA 38

3.3 PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE AFLATOXINA $M_1$ 39

3.4 CURVA DE CALIBRAÇÃO 39

3.5 METODOLOGIA UTILIZADA NA DETERMINAÇÃO DE $AFM_1$ EM LEITE 40

3.6 CONTROLE DE QUALIDADE ANALÍTICO 42

3.6.1 Obtenção do leite cru para controle de qualidade analítico. 42

3.6.2 Determinação do Limite de Detecção (LD) 42

3.6.3 Determinação do Limite de Quantificação (LQ) 43

3.6.4 Teste de Recuperação (Exatidão) 43

3.6.5 Análise de Amostras de Referência. 44

3.6.6 Confirmação da Identidade de $AFM_1$ 45

3.7 PARÂMETROS DE QUALIDADE E DE COMPOSIÇÃO DO LEITE 45

3.7.1 Avaliação dos parâmetros de qualidade do leite 46

3.7.1.1 Contagem de Células Somáticas (CCS) 46

3.7.1.2 Contagem bacteriana total (CBT) 46

3.7.2 Avaliação dos Parâmetros de Composição 47

3.7.2.1 Determinação da composição do leite (teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais) 47

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA ..... 49

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 51

5.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO 51
5.2 CONTROLE DE QUALIDADE ANALÍTICO 52
5.2.1 Leite utilizado para o Controle de Qualidade Analítico 52
5.2.2 Determinação do Limite de Detecção (LD) 52
5.2.3 Determinação do Limite de Quantificação (LQ) 53
5.2.4 Testes de Recuperação (Exatidão) 54
5.2.4.1 Testes de Recuperação – amostras fortificadas 54
5.2.4.2 Testes de Recuperação – amostras de referência 55
5.2.4.3 Testes de Recuperação – amostras fortificadas 55
5.2.5 Confirmação da Identidade de $AFM_1$ 57
5.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS 60
5.4 RESULTADOS DA ANÁLISE DE $AFM_1$ 61
5.4.1 Resultados da contaminação do leite cru com $AFM_1$ por fazenda 65
5.4.1.1 Análises dos resultados de $AFM_1$ na mesorregião de Araçatuba 67
5.4.1.2 Análises dos resultados de $AFM_1$ na mesorregião de Bauru. 69
5.4.1.3 Análises dos resultados de $AFM_1$ na mesorregião do Vale do Paraíba. 71
5.5 ANÁLISE DA EXPOSIÇÃO DA POPULAÇÃO À $AFM_1$ ATRAVÉS DA INGESTÃO DE LEITE 73
5.6 RESULTADOS DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE E DE COMPOSIÇÃO DO LEITE 76
5.6.1 Avaliação dos Parâmetros de Qualidade 76
5.6.1.1 Resultados da Contagem de Células Somáticas (CCS) 76
5.6.1.2 Resultados da Contagem Bacteriana Total (CBT) 79
5.6.2 Resultados dos Parâmetros de Composição do leite cru 83
5.7 CORRELAÇÃO DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE E COMPOSIÇÃO COM A PRESENÇA DE $AFM_1$. 84
6 CONCLUSÃO ..... 87
REFERÊNCIAS ..... 89

## RESUMO


### Ocorrência de Aflatoxina $M_1$ em leite cru de três mesorregiões produtoras do Estado de São Paulo e sua correlação com parâmetros de qualidade do leite

A aflatoxina $M_1$ ($AFM_1$) é um metabólito hidroxilado da aflatoxina $B_1$ ($AFB_1$), e é detectada no leite, após a ingestão de alimentos contaminados com a $AFB_1$. Foram avaliadas durante o período de dez meses (julho/2009 a abril/2010): a ocorrência de $AFM_1$ em leite bovino cru, produzido em 45 fazendas de três mesorregiões produtoras de leite do Estado de São Paulo (Araçatuba, Bauru e Vale do Paraíba); a variação da contaminação entre as mesorregiões produtoras; e a correlação da concentração de $AFM_1$ com parâmetros de qualidade (contagem bacteriana total e contagem de células somáticas) e composição (teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais). A análise de $AFM_1$ foi realizada empregando-se coluna de imunoafinidade para purificação associada à cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de fluorescência. Os valores do limite de detecção e de quantificação foram 0,003 µg $L^{-1}$ e 0,01 µg $L^{-1}$, respectivamente. A recuperação média da metodologia avaliada com amostras artificialmente contaminada em três concentrações (0,04, 0,1 e 0,2 µg $L^{-1}$) foi 83%. A $AFM_1$ foi detectada em 210 (49%) das 429 amostras analisadas numa faixa de concentração de traços a 0,617 µg $L^{-1}$ com média de 0,017 µg $L^{-1}$ e mediana igual a não detectada (LD<0,003 µg $L^{-1}$). A concentração média de $AFM_1$ das amostras da mesorregião de Bauru (0,031 µg $L^{-1}$) foi estatisticamente maior do que da mesorregião de Araçatuba (0,015 µg $L^{-1}$) e do Vale do Paraíba (traços). Apenas 3 amostras (0,7%) encontraram-se acima do limite máximo permitido no Brasil (0,5 µg $L^{-1}$) e 28 amostras (6,5%) apresentaram contaminação acima do limite da Comunidade Européia (0,05 µg $L^{-1}$). A média dos valores de contagem de células somáticas e de contagem bacteriana total foi de 497 $10^3$ células $mL^{-1}$ e 515 $10^3$ UFC $mL^{-1}$, com faixa de 72 a 1411 $10^3$ células $mL^{-1}$ e 17 a 5014 $10^3$ UFC $mL^{-1}$, respectivamente. Os valores médios dos parâmetros de composição do leite foram: gordura 3,59%, proteína 3,15%, lactose 4,50% e sólidos totais 12,22%. Não foi observada correlação significativa entre a ocorrência de $AFM_1$ e os parâmetros de qualidade e de composição do leite.


Palavras-chave: Leite cru; Aflatoxina $M_1$; Ocorrência; Correlação; Parâmetros de qualidade

## ABSTRACT

### Occurrence of aflatoxin $M_1$ in raw milk samples from three producers mesoregions of São Paulo State and its correlation with quality parameters of milk

The $AFM_1$ is a hydroxylated metabolite of aflatoxin $B_1$ ($AFB_1$), and is detected in milk, after ingestion of food/feed contaminated with B1. During the period of ten months (July/2009 to April/2010), it was evaluated: the occurrence of aflatoxin $M_1$ ($AFM_1$) in raw cow milk produced in 45 farms of three mesoregions of São Paulo State (Araçatuba, Bauru and Vale do Paraíba); the variability of contamination among mesoregions; and the correlation of $AFM_1$ contamination with quality parameters (total bacterial count and somatic cell count) and composition (fat, protein, lactose and total solid contents) of raw milk. The $AFM_1$ analysis were performed using an immunoaffinity column for clean up, and high performance liquid chromatography, with fluorescence detection. The detection and quantification limits were 0.003 µg $L^{-1}$ and 0.01 µg $L^{-1}$, respectively. The mean recovery of the methodology obtained with spiked aflatoxin-free milk samples at three concentrations (0.04, 0.1 and 0.2 µg $L^{-1}$) was 83%. The $AFM_1$ was detected in 210 (49%) of 429 samples ranged from traces to 0.617 µg $L^{-1}$ with a mean level of 0.017 µg $L^{-1}$ and median not detected (LOD <0.003 µg $L^{-1}$). The mean $AFM_1$ concentration of samples from Bauru mesoregion (0.031 µg $L^{-1}$) was statistically higher than Araçatuba (0.015 µg $L^{-1}$) and Vale do Paraíba (traces) mesorregions. Only 3 samples (0.7%) were above the maximum limit allowed in Brazil (0.5 µg $L^{-1}$) and 28 samples (6.5%) were above the limit of the European Community (0.05 µg $L^{-1}$). The mean values of somatic cell count and total bacterial count was 497 $10^3$ cells $mL^{-1}$ and 515 $10^3$ CFU $mL^{-1}$ ranged from 72-1411 $10^3$ cells $mL^{-1}$ and from 17-5014 $10^3$ CFU $mL^{-1}$, respectively. The mean values of the parameters of milk composition were: fat 3.59%, protein 3.15%, lactose 4.50% and total solids 12.22%. There was no significant correlation among the occurrence of aflatoxin $M_1$ and the quality and composition parameters of milk.

Keywords: Raw milk; Aflatoxin $M_{1;}$ Occurrence; Correlation; Quality parameters

# 1 INTRODUÇÃO

O leite e seus derivados apresentam um importante papel na dieta humana, principalmente no que diz respeito à alimentação infantil. Entretanto, estes produtos podem estar contaminados com $AFM_1$, que é um metabólito da aflatoxina $B_1$ ($AFB_1$), representando um perigo para a saúde humana, especialmente de crianças e bebês, que são potencialmente mais sensíveis às toxinas e possuem uma dieta menos diversificada do que os adultos (GALVANO et al., 1998). Por esta razão, estudos vêm sendo conduzido no Brasil e no mundo a fim de verificar a ocorrência de $AFM_1$ no leite. A presença de $AFM_1$ no leite é resultado direto da ingestão de alimentos contaminados com $AFB_1$. Por isso, diversos países possuem legislação para controlar os níveis de $AFB_1$ em rações e ingredientes para rações, bem como níveis máximos permitidos de $AFM_1$ em leite e produtos lácteos, a fim de reduzir os riscos associados à ingestão desta toxina.

Diversos fatores influenciam a taxa de transferência de $AFM_1$ no leite incluindo estágio de lactação, produtividade e saúde da glândula mamária do animal. Existem na literatura informações, embora limitadas, sobre o efeito da infecção da glândula mamária e excreção de $AFM_1$ no leite. Essa infecção aumenta o número de células somáticas e altera a composição no leite podendo afetar a taxa de transferência de $AFM_1$ para o leite pelo aumento da permeabilidade da membrana da glândula mamária, causado pela infecção (BATTACONE et al., 2009).

Poucos estudos foram realizados, a fim de avaliar a possível correlação entre a variação dos parâmetros de qualidade e composição do leite e a presença de $AFM_1$ no mesmo. Pelo fato de tais parâmetros serem avaliados, por exigência tanto do mercado interno, como do externo, como medida de controle de qualidade da matéria prima, poderia também auxiliar nas medidas de monitoramento de $AFM_1$ no leite e seus derivados, se comprovada à existência da correlação.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar, durante o período de 10 meses (julho de 2009 a abril de 2010): a ocorrência de aflatoxina $M_1$ em leite bovino cru produzido em fazendas de três mesorregiões produtoras de leite do Estado de São

Paulo; a variabilidade da contaminação entre as mesorregiões produtoras e; a correlação da contaminação com parâmetros de qualidade e composição do leite.

# 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 2.1 Leite: Importância nutricional e econômica

O leite é um dos alimentos mais completos, em termos nutricionais, que existem, sendo rico em uma grande quantidade de nutrientes essenciais ao crescimento e a manutenção de uma vida saudável (VIILELA, 2002). O leite apresenta um importante papel na dieta humana, principalmente no que diz respeito à alimentação infantil. O Ministério da saúde recomenda o seu consumo diário, sendo a quantidade variável conforme a faixa etária. Dados do Ministério da Saúde demonstram que o brasileiro deveria consumir, em média, 200 litros de leite por ano, seja na forma fluida ou na de produtos lácteos. No entanto, o consumo médio no Brasil é de cerca de 120 litros por habitante/ano, estando muito aquém do recomendado (ZOCCAL, 2009).

Além da sua importância nutricional, o leite desempenha um relevante papel social e econômico. De acordo com Vilela (2002), o leite está entre os seis primeiros produtos mais importantes da agropecuária brasileira, considerando a geração de emprego e a participação no PIB (produto interno bruto), ficando à frente de produtos tradicionais como café beneficiado e arroz.

No início da década de 1980, a produtividade do rebanho leiteiro nacional era inferior a 700 litros/ vaca/ ano; número esse, que começou a aumentar rapidamente no início dos anos 90. No último levantamento disponível, de 2007, a produtividade foi igual a 1237 litros/ vaca/ ano (EMBRAPA GADO LEITE, 2008a).

A partir dos anos 90, com a abertura dos mercados, a economia brasileira passou por diversas transformações, inclusive no seu marco regulatório, dessa forma ocorreram mudanças significativas na pecuária de leite no Brasil, fazendo com que um novo perfil fosse criado para o setor. De acordo com Hunt et al. (2009), as principais modificações na economia brasileira e no setor leiteiro foram: retirada do controle do setor lácteo após 46 anos de controle estatal; liberalização do comércio exterior brasileiro; criação do Mercado Comum do Sul (Mercosul); introdução de novos produtos lácteos; difusão de novos métodos de estocagem, resfriamento e transporte do leite;

maior número de empresas atuando no processamento e na comercialização do leite; inovação tecnológica na composição e manutenção do rebanho leiteiro; aumento no consumo per capita de leite e de seus produtos processados; e, diversificação da lista de produtos lácteos consumidos.

Segundo o último levantamento realizado pela Embrapa Gado Leite (2008b), o Brasil é o sexto maior produtor de leite, com um volume que corresponde a aproximadamente 4,5% da produção mundial, sendo o setor, um dos mais importantes do agronegócio brasileiro, ocupando o sexto lugar em valor bruto da produção agropecuária nacional.

Em relação ao mercado internacional, o país ocupa, atualmente, a sexta colocação no ranking dos exportadores. Os produtos lácteos exportados são enviados para mais de 70 países e movimentam US$ 200 milhões por ano. (ALVIM, 2007). De janeiro a dezembro de 2007, as exportações totalizaram 96,6 mil toneladas e US$ 273,3 milhões, o que significou um aumento de 8,5% em volume e 97,3% em valor frente ao total exportado em 2006 (FERRO, 2008).

Grande parte da produção de leite está concentrada na Região Sudeste, que já chegou a participar com 46% da produção nacional. O maior estado produtor é Minas Gerais com 30% do leite brasileiro produzido, seguido por Goiás com 16% e os estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná (ALVIM, 2007).

## 2.2 Produção de Leite no Estado de São Paulo – Mesorregiões

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2007), o Estado de São Paulo possui uma área de 248.209,426 $Km^2$ onde estão distribuídos 645 municípios, com uma população estimada em 39.827.570 habitantes.

O Estado de São Paulo sobressai-se não só por ser o Estado mais populoso e industrializado do Brasil, mas também por ser um centro agropecuário e econômico sempre em ascensão, destacando-se em relação ao conjunto nacional (TEIXEIRA; FREITAS, 2003).

Dentre os segmentos agropecuários no Estado de São Paulo, a produção de leite ocupa o quinto lugar em geração de renda, atrás somente da cana-de-açúcar, carne bovina, laranja e carne de frango (LEITE BRASIL, 2006).

O setor leiteiro do Estado de São Paulo passou por importantes transformações na década de 90, deixando de ser o segundo maior produtor do Brasil, perdendo a posição para o Estado de Goiás. De acordo com os dados da EMBRAPA GADO LEITE (2008c), o Estado de São Paulo ocupava a quinta posição no ranking da produção nacional de leite.

O Estado de São Paulo possui 53.476 estabelecimentos produtores de leite bovino, com produção de aproximadamente 1,3 milhões de litros (IBGE, 2006) e está subdividido em 15 mesorregiões: Araçatuba, Araraquara, Assis, Bauru, Campinas, Itapetininga, Litoral Sul Paulista, Macrometropolitana Paulista, Marília, Metropolitana de São Paulo, Piracicaba, Presidente Prudente, Ribeirão Preto, São José do Rio Preto e Vale do Paraíba Paulista (Figura 2.1).

De acordo com o IBGE (2010), mesorregião geográfica é definida como “uma área individualizada, em uma unidade de Federação, que apresente formas de organização do espaço definidas pelas seguintes dimensões: o processo social, como determinante, o quadro natural como condicionante e, a rede de comunicação e de lugares, como elemento de articulação espacial”.

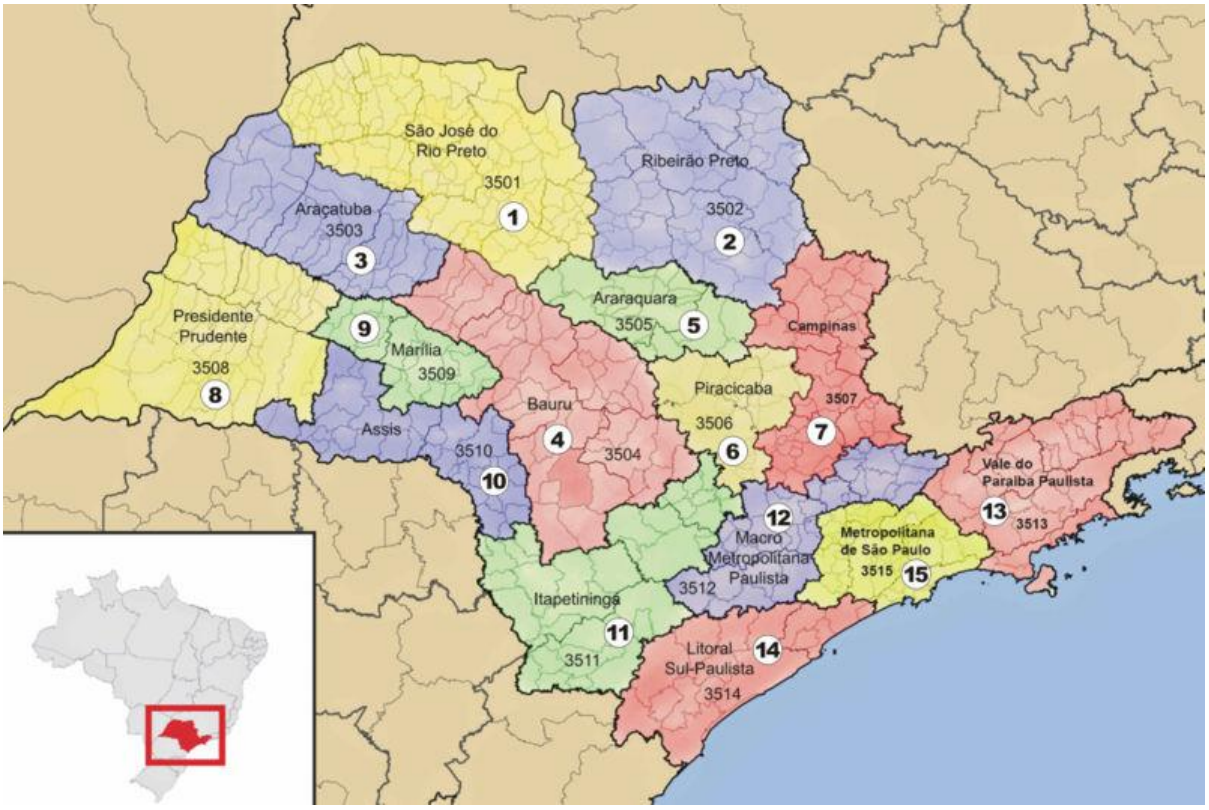


Figura 2.1 - Mapa do estado de São Paulo destacando suas mesorregiões

Fonte: Wikipédia, 2008.

Segundo a Pesquisa Agropecuária Municipal realizada pelo IBGE (2008), que listou as mesorregiões, estados e regiões do país com produção superior a 100 milhões de litros, as principais mesorregiões produtoras de leite do Estado de São Paulo encontram-se listadas na Tabela 2.1.

Apesar da alta produção na mesorregião de São José do Rio Preto, o maior número de produtores está localizado na região de Presidente Prudente (5.254), seguindo-se a de São José do Rio Preto (4.813), Vale do Paraíba (4.165), Itapetininga (3.207) e Araçatuba (2003), como apresentado na Figura 2.2 (LEITE BRASIL, 2006).

Tabela 2.1 - Produção de leite das Mesorregiões do Estado de São Paulo, de 2002-2006

| Mesorregião | Produção de Leite (milhões litros) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 |
| São José do Rio Preto | 382 | 394 | 392 | 374 | 356 |
| Vale do Paraíba | 200 | 195 | 203 | 224 | 236 |
| Ribeirão Preto | 167 | 173 | 189 | 201 | 206 |
| Campinas | 201 | 203 | 183 | 175 | 184 |
| Presidente Prudente | 130 | 144 | 128 | 131 | 132 |
| Araçatuba | 131 | 146 | 124 | 124 | 114 |
| Bauru | 114 | 114 | 113 | 113 | 108 |
| Itapetininga | 104 | 106 | 109 | 104 | 108 |
| Total no Estado | 1748 | 1785 | 1739 | 1744 | 1744 |

Fonte: Embrapa Gado Leite, 2008(d).

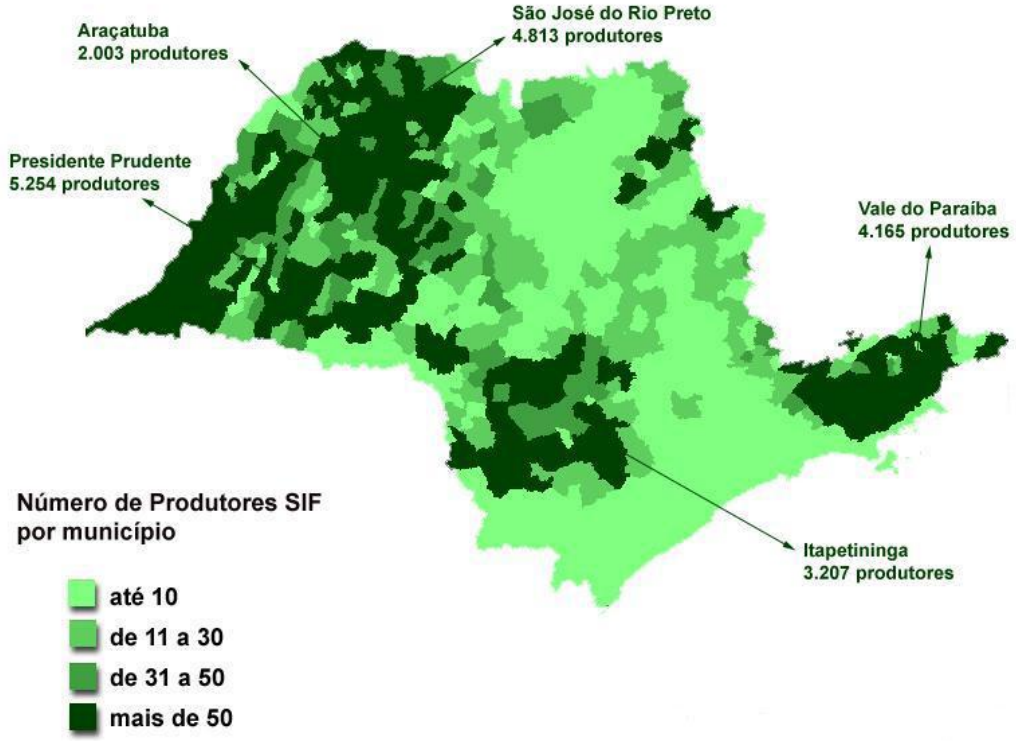


Figura 2.2 - Mapa dos produtores do Estado de São Paulo

Fonte: Leite Brasil, 2006.

Em relação à produtividade no Estado de São Paulo ganha destaque a região de Campinas, com produtividade de 2.004 litros/ animal/ ano, ficando as mesorregiões de Vale do Paraíba Paulista, Bauru e Araçatuba em 3º, 4º e 5º lugar, com produtividade, em 2006, igual a 1.232, 1.087 e 1.072 litros/ animal/ ano, respectivamente, como exposto na Tabela 2.2

Tabela 2.2 - Produtividade de leite das mesorregiões do Estado de São Paulo de 2002-2006

| Mesorregiões | Produtividade (litros/vaca/ano) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 |
| Campinas | 1.861 | 1.915 | 1.867 | 1.933 | 2.004 |
| Ribeirão Preto | 1.347 | 1.430 | 1.512 | 1.568 | 1.698 |
| Vale do Paraíba | 1.190 | 1.168 | 1.153 | 1.199 | 1.232 |
| Bauru | 1.055 | 1.055 | 1.086 | 1.102 | 1.087 |
| Araçatuba | 949 | 1.014 | 1.000 | 1.085 | 1.072 |
| São José do Rio Preto | 830 | 840 | 841 | 850 | 865 |
| Itapetininga | 839 | 841 | 838 | 830 | 855 |
| Presidente Prudente | 706 | 738 | 715 | 718 | 706 |
| Total no Estado | 1.020 | 1.035 | 1.039 | 1.066 | 1.092 |

Fonte: Embrapa Gado Leite, 2008 (d).

Apesar da produção no Estado de São Paulo ter diminuído ao longo dos anos, o Estado continua sendo o maior mercado consumidor do Brasil, com 27,2% do consumo domiciliar nacional de lácteos, e ainda realiza a maior distribuição de leite em programas sociais, equivalente a um milhão de litros de leite fluido diariamente (LEITE BRASIL, 2006).

O leite e seus derivados apresentam um importante papel na dieta humana, principalmente no que diz respeito à alimentação infantil. Entretanto, estes produtos podem estar contaminados com micotoxinas, dentre elas a aflatoxina $M_1$ (GALVANO et al., 1998). A presença de $AFM_1$ no leite é resultado direto da ingestão de alimentos contaminados $AFB_1$. Por esta razão, muitos países possuem regulamento para controlar os níveis de $AFB_1$ em rações propondo níveis máximos permitidos de $AFM_1$ em leite e produtos lácteos, a fim de reduzir os riscos associados a essa toxina.

## 2.3 Micotoxinas: aspectos gerais

O fato dos fungos ou bolores produzirem "flavors" desagradáveis ou outras mudanças indesejáveis em alimentos é conhecido há tempo. Além disso, alguns fungos têm a capacidade de sintetizar substâncias químicas, que produzem sintomas tóxicos quando alimentos que as contém são ingeridos pelo homem ou animais. Essas substâncias, produtos do metabolismo secundário de fungos, são conhecidas como micotoxinas e as doenças causadas pelo consumo de alimentos ou rações contaminados são conhecidas por micotoxicoses (DIENER; DAVIS, 1977).

Dentre as micotoxinas conhecidas, as aflatoxinas são consideradas as mais perigosas devido à sua freqüente ocorrência em alimentos e rações, e seu efeito carcinogênico, mutagênico e teratogênico, representando assim, um risco significativo à saúde humana e animal (GARNER, 1992; ROY; CHOURASIA, 1990).

As aflatoxinas podem ser produzidas por 4 espécies de fungos do gênero *Aspergillus* da secção *Flavi*: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* e *A. pseudotamarii*, sendo que apenas o *A. flavus* e o *A. parasiticus* são economicamente importantes (CAST, 2003).

O termo aflatoxinas se refere, normalmente, aos quatro principais compostos (do grupo de metabólitos bis-furanocumarina), identificados como $B_1$, $B_2$, $G_1$ e $G_2$ que se distinguem por sua fluorescência quando observados sob luz ultravioleta (365 nm). Das quatro principais aflatoxinas, as maiores concentrações observadas correspondem à $B_1$ seguida por $G_1$, enquanto $B_2$ e $G_2$ ocorrem em menor escala (ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD, 1983). As aflatoxinas $M_1$ e $M_2$ são os produtos da biotransformação das aflatoxinas $B_1$ e $B_2$ e podem ser excretadas no leite de animais ou humanos que tenham ingerido alimentos contaminados com $AFB_1$ e $AFB_2$ (CAST, 2003).

O grupo das aflatoxinas ($AFB_1$, $AFB_2$, $AFG_1$, $AFG_2$ e a $AFM_1$) foi classificado como Grupo 1, pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 1993; IARC, 2002).

A $AFB_1$ é considerada uma das substâncias de maior poder carcinogênico que existem, sendo especialmente relacionada à hepatocarcinogênese (BENNET;

FERNHOLZ, 1978). É também, a mais comumente encontrada nos alimentos contaminados por aflatoxinas (ZERINGUE et al., 1993). De acordo com a revisão realizada por van Egmond (1989a) apud Henry et al., (2001) a $AFM_1$ é menos carcinogênica do que a aflatoxina $B_1$ e diversos trabalhos de pesquisa avaliaram os efeitos da $AFM_1$ em diversos animais e observaram que a toxicidade da $AFM_1$ , assim como da $AFB_1$, varia tanto em função da dose administrada quanto entre as espécies animais.

## 2.4 Aflatoxina $M_1$: aspectos gerais

A $AFM_1$ é um metabólito da aflatoxina $B_1$ ($AFB_1$), um produto hidroxilado resultante da biotrasformação da $AFB_1$, produzido pelo organismo, no fígado, após ingestão de alimentos contaminados e que pode ser excretada por meio do leite, urina e fezes humana e animal (ALLCROFT et al., 1966). Quando ingerida por mamíferos, a maior parte da toxina é eliminada por meio da urina e fezes, mas uma fração das aflatoxinas $B_1$ e $B_2$ é biotransformada no fígado e excretada junto com o leite na forma das aflatoxinas $M_1$ e $M_2$, respectivamente (PARREIRAS, 1985).

Como o leite, principalmente o de origem bovina, é parte importante da dieta dos seres humanos, diversos estudos vêm sendo conduzidos para se diagnosticar e estabelecer as taxas de transferência relacionada com a ingestão de uma ração contaminada por $AFB_1$ e a presença de $AFM_1$ no leite dos bovinos.

De acordo com van Egmond (1989) e Pettersson (1997), a concentração de $AFM_1$ excretada com o leite pode variar de 0,2 a 4% da concentração ingerida de $AFB_1$ por meio de ração contaminada. Já para Hussein e Brassel (2001), quando um animal ingere um alimento contaminado com $AFB_1$, de 0,5 a 5% da toxina ingerida é biotransformada em $AFM_1$ e excretada junto com o leite. Porém, para Creppy (2002) a taxa de biotransformação de $AFB_1$ em $AFM_1$ varia de 0,3 a 6,1% para diversas espécies, incluindo vacas leiteiras e humanos.

A respeito do intervalo entre a ingestão, biotransformação e excreção das aflatoxinas $M_1$, Mc Kinney et al. (1973) apud Parreiras (1985) realizaram, em 1973, um estudo no qual estabeleceram que, 24h após a ingestão inicial da aflatoxina $B_1$, a

aflatoxina $M_1$ é excretada no leite das vacas e ainda que, 72h após a administração de $AFB_1$, o leite não mais apresenta a aflatoxina $M_1$. Já Polan et al. (1984) sugeriram que o tempo entre a ingestão de ração contaminada com $AFB_1$ e a excreção de $AFM_1$ no leite pode variar de 3 a 6 dias e, após a retirada da ração contaminada da dieta, a toxina ainda mostrava-se presente no leite por mais 2 a 4 dias.

Contudo, a taxa de transformação de $AFB_1$ em $AFM_1$ e excreção de $AFM_1$ no leite podem sofrer influência de diversos fatores como produção de leite, estágio de lactação, variação das espécies animais, metabolismo do animal e saúde da glândula mamária (BATTACONE et al., 2003; van EGMOND, 1989; LAFONT et al., 1983; PETTERSSON et al., 1989) o que pode explicar a grande variabilidade dos resultados apresentados acima. Revisão realizada por Parreiras (1985) indicou que o leite não é a principal rota para a excreção da aflatoxina, sendo encontrada também no fígado, onde é biotransformada, além da urina, fezes, e no sangue.

Um dos tratamentos mais utilizados de processamento do leite é o aquecimento, sendo as principais razões para a sua utilização a remoção dos microrganismos patogênicos, o prolongamento a vida de prateleira por até seis meses e o auxílio nos tratamentos posteriores (LEWIS, 1999). No entanto, a $AFM_1$ é resistente a qualquer inativação térmica, ou seja, quantidade de aflatoxina $M_1$ no leite não é reduzida por nenhum processamento térmico, como pasteurização, esterilização ou congelamento do produto ou seus derivados (CARVAJAL et al., 2003 ;PARK, 2002).

Na produção de queijos, Brackett e Marth (1982) apud Pietri et al. (1997) afirmaram que $AFM_1$ está associada à fração protéica do leite e, portanto, aparece no queijo em concentrações de 3 a 5 vezes maiores do que a do leite utilizado e é dependente do tipo de queijo fabricado. De acordo com revisão realizada por Montagna et al., (2008), ocorre aumento da concentração de $AFM_1$ a medida que o estágio de maturação do queijo avança, devido a perda de água e a conseqüente concentração das substâncias presentes.

## 2.5 Legislação quanto à presença de Aflatoxina $M_1$ em leite e derivados

Os níveis máximos de $AFM_1$ permitidos no leite e produtos lácteos variam de país para país, sendo que para a maior parte dos países com legislação os limites máximos permitidos encontram-se entre 0,01 e 5,0 µg $L^{-1}$ dependendo do alimento e a quem se destina o consumo, embora, em alguns países esse limite ainda não tenha sido estabelecido (CAST, 2003).

A Comunidade Européia (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2010) estabelece limite de 0,05 µg $L^{-1}$ de $AFM_1$ em leite e produtos de leite; 0,025 µg $L^{-1}$ em fórmulas para lactentes e fórmulas de transição, incluindo leite para bebês e leite de transição, assim como alimentos dietéticos (leite e produtos lácteos) destinados a fins medicinais, especificamente os destinados a lactentes. Já os Estados Unidos fixaram um limite máximo de 0,5 µg $L^{-1}$ de $AFM_1$ em leite fluido (CAST, 2003).

No Brasil, o limite máximo de aflatoxina $M_1$ permitido segue a Resolução do MERCOSUL, GMC/RES. N 25/02, internalizada pela ANVISA, na qual estabelece 0,5 µg $L^{-1}$ em leite fluido e 5,0 µg $L^{-1}$ para leite em pó. (MERCOSUL/GMC, 2002).

## 2.6 Ocorrência mundial de aflatoxina $M_1$ em leite e derivados

O leite e seus derivados são parte importante e significativa na dieta humana, podendo ser uma das principais vias de ingestão de $AFM_1$, representando, assim, um sério risco para a saúde humana e animal. (GALVANO et al., 1998).

A maioria das crianças até três anos tem o leite como principal fonte de alimentação, chamando a atenção do presente problema para esta faixa etária em especial. Por outro lado, o leite não é consumido apenas na forma líquida, mas também é utilizado no preparo de fórmulas infantis, iogurtes, queijos, chocolates e outros derivados. Dessa forma, é importante determinar a presença de $AFM_1$ no leite e seus derivados para evitar a exposição dos consumidores das diversas faixas etárias (REZA-OVEISI et al., 2007).

Devido à grande preocupação com a saúde em função da ingestão de alimentos contaminados com micotoxinas, estudos vêm sendo conduzidos no Brasil e no mundo a fim de verificar a ocorrência de $AFM_1$ no leite e seus derivados.

Em estudo conduzido, em 2003, por Alborzi et al. (2006), 624 amostras de leite pasteurizado foram coletadas durante seis meses em diferentes pontos de comercialização da cidade de Shiraz, no Sul do Iran. Os resultados mostraram contaminação em 100% das amostras coletadas com concentrações de $AFM_1$ que variaram de 0,045 a 0,080 µg $L^{-1}$. O estudo alertou para o sério problema de saúde pública na região e indicou medidas que poderiam ser tomadas para diminuir a contaminação, como, por exemplo, análises rotineiras nos grãos utilizados como ração para os animais e descarte dos lotes quando apresentarem contaminação acima do permitido pela legislação local estabelecida.

Na Argentina, no período de março a setembro de 1999, López et al. (2003) analisaram 77 amostras de leite e constataram que 23% delas apresentavam contaminação com $AFM_1$ em concentrações que variaram de 0,01 a 0,03 µg $L^{-1}$, estando, portanto, todas as amostras dentro dos limites máximos permitidos no país.

Na Holanda, durante 1994, 15 amostras de derivados de leite apresentaram contaminações inferiores a 0,02 µg $L^{-1}$ e 19 amostras de alimentos lácteos para crianças apresentaram uma contaminação com $AFM_1$ entre 0,02 e 0,06 µg $L^{-1}$ (JONKER et al., 1999 apud. GIMENO, 2005).

Em Portugal, Martins e Martins (2004) conduziram um estudo para determinar a ocorrência de $AFM_1$ em amostras de iogurte. Foram analisadas 96 amostras, sendo 48 de iogurte natural e 48 de iogurte com pedaços de morango. Os resultados das análises mostraram que 18,8% das amostras apresentaram contaminação por aflatoxina $M_1$, sendo 2 amostras de iogurte natural, que apresentaram contaminação de 0,043 e 0,045 µg $L^{-1}$, e 16 de iogurte com frutas, que apresentaram contaminação entre 0,019 a 0,098 µg $L^{-1}$.

Outro derivado de leite bastante difundido e consumido no mundo todo é o queijo. Jonker et al. (1999), apud Gimeno (2005) realizaram estudos na França e Itália, entre 1991 e 1995, num total de 311 amostras de queijo analisadas, todas

apresentaram contaminações entre < 0,005 e 0,25 µg $kg^{-1}$. Contudo, a maior percentagem (65%) evidenciava contaminações entre 0,005 e 0,10 ppb.

Peitri et al. (1997) analisaram 223 amostras de queijos (Grana Padano), na Itália durante 1991 e 1994, e verificaram que 91% das mesmas estavam contaminadas com $AFM_1$ em concentrações que variaram de 0,005 a 0,10 µg $L^{-1}$ e 6,7% apresentavam concentrações entre 0,10 e 0,25 µg $L^{-1}$.

## 2.7 Ocorrência de aflatoxina $M_1$ em leite e derivados no Brasil

Em Santa Maria-RS, Mallman et al. (1997) avaliaram 275 amostras de leite e observaram 14 amostras (5,1%) contaminadas com $AFM_1$ em níveis que variaram de 0,19 a 2,92 µg $L^{-1}$.

Prado et al. (1999) realizaram um estudo de ocorrência coletando amostras de três diferentes tipos de leite, tipo C pasteurizado, leite esterilizado e leite em pó, de agosto de 1998 a abril de 1999, na cidade de Belo Horizonte, MG. Das 61 amostras analisadas, 50 (82%) apresentaram $AFM_1$ entre os níveis de 0,006 a 0,077 µg $L^{-1}$. Entretanto, todas as amostras avaliadas encontravam-se dentro do limite máximo estabelecido no Brasil, que é de 0,5 µg $L^{-1}$ (BRASIL, 2002a), e somente 3 apresentaram níveis de $AFM_1$ acima de 0,05 µg $L^{-1}$, que é nível máximo para a Comunidade Européia (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2010).

Ainda no estado de Minas Gerais, Pereira et al. (2005) analisaram 36 amostras de leite cru de bovinos e 34 amostras de leite pasteurizado coletada na região de Lavras-MG. Do total de amostras analisadas, 45,7% apresentaram-se contaminadas com $AFM_1$ em concentrações dentro do limite máximo do Brasil.

No Paraná, Sassahara et al. (2005) conduziram um experimento de julho de 2001 a novembro de 2002 a fim de diagnosticar a ocorrência de $AFM_1$ em derivados de leite elaborados a partir de leite tipo B produzido em 40 fazendas ao norte do estado. Para isso, foram coletadas 98 amostras das rações, utilizadas para análises quanto à presença de aflatoxinas B e G, e 42 amostras de leite cru para a análise de detecção de $AFM_1$. Os resultados mostraram que havia contaminação por aflatoxinas em 26% das amostras de ração comercial, 53% das amostras de ração preparada na fazenda e em

100% das amostras de milho utilizadas na alimentação dos animais. Em decorrência dessa incidência de aflatoxinas na dieta dos animais, o leite coletado apresentou 24% das amostras contaminadas por $AFM_1$, sendo que, em 7% dessas amostras a contaminação estava acima do limite máximo permitido no Brasil (0,5 µg $L^{-1}$).

Baggio (2006) avaliou 40 amostras de leite pasteurizado tipo C, coletadas em 21 distritos sanitários do estado do Paraná, no período de dezembro de 2005 a março de 2006. Os resultados indicaram que a $AFM_1$ foi encontrada em 57,5% das amostras analisadas em níveis que variaram de 0,01 a 0,17 µg $L^{-1}$. No entanto, todas as amostras de leite que apresentaram níveis detectáveis de aflatoxina $M_1$ apresentaram-se dentro do limite máximo de 0,5 µg $L^{-1}$, estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2002a), enquanto 8 amostras estavam com níveis acima de 0,05 µg $L^{-1}$, limite máximo estabelecido pela Comunidade Européia (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2010).

No estado de São Paulo foram realizados diversos levantamentos de ocorrência de $AFM_1$ em leite cru e processado. Martins e Martins (1986) avaliaram a incidência de $AFM_1$ em 224 amostras de leite pasteurizado tipo B comercializado na cidade de São Paulo, representado por quatro marcas de maior consumo e verificaram que apenas 4 amostras (1,8%) apresentaram contaminação, sendo 2 com níveis de 0,25 µg $L^{-1}$ e 2 com traços. Apesar de não ser apresentado o limite de detecção da técnica empregada os resultados mostraram níveis menores do que 0,5 µg $L^{-1}$, limite máximo atualmente permitido no Brasil e os autores alertavam para a necessidade do estabelecimento de limites máximos de tolerância deste contaminante no leite, ausentes na legislação brasileira na época.

Oliveira et al. (1997) avaliaram a ocorrência de $AFM_1$ em 300 amostras de leite em pó consumido por crianças em escolas municipais e creches de São Paulo e verificaram que 33 amostras (11%) apresentaram contaminação em níveis entre 0,1-1 µg $L^{-1}$. Em Campinas-SP, Sylos et al. (1996) verificaram a presença de $AFM_1$ em 4 (7,7%) das 52 amostras de leite pasteurizado em níveis que variam de 0,073 a 0,370 µg $L^{-1}$. No entanto, o estudo realizado por Corrêa et al. (1997), 144 amostras de leite cru de quatro diferentes regiões do Estado de São Paulo foram avaliadas, nas quais não se detectou a presença de $AFM_1$ em níveis maiores que 0,5 µg $L^{-1}$, que foi o

limite de detecção da metodologia empregada na pesquisa, e que também é o limite máximo permitido no Brasil.

Levantamento realizado por Garrido et al. (2003), nos anos de 1999 e 2000 na cidade de Ribeirão Preto - SP, indicou que em 29 (20,9 %), de um total de 139 amostras de leite analisadas, encontravam-se positivas para a presença de $AFM_1$ em concentrações entre 0,05 e 0,24 µg $L^{-1}$.

Gonçalez et al. (2005) analisaram 43 amostras de leite bovino comercial coletadas em 21 municípios do Estado de São Paulo quanto a presença de $AFM_1$ e constataram que 17 amostras (39,5%) apresentaram resultados positivos quanto a presença da toxina $AFM_1$ em concentrações que variaram de 0,04 a 4,64 µg $L^{-1}$. Dentre as amostras positivas, 11 (25,6% do total) apresentaram contaminação com concentrações superiores ao permitido pela Legislação Brasileira, de 0,5 µg $L^{-1}$. Em estudo realizado anteriormente por Gonçalez et al. (2004), os autores observaram a presença de $AFM_1$ em concentrações menores que 0,5 µg $L^{-1}$ no leite obtido de vacas alimentadas com ração contendo 30% de farelo de algodão que apresentava-se contaminado com 43,5 µg $kg^{-1}$ de $AFB_1$.

Oliveira et al. (2006) analisaram 48 amostras de leite pasteurizado e do tipo “longa vida” (UHT) de 2 marcas mais comercializadas na cidade de São Paulo, quanto à presença de aflatoxina M1 e encontraram concentrações que variaram de 0,01 a 0,25 µg $L^{-1}$, em 37 amostras (77,1%). Das amostras positivas para $AFM_1$, 43,2% apresentaram concentrações acima de 0,05 µg $L^{-1}$, limite máximo estabelecido pela Comunidade Européia, e nenhuma amostra estava acima de 0,5 µg $L^{-1}$, limite máximo permitido no Brasil.

Leite cru, pasteurizado e do tipo longa vida (UHT) foram avaliadas por Shundo e Sabino (2006). No total 107 amostras foram coletadas sendo 22 de leite cru coletado em Marília, 43 amostras de leite pasteurizado e 42 de leite tipo longa vida coletadas em supermercados da cidade de São Paulo em 2002 e 2003. Das amostras de leite cru, em 79 (73,8%) detectou-se a presença de $AFM_1$ em concentrações entre 0,02 e 0,26 µg $L^{-1}$, sendo que em 72 amostras (67,3%) a concentração encontrada foi menor do que 0,05 µg $L^{-1}$, enquanto que em 7 amostras (6,5%) as concentrações observadas foram maiores que 0,05 µg $L^{-1}$ e, nenhuma amostra excedeu o limite nacional para leite fluido.

Embora a maioria dos trabalhos apresentados sobre ocorrência de $AFM_1$ em leite produzido no Brasil apresente incidência elevada, independente do limite de detecção da metodologia empregada, as concentrações normalmente encontradas são baixas. Porém, deve-se considerar que a contaminação de alimentos com aflatoxinas destinados ao consumo humano ou animal é variável e dependente de condições ambientais favoráveis ou desfavoráveis, que também variaram de um período para outro (CORRÊA et al., 1997) e que em algumas situações a contaminação pode ser inevitável (SHUNDO; SABINO, 2006). Assim, um programa de monitoramento sistemático por períodos maiores, incluindo todas as estações do ano é importante para proteger os consumidores de leite (BAGGIO, 2006; SHUNDO; SABINO, 2006).

## 2.8 Parâmetros de qualidade e composição do leite e sua possível correlação com a presença de $AFM_1$

Com um aumento considerável da qualidade do leite produzido no Brasil, foi possível em 2002 a implantação da Instrução Normativa nº 51 (IN-51), criada basicamente com o objetivo de melhorar a qualidade do leite produzido no país, e para isso dispõem sobre regulamentos técnicos sobre produção, identidade, qualidade, coleta e transporte do leite produzido (BRESSAN et al., 2004; MARTINS, 2004).

A IN-51 (BRASIL, 2002b) determina limites máximos para a contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT), resíduos de antibióticos, requisitos físico-químicos (como teor de gordura, proteína), e determina o resfriamento obrigatório do leite na fazenda.

Célula Somática é um termo genericamente utilizado para dois tipos de células, as epiteliais e as células brancas, de origem sanguínea (FONSECA; SANTOS, 2000). As células epiteliais estão presentes naturalmente nas glândulas mamárias e seu aparecimento no leite é conseqüência do processo natural de desprendimento de células velhas. Já as células brancas são originárias do sistema sanguíneo e são atraídas para o interior da glândula mamária através da inflamação produzida por uma infecção. Além disso, o processo inflamatório desencadeia a produção de substâncias que são quimiotáticas para neutrófilos (PAAPE et al., 2002). Estas substâncias se ligam

ao endotélio vascular nos locais próximos à infecção, fazendo com que os neutrófilos, que apresentam receptores para estas substâncias em suas membranas, rolem sobre a parede interna do vaso sanguíneo. Quando sua velocidade se reduz o suficiente, elas são capazes de atravessar o endotélio e se transferirem para o leite (JANEWAY et al., 2001).

No mundo todo, as células somáticas se tornaram a principal ferramenta de avaliação da qualidade do leite. Elas adquiriram este papel porque representam um espelho do estado sanitário da glândula mamária, e porque são fáceis de medir de maneira automatizada, permitindo a análise de muitas propriedades de forma prática e barata (VAZ, 2006).

Em estudo realizado por Veldman et al. (1992) foram utilizados animais em diferentes estágios de lactação alimentados com ração naturalmente contaminada com $AFB_1$, a fim de determinar a taxa de biotransformação da toxina. Os autores observaram que os animais de alta produção e os animais com mastite apresentaram as maiores concentrações de $AFM_1$ no leite e sugeriram que isso ocorreu devido à maior permeabilidade das membranas dos alvéolos desses animais, seja esse aumento da permeabilidade causado pela alta produtividade ou pela infecção.

Segundo revisão realizada por Masoero et al. (2007) há informações limitadas a respeito dos efeitos da infecção do úbere e conseqüente aumento na secreção de células somáticas, com a presença de $AFM_1$ no leite. Trabalhos citados nesta revisão sugerem que o aumento da taxa de biotransformação de $AFB_1$ em $AFM_1$ com excreção no leite ocorrem devido à infecção do úbere por *Staphilococcus*, que é o agente causador da mastite uma vez que estudos mostraram a relação entre $AFM_1$ e contagem de células somáticas no leite independente da produção. A mastite aumenta o número de células somáticas no leite e altera a sua composição, podendo alterar a quantidade de $AFM_1$ excretada no leite, devido ao aumento da permeabilidade da membrana.

Os mesmos autores realizaram um estudo visando avaliar o efeito da produção de leite e da contagem de células somáticas, na excreção de $AFM_1$ de vacas em lactação e verificaram, no entanto, que a produção de leite foi o principal fator que afeta o total de $AFM_1$ excretada no leite e que as diferenças observadas, em estudo anterior, na excreção de $AFM_1$ associadas com a permeabilidade da membrana devido a

inflamações, apenas foram observadas nos primeiros dias de ingestão de $AFB_1$ e em vacas com alta produção.

De acordo com Fonseca e Santos (2000), existe uma relação direta entre o número de bactérias presentes nos tetos e a taxa de infecções intramamárias, sugerindo a correlação entre contagem bacteriana e contagem de células somáticas. Desta forma, pode-se inferir que todos os procedimentos que contribuam para a manutenção de uma baixa população de bactérias na superfície dos tetos auxiliam de forma significativa no controle e prevenção da mastite.

A influência da concentração de células somáticas sobre os constituintes do leite é muito discutida. Alguns trabalhos mostram que o aumento significativo de células somáticas (acima de 500.000 céls./mL) leva a redução do teor de gordura (KING, 1978, apud MUNRO et al.,1984; ROGERS et al., 1989). Porém, Munro et al. (1984) não encontraram diferenças significativas no teor de gordura de amostras de leite que apresentavam CCS entre 250.000 e 500.000/ mL. Estudo realizado por Picinin (2003), em 31 propriedades leiteiras na Região Metropolitana de Belo Horizonte, demonstrou-se que quanto maior a CCS, menores os teores do gordura.

De acordo com Schaaellibaum (2000), além do aumento do número de células somáticas, a mastite provoca alterações nos três principais componentes do leite, gordura, proteína e lactose. Enzimas e minerais também são afetados. A extensão do aumento da CCS e as mudanças na composição do leite estão diretamente relacionadas com a superfície do tecido mamário atingido pela reação inflamatória. Portanto haveria uma relação direta entre a CCS e a concentração dos componentes do leite.

Os poucos trabalhos encontrados na literatura mundial sobre a possível correlação de CCS com a presença de $AFM_1$, além da discussão da correlação de CCS com CBT e parâmetros de composição do leite mostram a necessidade do aprofundamento desses estudos. Tendo em vista que a avaliação de tais parâmetros é, atualmente, exigida tanto no mercado interno como no externo, estabelecer uma correlação entre a $AFM_1$ e os parâmetros de qualidade e composição do leite poderá auxiliar nas medidas de controle e monitoramento desse contaminante.

# 3 MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente estudo foram realizadas as seguintes análises em leite bovino cru: determinação de Aflatoxina $M_1$, contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT) e determinação dos teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais. Os procedimentos de obtenção das amostras e realização das análises estão descritos a seguir.

## 3.1 Obtenção das amostras

Foram coletadas durante o período de julho de 2009 a abril de 2010 amostras de leite cru de três mesorregiões do Estado de São Paulo: Araçatuba, Bauru e Vale do Paraíba, que foram selecionadas devido à significativa participação na atividade leiteira do Estado. A coleta das amostras foi realizada por intermédio das indústrias que compram leite das propriedades produtoras localizadas nas mesorregiões, e que realizam o controle de qualidade de acordo com a Instrução Normativa nº 51(IN-51) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2002b). A seleção das propriedades foi baseada no histórico de dados obtidos no período de outubro/2008 a junho/2009, considerando a contagem de células somáticas (CCS), e a freqüência de envio das amostras para análises. Os valores médios de CCS de cada propriedade foram comparados com o valor limite estabelecido na IN-51 (BRASIL, 2002b) de $750.10^3$ CS $mL^{-1}$, até julho de 2011. As propriedades foram selecionadas considerando amostras com valores abaixo, acima e próximas ao limite estabelecido, tentando-se obter uma ampla faixa.

Assim, de cada mesorregião foram selecionadas 15 propriedades e as amostras de leite cru foram coletadas após a ordenha de todos os animais e completa homogeneização de todo o leite produzido e armazenado em tanques de refrigeração.

Das 450 amostras de leite cru previstas para a execução do trabalho foram recebidas 429. O número de subamostras enviadas por mês e de amostras obtidas para cada mesorregião estão especificados no item 5.3.

Para composição da amostra mensal representativa de cada fazenda/mesorregião, foram coletadas de 1 a 4 subamostras de 50 mL. A cada envio de subamostras eram recebidas duas alíquotas, uma com conservante azidiol, que tem como princípios ativos a azida sódica e o cloranfenicol, ambos bacteriostático (BARCINA et al., 1987), e a outra com o conservante Microtabs® (DF Control) que tem como princípios ativos o bronopol, que possui efeito bactericida (CHEMICAL LAND, 2010) e a natamicina, com efeito antifúngico (BRUSTOLIN, 2009), ambas as alíquotas mantida sob refrigeração (4$^{o}$C). Da alíquota com azidiol era retirado volume suficiente para a realização da contagem bacteriana total, e o restante era mantido sob temperatura de congelamento (-18°C) até o momento da realização da análise de $AFM_1$. A alíquota com o conservante Microtabs®, era utilizada para realização da contagem de células somáticas e das análises de composição do leite.

## 3.2 Condições cromatográficas empregada

Foram realizados testes para otimizar a etapa de separação e detecção da $AFM_1$ por cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de fluorescência e na etapa de quantificação das amostras de leite cru. A coluna cromatográfica selecionada foi a modelo Lichospher 100RP-18 250x4,0 mm, da marca Merck, com tamanho de partícula interna de 5 µm e pré-coluna Merck , modelo Lichrospher 100 RP-18 µm (4X4,0 mm). Foram testadas diversas combinações e concentrações de fase móvel para se obter o melhor desempenho na coluna escolhida.

A fase móvel selecionada foi: $H_2O$ Milli-Q: Acetonitrila: Metanol (65: 23:12, v/v/v) sendo a $H_2O$ obtida no Sistema de filtragem Milli-Q, marca Millipore, modelo Simplicity 185–Simpark 1 e os solventes grau cromatográfico.

O sistema de cromatografia utilizado, da marca Shimadzu, era constituído por: bomba modelo LC-10AT com câmara de mistura de solventes FCV-10AL *vp*, detector de fluorescência modelo RF-10AXL no comprimento de ondas de 365 para excitação e 435 para emissão, injetor automático modelo SIL-20A, forno modelo CTO-20A mantido a 35$^{o}$C, degaseificador modelo DGU-20A5 e software LC Solution. O sistema foi operado no modo isocrático, sendo a fase móvel preparada pela câmara de mistura. O

fluxo da fase móvel foi mantido a 1,0mL/min. com volume de injeção de 100 µL. Nessas condições, o tempo de retenção da toxina $M_1$ foi de aproximadamente 8 minutos, sendo o tempo de corrida das amostras estabelecido em 10 minutos.

### 3.3 Preparo da solução padrão de aflatoxina $M_1$

O padrão da aflatoxina $M_1$ da marca Sigma-Aldrich (A-6428) contendo 10 µg, utilizado no preparo da solução, foi dissolvido em 2,5 mL de acetonitrila (grau cromatográfico) para se obter uma concentração teórica de aproximadamente 4,0 µg $mL^{-1}$. A concentração da solução foi medida em espectrofotômetro, conforme a metodologia 970.44 descrita pela AOAC (TRUCKSESS, 2006). Antes da checagem da concentração da solução, o aparelho marca Shimadzu, modelo UV mini 1240, foi checado quanto a sua calibração através de uma solução de dicromato de potássio, de acordo com o procedimento nº. 970.44 (item 49.2.02) da AOAC (TRUCKSESS, 2006). Após a checagem da concentração, preparou-se uma solução, denominada solução estoque, com concentração aproximada de 0,08 µg $mL^{-1}$, a partir da qual as soluções empregadas na curva de calibração foram preparadas.

### 3.4 Curva de calibração

A curva de calibração utilizada para quantificação da $AFM_1$ nas amostras de leite foi construída por meio do preparo de soluções com sete diferentes concentrações do padrão de $AFM_1$, dissolvido em $H_2O$ Milli-Q: acetonitrila, na proporção 3:1 (v/v). A Tabela 3.1 apresenta as concentrações das soluções da curva que variaram de 0,2008 a 5,0212 pg $\mu L^{-1}$, correspondentes a 0,01 a 0,25 µg $L^{-1}$ (ppb) de $AFM_1$ no leite. No preparo da curva de calibração levou-se em consideração a perda de fluorescência do padrão de $AFM_1$ quando em contato com metanol, e descrito no ANEXO A.

Tabela 3.1 - Concentração de $AFM_1$ (pg $\mu L^{-1}$) nas sete soluções de padrão e a concentração correspondente na amostra de leite cru em µg $L^{-1}$

| Solução padrão de $AFM_1$ | Concentração de $AFM_1$ (pg $\mu L^{-1}$) | Concentração correspondente no leite (µg $L^{-1}$) |
|---|---|---|
| 1 | 0,2008 | 0,010 |
| 2 | 0,5021 | 0,025 |
| 3 | 1,0042 | 0,050 |
| 4 | 2,0085 | 0,100 |
| 5 | 3,0127 | 0,151 |
| 6 | 4,0170 | 0,201 |
| 7 | 5,0212 | 0,251 |

As curvas de calibração foram preparadas diariamente para quantificação das amostras, como recomendado por Dragassi e Grosso (2001).

Cada solução padrão foi injetada 2 a 3 vezes para construção da curva de calibração diária, empregando-se os valores da média aritmética das área obtida para cada concentração de solução padrão, utilizando-se o software LC Solution marca Shimadzu. A linearidade da curva foi verificada por meio do coeficiente de determinação ($R^2$).

Para checar a estabilidade do equipamento durante a sua utilização, a cada 10 amostras injetadas, uma solução padrão utilizada na curva de calibração diária era reinjetada, comparando-se as áreas obtidas.

## 3.5 Metodologia utilizada na determinação de $AFM_1$ em leite

A metodologia para detecção e quantificação de $AFM_1$ nas amostras de leite foi baseada na metodologia descrita na Association of Official Analytical Chemists -AOAC (2005), método 2000.8, publicado por Dragassi e Grosso (2001) com adaptações apresentadas por Romero (2007).

As subamostras referentes a cada amostra de leite armazenada a -18°C foram descongeladas em geladeira e, após atingirem a temperatura ambiente foram homogeneizadas e aproximadamente 45 mL foram centrifugados a 2000xg durante 15

minutos. Após a retirada da camada superficial de gordura, a amostra foi filtrada em papel de filtro qualitativo e posteriormente em filtro de microfibra de vidro Whatman 934 AH (Cat n$^{o}$1827900646). Uma alíquota de 20 mL de leite foi separada para extração em coluna de imunoafinidade (Romer Labs, modelo AflaStar$^{TM}$ Fit) e o restante foi congelado a -18$^{o}$C. A alíquota de 20 mL de leite reservada para a extração foi transferida para seringa de 20 mL conectada à coluna de imunoafinidade também a uma torneira de teflon (Varian), para o controle do fluxo em 1 mL por minuto, apenas sob ação da gravidade. Após a passagem de todo o volume de leite, a coluna foi lavada com 20 mL de solução tampão fosfato ajustado para pH = 7,4 (8 g de NaCl + 1,2 g de $Na_2HPO_4$ + 0,2 g de $KH_2PO_4$ + 0,2 de KCl, em 1 L de Água Milli-Q), para retirada dos interferentes. Em seguida, a coluna foi levemente seca apenas com a pressão dos dedos sobre o topo da mesma para eliminação da solução tampão residual e, então, a toxina foi eluída da coluna com 3 alíquotas de 1,0 mL de metanol. Nessa etapa, após a adição do primeiro mL de metanol, permitiu-se que aproximadamente 8 a 10 gotas fossem eluídas e recebidas em flaconete de vidro (10 mL), previamente lavado com solução de ácido sulfúrico 2 M (AOAC, 2005, citado por TRUCKSESS, 2006), para garantir que o metanol entrasse em contato com os anticorpos da coluna, objetivando uma maior eficiência na eluição da toxina presente na amostra. Em seguida, aguardou-se 5 minutos antes da eluição do restante de metanol que foi recebido no mesmo flaconete. O procedimento de eluição com o segundo e terceiro mL de metanol foi o mesmo, empregando, no entanto, 3 minutos de tempo de contato do metanol. Os 3 mL do eluato metanólico foram seco em banho maria (50 $^{o}$C ) sob fluxo de ar, ~~e~~ redissolvidos com 1000 µL da solução de $H_2O$ Milli-Q:acetonitrila (3:1, v/v) utilizando banho de ultrassom e agitador de tubos. Antes da injeção no cromatógrafo, o extrato foi filtrado empregando-se unidade filtrante Millex-GV com membrana de PVDF, 0,22 µm de poro e 13 mm de diâmetro, marca Millipore, e, em seguida, transferindo para vial de 1,5 mL.

## 3.6 Controle de qualidade analítico

O controle de qualidade analítico foi realizado através da determinação dos limites de detecção, quantificação, testes de recuperação e análise de amostra de referência de leite em pó adquirida junto ao FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme). Nos itens a seguir estão descritos os procedimentos utilizados, bem como a obtenção do leite cru utilizado para a realização dos mesmos.

### 3.6.1 Obtenção do leite cru para controle de qualidade analítico.

Para realização das análises de controle de qualidade analítico empregou-se amostras de leite cru com nível não detectado de $AFM_1$. Para obtenção de tais amostras obteve-se o apoio do Departamento de Zootecnia da ESALQ que separava um animal, mantendo-o em regime de alimentação exclusivamente a pasto e suplementação de sal mineral durante 3 dias para garantir a eliminação de possível resíduo de $AFM_1$ no leite (VELDMAN et al., 1992). No quarto dia de regime de alimentação, o leite ordenhado era separado para uso nas análises. O leite cru refrigerado era recebido no Laboratório de Micotoxinas (LABMIC) onde era homogeneizado e adicionado de quantidade suficiente de conservante bacteriostático azidiol, como ocorria com as amostras encaminhadas para análise. Todo o leite era centrifugado e filtrado em papel qualitativo e separado em alíquotas de 25 mL. Para confirmação do nível não detectado de $AFM_1$, realizava-se uma analise completa em triplicata. Após a confirmação, as alíquotas eram congeladas para uso nas análises. Esse procedimento precisou ser realizado sempre que havia a necessidade de obter leite com nível não detectado de $AFM_1$, para a realização das análises de controle de qualidade analítico.

### 3.6.2 Determinação do Limite de Detecção (LD)

De acordo com INMETRO (2010) o limite de detecção do método (LD) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99%

de confiança de que a concentração do analito é maior que zero. O LD teórico foi determinado analisando o ruído do intervalo entre os dois minutos anteriores e os dois minutos posteriores ao tempo de retenção da $AFM_1$, e foi considerado como o menor valor de concentração que resultasse em um pico de altura maior que 3 vezes a amplitude do intervalo de ruído analisado.

Após a determinação teórica, o LD foi testado através de análise completa, em sete repetições, de uma amostra de leite, com nível não detectado de $AFM_1$, na qual adicionou-se quantidade suficiente da solução de padrão que fornecesse a contaminação calculada.

### 3.6.3 Determinação do Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ), segundo INMETRO (2010), é definido como a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão sendo que, na prática, isso corresponde à menor concentração na curva de calibração.

O limite de quantificação teórico foi calculado multiplicando-se o valor de LD por 3. Após sua determinação teórica (LQ = 3x LD) o LQ foi avaliado, quanto à exatidão e a precisão, através da análise completa, em sete repetições, adicionando-se quantidade da solução de padrão de $AFM_1$ para se obter a concentração desejada.

### 3.6.4 Teste de Recuperação (Exatidão)

A exatidão de um método refere-se ao grau de concordância do valor medido com o valor real da concentração da aflatoxina na amostra e pode ser avaliada através da análise de material de referência certificado ou através da realização dos testes de recuperação (INMETRO, 2010).

A recuperação de um método, sob condições controladas, é um procedimento realizado adicionando-se quantidade conhecida do padrão em uma determinada matriz para aplicação em um determinado método.

Para realização do teste de recuperação, a partir de amostras de leite com nível não detectado de $AFM_1$, transferiu-se quantidade suficiente da solução estoque do padrão de $AFM_1$ para erlenmyer de polipropileno que foi levado a secura em banho maria sob fluxo de ar. Em seguida, o padrão seco foi ressuspenso em quantidade correspondente de leite cru filtrado para obtenção da contaminação desejada, deixado no banho de ultrassom (Ultrasson marca Branson, modelo 1510R-MT) por 10 minutos (NAKAJIMA et al., 2004) e homogeneizada manualmente. Após homogeneização a análise foi realizada conforme as etapas da metodologia descrita para as amostras.

A recuperação foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\textbf{Recuperação (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100$$

onde:

**C1 =** concentração determinada na amostra artificialmente contaminada,

**C2 =** concentração determinada na amostra

**C3 =** concentração adicionada

### 3.6.5 Análise de Amostras de Referência.

Outro procedimento utilizado para avaliar a exatidão do método foi a análise de material de referência de leite em pó em duas concentrações 0,479 µg $L^{-1}$ (FAPAS – T04137) e 0,440 µg $L^{-1}$ (FAPAS – T04146), sendo as faixas satisfatórias iguais a 0,268 – 0,690 µg $L^{-1}$ e 0,246 – 0,634 µg $L^{-1}$, respectivamente. O preparo deste material para extração foi realizada, de acordo com Shundo et al. (2009), diluindo-se a amostra de leite em pó em água Milliq aquecida (40°C) na proporção 1:10 (p/v), sob agitação mecânica por 10 minutos. Em seguida, a amostra diluída foi centrifugada a 2000xg por 15 minutos e filtrada em papel de microfibra de vidro. A extração foi realizada com 20 mL do filtrado, exatamente como foi feito com as amostras de leite cru coletadas.

Os resultados dos testes de recuperação e das amostras de referência foram avaliados em porcentagem de recuperação (R%) e desvio padrão de repetibilidade ($DP_r$

ou $RSD_r$). O critério de avaliação foi baseado nos valores aceitáveis de recuperação indicados pela União Européia (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2010) e valores de $RSD_r$ modificados pela equação de Thompson (2000).

### 3.6.6 Confirmação da Identidade de $AFM_1$

Foram utilizados dois métodos para a confirmação da identidade de $AFM_1$ nas amostras de leite, a co-cromatografia e a derivatização com ácido trifluoracético.

A co-cromatografia foi realizada por meio da adição de uma alíquota de padrão de $AFM_1$, com concentração conhecida, ao extrato de uma amostra de leite naturalmente contaminada, para verificar se o novo pico gerado coincidia com o pico da amostra original, e se o aumento na área do pico foi proporcional à quantidade de padrão adicionada.

A derivatização com ácido trifluoracético foi realizada de acordo o método de Hisada et al. (1984) e Takeda (1984) que baseia-se na formação do $AFM_1$ hemi-acetal derivatizado ($AFM_{2a}$). O extrato de amostra foi evaporado até a secura e ao frasco contendo o extrato seco foi adicionado 100 µL de ácido trifluroacético (TFA). A mistura foi sonicada durante 30 segundos, mantida em ambiente escuro durante 15 minutos, evaporada até secura e reconstituída em fase de injeção. Para o teste de confirmação, foi necessário reduzir o fluxo da fase móvel de 1,0 para 0,7 mL $min^{-1}$ para que o pico derivatizado ($AFM_1$ hemi-acetal) não coincidisse com o tempo de retenção (TR) do volume morto.

## 3.7 Parâmetros de Qualidade e de Composição do leite

As análises dos parâmetros de qualidade e composição do leite foram realizadas na Clínica do Leite (Departamento de Zooctenia - ESALQ/USP), que é credenciada junto ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento como um dos oito laboratórios integrantes da Rede Brasileira de Análise da Qualidade do Leite - RBQL.

### 3.7.1 Avaliação dos parâmetros de qualidade do leite

Para a avaliação da qualidade do leite foram realizadas análises dos seguintes parâmetros: contagem de células somáticas e contagem bacteriana total.

#### 3.7.1.1 Contagem de Células Somáticas (CCS)

Para as análises de CCS, uma subamostra adicional de leite era coletada e adicionada do conservante Microtabs® (DF Control) que tem como princípios ativos o bronopol, que possui efeito bactericida (CHEMICAL LAND, 2010) e a natamicina, com efeito antifúngico (Brustolin, 2009).

Na análise de CCS, a metodologia empregada foi a de citometria de fluxo com adição prévia do corante específico brometo de etídio para corar o DNA das células somáticas, de acordo com Carvalho et al. (2007)**.** Quando a solução passa pelo feixe de laser, as células coradas se excitam e passam a emitir radiação em comprimento de onda de 620 nm que é coletada e quantificada pelo sistema óptico (BARRIENTOS et al., 2000). Para a realização deste método foi utilizado o equipamento Somacount (BENTLEY INSTRUMENTS, 1995a) e o resultado dado em unidades de células somáticas por mL de leite.

#### 3.7.1.2 Contagem bacteriana total (CBT)

Para a análise de CBT foi utilizada a alíquota de leite cru adicionada do conservante azidiol, que tem como princípios ativos a azida sódica e o cloranfenicol, ambos bacteriostático (BARCINA et al., 1987).

A metodologia utilizada para esta analise foi a citometria de fluxo que consiste na medição de características celulares, quando estas se encontram suspensas em meio fluido (BARRIENTOS et al., 2000). A amostra de leite é injetada em um capilar acoplado a um sistema óptico que recebe continuamente um feixe de laser. O laser atinge cada bactéria presente na amostra que refletem um comprimento de onda específico, e, posteriormente, relaciona o número de bactérias encontradas com o volume de leite

analisado. A avaliação da CBT foi realizada utilizando o equipamento Bactocount 150 (BENTLEY INSTRUMENTS, 2004), e os resultados obtidos foram expressos em unidades de células bacterianas por mL de leite.

### 3.7.2 Avaliação dos Parâmetros de Composição

#### 3.7.2.1 Determinação da composição do leite (teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais)

As amostras utilizadas para determinação da composição do leite foram as mesmas utilizadas para análise de CCS, com conservante bactericida, Microtabs® (DF Control). A determinação da composição do leite (teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais) foi realizada pelo equipamento Bentley 2000 (BENTLEY INSTRUMENTS, 1995b), que utilizada a metodologia de infravermelho.

Segundo Biggs, (1987) apud Silveira et al. (2004) o princípio fundamental da metodologia de infravermelho baseia-se na capacidade de absorção de radiação, em diferentes comprimentos de ondas, dos grupos químicos específicos de alguns componentes do leite como gordura, proteína e lactose. De acordo com a lei de Beer-Lambert, a porcentagem de cada constituinte é relacionada com a quantidade de energia absorvida. Ela estabelece que a absorbância da luz por uma solução, numa determinada espessura, é diretamente proporcional à concentração de um componente.

# 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada empregando-se o programa SAS versão 9.1 (STATITICAL ANALYSES SYSTEM, 2003).

Realizando-se primeiramente uma análise exploratória dos dados, foi verificado que a pressuposição de normalidade não foi atendida para os parâmetros concentração de $AFM_1$, CCS e CBT, e por isso foi necessário transformar os dados originais através da potência ótima de Box-Cox (1964), como mostrado a seguir:

- ✓ Concentração de Aflatoxina $M_1$ ($AFM_1$): $\frac{1}{\sqrt{AFM1}}$
- ✓ Contagem de Células Somáticas (CCS): $\log_{10} CCS$
- ✓ Contagem Bacteriana Total (CBT): $\log_{10} CBT$

As médias dos parâmetros de qualidade (CCS e CBT), de composição (teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais) e as concentrações de $AFM_1$ nas amostras avaliadas foram comparadas, entre as mesorregiões, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Para verificar a possível correlação entre os parâmetros foi utilizado o teste de correlação de Pearson e o teste de hipótese para correlação nula, ao nível de 5% de probabilidade.

Para a análise estatística dos resultados de $AFM_1$ adotou-se que: a) amostras com concentração não detectada assumiram o valor de metade do limite de detecção, ou seja, 0,0015 µg $L^{-1}$; b) amostras abaixo do limite de quantificação assumiram o valor de metade do limite de quantificação, ou seja, 0,005 µg $L^{-1}$ .

Posteriormente, os percentuais de amostras encontrados nas diferentes faixas de contaminação adotadas foram comparados. Para essa análise também houve a necessidade de transformar os dados através da potência ótima de Box-Cox (1964), sendo a transformação empregada igual a $\log_{10}(percentual + 0{,}5)$.

# 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A unidade adotada para apresentação dos resultados encontrados de $AFM_1$ no leite cru foi µg $L^{-1}$, que caracteriza a relação de partes por bilhão (ppb).

## 5.1 Curva de calibração

Para cada curva de calibração construída foi obtida uma equação da reta correlacionando-se os valores da área obtida com a massa de $AFM_1$ injetada da respectiva solução padrão utilizada. A linearidade das curvas foi verificada através dos coeficientes de determinação obtidos ($R^2$). Os valores de $R^2$ obtidos variaram de 0,9992 a 0,99998. Portanto, as curvas utilizadas para quantificação dos resultados apresentaram linearidade adequada, na faixa de concentração utilizada. A Figura 5.1 apresenta uma das curvas de calibração obtidas.

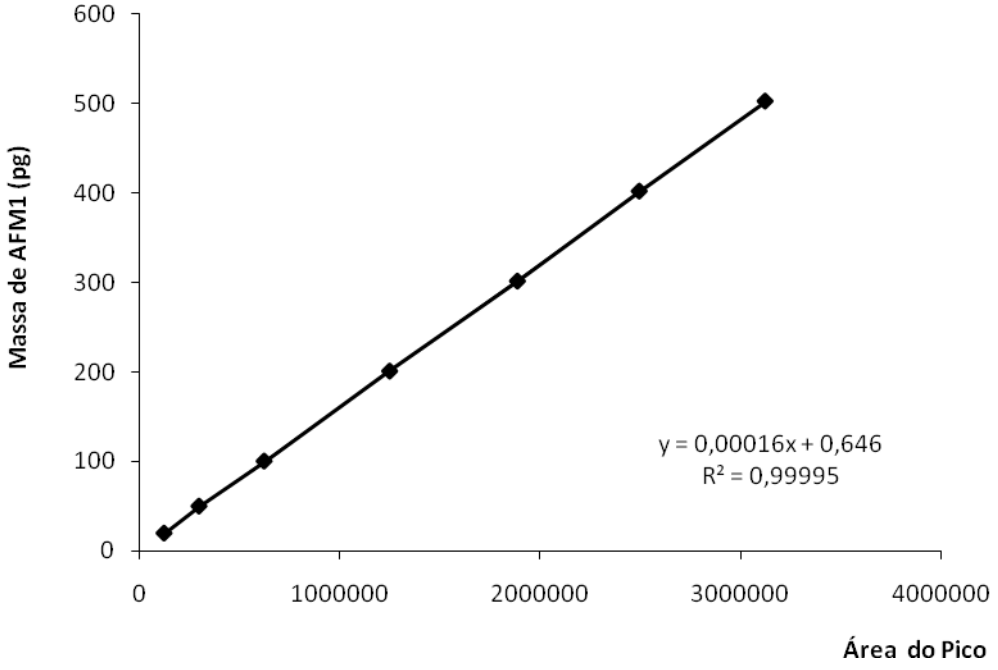


Figura 5.1 - Curva de Calibração do Padrão de $AFM_1$.

## 5.2 Controle de Qualidade Analítico

### 5.2.1 Leite utilizado para o Controle de Qualidade Analítico

A Figura 5.2 mostra um cromatograma do leite cru com nível não detectado de $AFM_1$, que foi utilizado nas análises de controle de qualidade analítico.

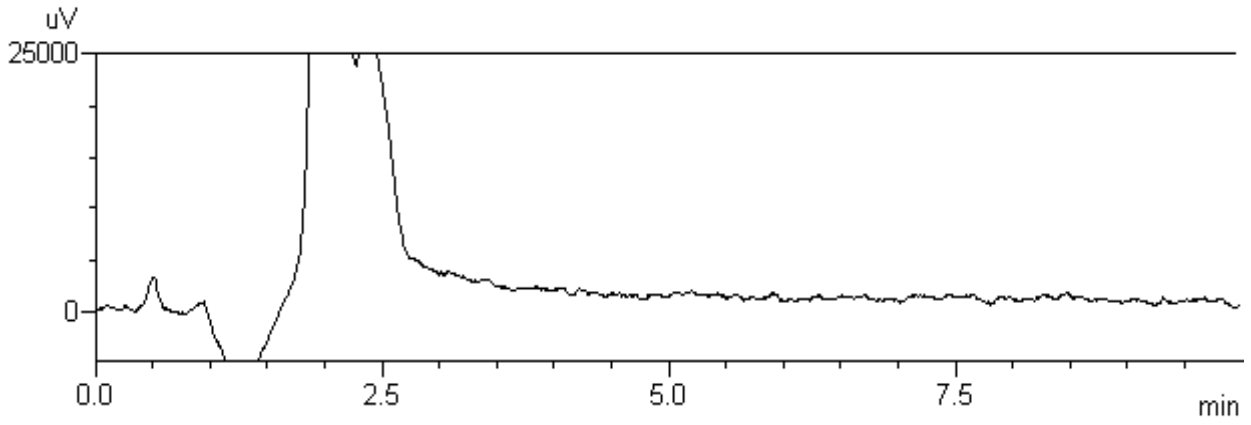


Figura 5.2 - Cromatograma da amostra de leite cru utilizada nas análises de Controle de Qualidade Analítico, evidenciando o nível não detectado de $AFM_1$ no tempo de retenção para $AFM_1$, que é igual a 7,5 min

### 5.2.2 Determinação do Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção teórico calculado, como 3 vezes o ruído, foi de 0,003 µg $L^{-1}$.

A Figura 5.3 apresenta o cromatograma de uma das sete amostra adicionada de 0,003 µg $L^{-1}$ de padrão de $AFM_1$, onde observa-se claramente um pico no tempo de retenção igual a 7,5 minutos, referente a presença de $AFM_1$ na amostra.

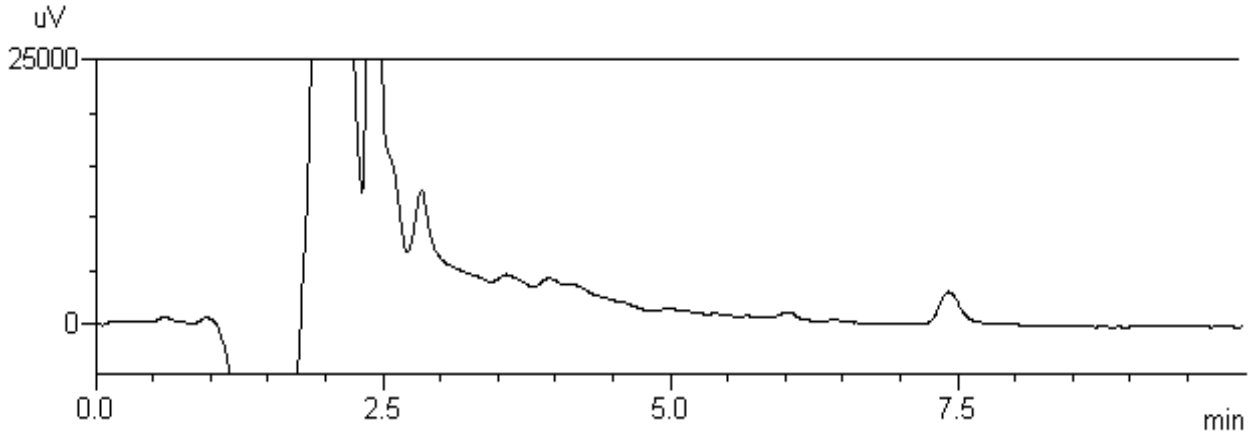


Figura 5.3 - Cromatograma de uma amostra de leite cru no limite de detecção (0,003 µg $L^{-1}$), sendo o tempo de retenção $AFM_1$ igual a 7,5 min

### 5.2.3 Determinação do Limite de Quantificação (LQ)

Após sua determinação teórica (LQ = 3xLD) o LQ foi avaliado, quanto a exatidão e a precisão, realizando-se a análise completa, em sete repetições. Foi realizado ajuste na concentração calculada como LQ em função da concentração da solução padrão de $AFM_1$ utilizada. Assim a concentração avaliada como LQ foi 0,01 µg $L^{-1}$.

Este valor de limite de quantificação também foi obtido e utilizado por Baggio (2006) e Shundo et al. (2009), que utilizaram metodologia de extração e detecção semelhante ao do presente estudo. A Figura 5.4 apresenta o cromatograma de uma das amostras adicionada de 0,01 µg $L^{-1}$ de padrão de $AFM_1$, no qual pode-se observar claramente o pico no tempo de retenção de 7,5 minutos referente a toxina $AFM_1$.

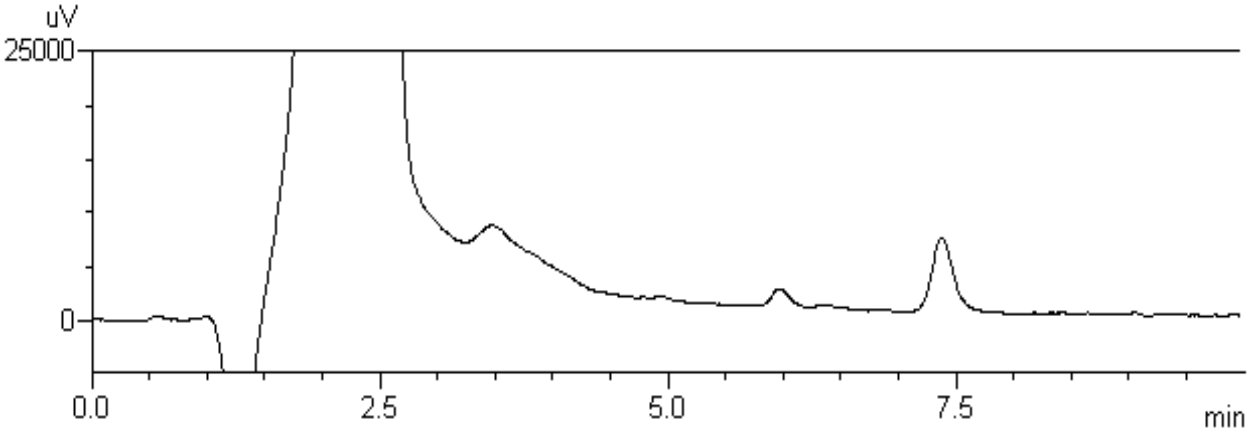


Figura 5.4 - Cromatograma de uma amostra de leite cru no limite de quantificação (0,01 µg $L^{-1}$), sendo o tempo de retenção $AFM_1$ igual a 7,5 min

A recuperação média (%R) obtida das sete repetições para avaliação do LQ nas condições de realização das análises foi de 71,6% (de 59 a 78%), e o valor do desvio padrão de repetibilidade ($RSD_r$) dos resultados obtidos foi de 9,75%. Os valores de %R obtidos estão de acordo com o Regulamento 401/2006 da Comunidade Européia, entre 60 a 120% para contaminações na faixa de 0,01 - 0,05 µg $L^{-1}$ (EUROPEAN COMMUNITIES, 2006). De acordo com o mesmo Regulamento o valor de $RSD_r$ pode ser calculado como 0,66 vezes a precisão do desvio padrão de reprodutibilidade ($RSD_r$), na concentração de interesse. O $RSD_r$ é calculado como 2 duas vezes o valor obtido pela equação de Horwitz. No entanto, para concentrações inferiores a 120 µg $L^{-1}$, os valores calculados pela equação de Thompson (2000) são mais recomendados, que fornece um valor de 44% para $RSD_r$ e de 29% como máximo permitido para repetibilidade ($RSD_r$). Assim a repetibilidade obtida no limite de quantificação foi menor do que o calculado pela equação de Thompson indicando que o método satisfaz os critérios de desempenho estabelecidos pelo regulamento.

### 5.2.4 Testes de Recuperação (Exatidão)

#### 5.2.4.1 Testes de Recuperação – amostras fortificadas

Os testes de recuperação realizados na avaliação inicial da metodologia utilizando 10 amostras artificialmente contaminadas com 0,04 µg $L^{-1}$, apresentaram resultados entre 73,6 a 94,3%, com média de 85%. Esses valores foram obtidos por um único analista, nas mesmas condições em amostras analisadas em 5 dias. Os valores obtidos estão de acordo com os critérios estabelecido pelo regulamento da Comunidade Européia (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2010).

#### 5.2.4.2 Testes de Recuperação – amostras de referência

Foram analisadas amostras de referência (FAPAS) em dois níveis de contaminação ao longo do projeto. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Resultados de recuperação obtidos das análises de amostras de referência (FAPAS)

| Identificação da amostra | N° de análises | Contaminação (µg $L^{-1}$) | Concentração de $AFM_1$ recuperada (µg $L^{-1}$) | Média (% de Recuperação) | $RSD_r$ * (%) | Faixa de Recuperação (Mín – Máx.%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| T 04137 | 3 | 0,479 | 0,4122 | 86 (±5,7) | 6,6 | 79,5 - 90,1 |
| T 04146 | 5 | 0,440 | 0,4033 | 92 (±1,5) | 1,7 | 89,8 - 93,7 |

* $RSD_r$ = desvio padrão relativo de repetibilidade

Os resultados de recuperação obtidos para ambas as concentrações testadas foi satisfatório de acordo os limites aceitáveis indicados pela União Européia que recomenda valores entre 70 a 110% para contaminação com concentrações maiores que 0,05 µg $L^{-1}$ (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2010).

#### 5.2.4.3 Testes de Recuperação – amostras fortificadas

A cada remessa de análises realizou-se um teste de recuperação com amostras fortificadas como procedimento de controle de qualidade analítico. Para estes testes foram utilizados três níveis de contaminação: 0,04; 0,10; 0,20 µg $L^{-1}$. Para cada caixa de coluna de imunoafinidade foi realizado ao menos um teste de recuperação em uma das concentrações citadas. No total 25 caixas foram utilizadas para a análise das 429 amostras mais os testes de recuperação.

Os valores de percentagem de recuperação (%R) obtidos por nível de contaminação estão resumidos na Tabela 5.2, onde pode-se observar o número de análises realizadas, a média, o desvio padrão, o desvio padrão de repetibilidade ($RSD_r$) e a faixa de recuperação encontradas para cada nível de contaminação utilizado.

Tabela 5.2 - Resultados dos testes de recuperação com amostras fortificadas realizados como controle de qualidade analítico em três níveis de contaminação

| Nível de Contaminação (µg $L^{-1}$) | N° de análises | Média e Desvio Padrão (% de Recuperação) | $RSD_r$ * (%) | Faixa de Recuperação (Mín – Máx.%) |
|---|---|---|---|---|
| 0,04 | 10 | 90 (± 7,7) | 8,6 | 72,3 – 99,3 |
| 0,10 | 8 | 83 (± 5,2) | 6,3 | 77,1 – 92,6 |
| 0,20 | 6 | 76 (± 6,6) | 8,7 | 66,2 – 85,8 |

* $RSD_r$ = desvio padrão relativo de repetibilidade

Para o nível de contaminação de 0,04 ppb, o valor de $RSD_r$ observado foi de 8,6% e valores de recuperação que 72,3 a 99,3%. A média obtida para este nível de contaminação foi igual a 90%. Os resultados obtidos estão dentro do limite aceitável recomendado pela União Européia, que é de 60 – 120%, para contaminação adicionada em níveis inferiores a 0,05 µg $L^{-1}$ (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2010).

A média dos resultados das recuperações no nível de 0,10 µg $L^{-1}$ foi de 83%, um desvio padrão de repetibilidade igual a 6,3%, estando esta dentro do limite aceitável recomendado pela União Européia, que é de 70 – 110%, para contaminação adicionada em níveis maiores que 0,05 µg $L^{-1}$ (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2010). Para este nível de contaminação foram realizados 8 testes de recuperação e os valores mínimo e máximo encontrados foram 77,1 a 92,6%, respectivamente.

Para o nível de contaminação de 0,2 µg $L^{-1}$ foram realizadas 6 testes de recuperação ao longo do período. A média dos resultados foi igual a 76%, com um desvio padrão de repetibilidade igual a 8,7%. Os resultados mínimo e máximo obtidos foram 66,2 a 85,8%, respectivamente. Das seis repetições apenas uma apresentou recuperação abaixo dos 70%

Para os três níveis de contaminação testados, as médias obtidas foram satisfatórias, estando dentro dos limites aceitáveis indicados pela União Européia que recomenda valores entre 60 a 120% para contaminação na faixa entre 0,01 - 0,05 µg $L^{-1}$ e de 70 a 110% para contaminação com concentrações maiores que 0,05 µg $L^{-1}$ (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2010). Apesar de um dos resultados de recuperação no

nível 0,2 µg $L^{-1}$ estar abaixo do indicado, este foram considerados aceitáveis, por estar muito próximo do limite mínimo recomendado.

### 5.2.5 Confirmação da Identidade de $AFM_1$

A co-cromatografia foi um dos métodos utilizado para confirmar a identidade de $AFM_1$. Na Figura 5.5 o cromatograma A representa uma amostra de leite cru naturalmente contaminado com $AFM_1$ e o cromatograma B mostra a mesma amostra adicionada de padrão, o aumento da área do pico apresentado no segundo cromatograma foi proporcional à concentração de padrão adicionada, confirmando a identidade de $AFM_1$.

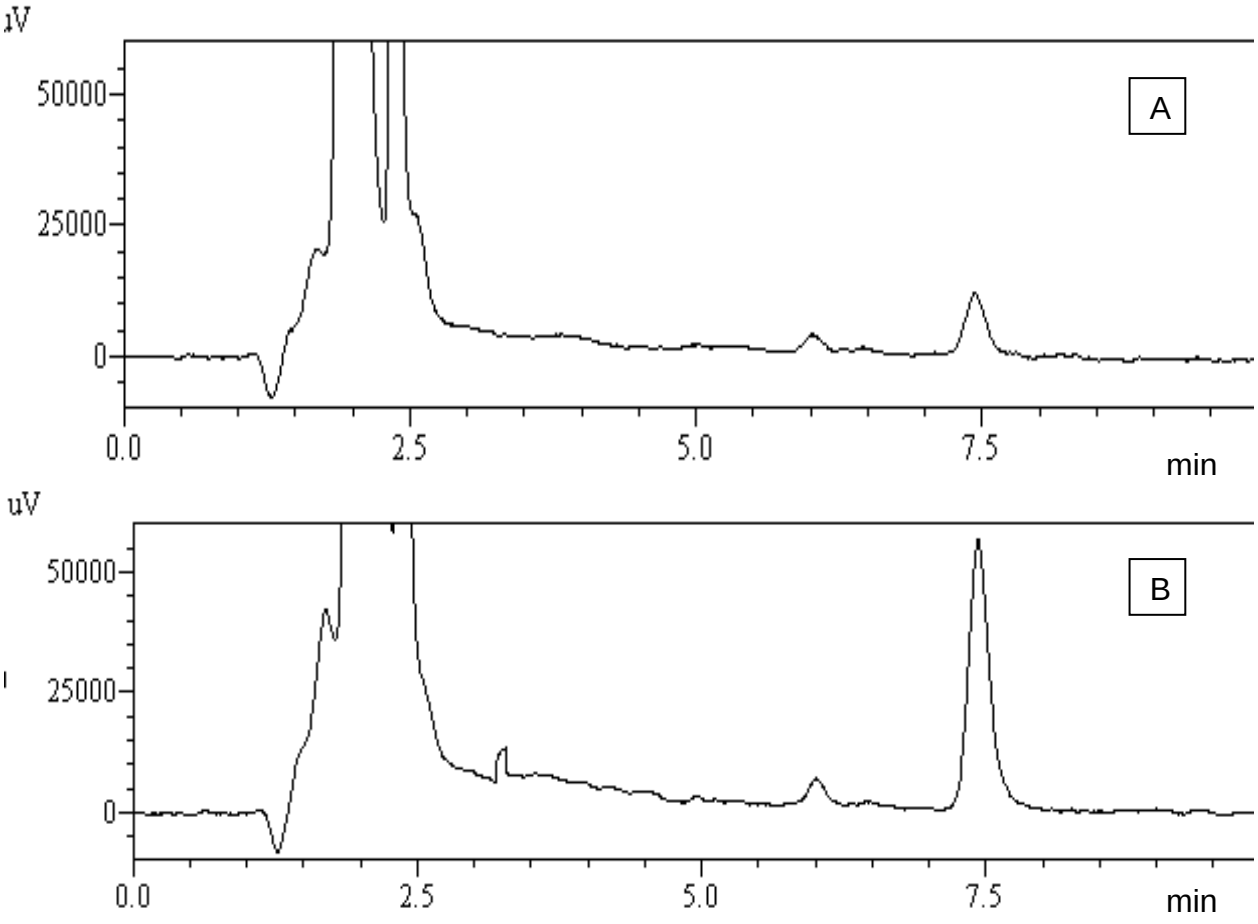


Figura 5.5 - Cromatograma A - Amostra de leite cru naturalmente contaminado e; B – Amostra (A) adicionada de padrão de $AFM_1$ (Tempo de retenção da $AFM_1$ = 7,5 min)

Outro procedimento utilizado para confirmar a identidade de $AFM_1$ foi a derivatização com a formação do composto $AFM_1$ hemi-acetal. Na Figura 5.6, o cromatograma A refere-se à uma amostra de leite cru naturalmente contaminado onde o pico de $AFM_1$ é representado pelo pico no tempo de retenção igual a 10,4 minutos, devido a diminuição do fluxo da fase móvel de 1,0 para 0,7 mL por minuto. O cromatograma B, da Figura 5.6, apresenta a mesma amostra após o processo de derivatização onde o pico da $AFM_1$ hemi-acetal, resultante da reação da $AFM_1$ com o ácido trifluoracético, aparece no TR igual a 4,9 minutos, novamente confirmando a identidade da $AFM_1$.

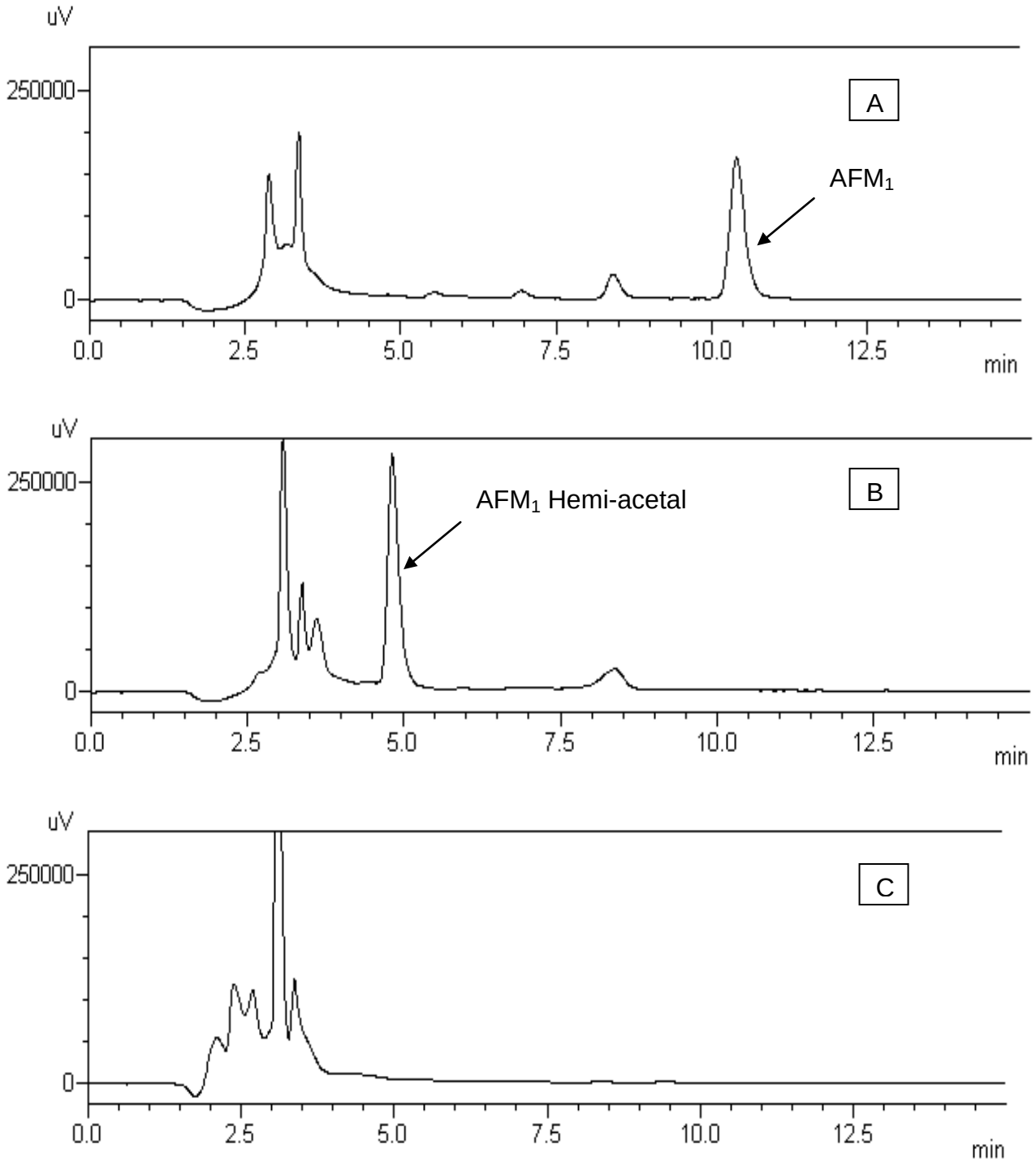


Figura 5.6 - Cromatograma A - Amostra de leite cru naturalmente contaminada, em fluxo 0,7 mL/min TR $AFM_1$ = 10,4 min; B – Amostra (A) após o processo de derivatização, com ácido trifluoracético, em fluxo 0,7 mL/min TR $AFM_1$ hemi-acetal = 4,9 min; C - Amostra com nível não detectado de $AFM_1$ derivatizada com ácido trifluoracético, ausência do pico $AFM_1$ hemi-acetal

Esses dois procedimentos foram realizados, inicialmente, com padrão de $AFM_1$ e, ao longo do projeto, com amostras de leite cru naturalmente contaminadas, com diferentes concentrações.

## 5.3 Obtenção das amostras

Foram obtidas quantidades variáveis de subamostras (50 mL) por fazendas ao longo dos meses. Na Tabela 5.3 estão apresentadas o número de subamostras mensais enviadas pelas fazendas de cada mesorregião.

Tabela 5.3 - Número de subamostras mensais enviadas pelas fazendas de cada mesorregião

| | Mesorregião | | |
|---|---|---|---|
| Mês | Araçatuba | Bauru | Vale do Paraíba |
| Julho | 2 | 4 | 2 |
| Agosto | 1 | 2 | 2 |
| Setembro | 1 | 3 | 2 |
| Outubro | 1 | 3 | 2 |
| Novembro | 2 | 3 | 1 |
| Dezembro | 1 | 4 | 2 |
| Janeiro | 1 | 3 | 2 |
| Fevereiro | 1 | 2 | 1 |
| Março | 2 | 3 | 1 |
| Abril | 3 | 4 | 2 |

Quando 2 ou mais subamostras foram recebidas no período, estas foram homogeneizadas para compor uma amostra representativa.

Como o fornecimento das amostras de leite dependia do envio das mesmas pelas indústrias que compram leite e realizam o controle de qualidade de acordo com a IN-51 (BRASIL, 2002b), houve situações em que algumas amostras não foram enviadas em determinado mês. O caso mais crítico ocorreu nos meses de julho e agosto, no qual cinco fazendas da região de Bauru não enviaram amostras para análise. Essas e outras amostras não enviadas para análises foram dadas como perdidas estatisticamente.

Sendo assim, o total de amostras recebidas e analisadas no projeto, foi igual a 429, sendo 144 da mesorregião de Araçatuba, 139 de Bauru e 146 do Vale do Paraíba.

## 5.4 Resultados da análise de $AFM_1$

A Tabela 5.4 apresenta os resultados da incidência, a média e mediana da contaminação e a distribuição da contaminação. Para uma análise mais detalhada e a melhor compreensão dos resultados obtidos para $AFM_1$, os mesmos foram subdivididos de acordo com o nível de contaminação. As faixas de contaminação estabelecidas foram:

**Não Detectada (ND):** amostras com nível não detectado de toxina, ou seja, amostras abaixo do limite de detecção (LD = 0,003 µg $L^{-1}$)

**Traços:** amostras com concentração de $AFM_1$ no intervalo entre o limite de detecção (0,003 µg $L^{-1}$) e abaixo do limite de quantificação do método utilizado (LQ = 0,01 µg $L^{-1}$)

**LQ a ≤ 0,05 µg $L^{-1}$**: amostras com concentração de $AFM_1$ no intervalo entre o limite de quantificação (LQ = 0,01 µg $L^{-1}$) e ≤0,05 µg $L^{-1}$ que é o limite máximo estabelecido pela Comunidade Européia (LMCE),

**> 0,05 a ≤ 0,5 µg $L^{-1}$**: amostras com concentração de AFM acima do LMCE, porém abaixo de 0,5 µg $L^{-1,}$ que é do limite máximo brasileiro (LMBr)

**>0,5 µg $L^{-1}$**: amostras acima do LMBr.

Tabela 5.4 - Distribuição dos resultados de $AFM_1$ em leite cru de fazendas de 3 mesorregiões do Estado de São Paulo

| Ocorrência | Araçatuba | Bauru | Vale do Paraíba | Total |
|---|---|---|---|---|
| nº de amostras analisadas | 144 (100%) | 139 (100%) | 146 (100%) | 429 (100%) |
| Não Detectadas | 72 (50,0%) | 51 (36,7%) | 96 (65,8%) | 219 (51,0%) |
| Traços* | 33 (22,9%) | 25 (18,0%) | 32 (21,9%) | 90 (21,0%) |
| LQ a ≤0,05 μg $L^{-1}$ | 33 (22,9%) | 44 (31,7%) | 15 (10,3%) | 92 (21,4%) |
| > 0,05 a ≤ 0,5 μg $L^{-1}$ | 5 ( 3,5%) | 17 (12,2%) | 3 ( 2,1%) | 25 ( 5,8%) |
| > 0,5 μg $L^{-1}$ | 1 ( 0,7%) | 2 ( 1,4%) | 0 ( 0,0%) | 3 ( 0,7%) |
| Incidência (%) | 50,0% | 63,3% | 34,2% | 49,0% |
| Média ** (± desv.pad.) | 0,015 (±0,054) B | 0,031 (±0,081) A | Traços (±0,021) C | 0,017 (±0,05) |
| Mediana | ND | Traços | ND | ND |
| Faixa de contaminação*** | 0,0100 - 0,617 | 0,0102 - 0,602 | 0,012 - 0,188 | 0,0100 - 0,617 |

* Traços significa que a concentração de $AFM_1$ estava entre o limite de detecção (0,003 μg $L^{-1}$) e abaixo do limite de quantificação (0,01 μg $L^{-1}$).
** Média considerando todas as amostras analisadas. Adotando o valor de 0,0015 para amostras com nível não detectado de AFM1 (ND) e 0,0050 para amostras abaixo do limite de quantificação (0,01 μg $L^{-1}$).
*** Valores mínimo e máximo, considerando apenas as amostras acima do limite de quantificação (LQ=0,01 μg $L^{-1}$).
Nota 1: Entre parênteses está o desvio padrão para cada média calculada.
Nota 2: letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam que os resultados são estatisticamente diferentes ($p<0,05$).

A incidência de $AFM_1$ foi observada em 49% das 429 amostras de leite cru analisadas. Em 21% das amostras foram encontrados apenas traços de $AFM_1$, ou seja, níveis abaixo do limite de quantificação (LQ = 0,01 µg $L^{-1}$), e nos 28% restantes a contaminação ficou distribuída da seguinte maneira: 21,5% entre LQ e 0,05 µg $L^{-1}$, estando estas dentro das legislações da comunidade Européia e do Brasil; 6,5% acima de 0,05 µg $L^{-1}$ (LMCE) e 0,7% acima de 0,5 µg $L^{-1}$ (LMBr).

Os resultados de incidência de $AFM_1$ apresentados foram semelhantes aos estudos realizados no Brasil por Pereira et al. (2005) e Shundo e Sabino (2006) que também analisaram amostras leite cru. Pereira et al. (2005) encontraram 19 (52,8%) das 36 amostras de leite cru provenientes da região de Lavras-MG, contaminadas com $AFM_1$ em valores que variaram de > 0,002 a 0,074 µg $L^{-1.}$ Shundo e Sabino (2006) observaram 59,1% de amostras positivas, representando 13 das 22 amostras de leite cru adquiridas na cidade de Marília – SP. No estado de São Paulo, a maioria dos levantamentos realizados para avaliar a ocorrência de $AFM_1$ foram realizados em leite processado e apresentam resultados de incidência que variaram de 77,1 a 95,2%, com níveis de contaminação que variaram de >0,01 a >0,5 µg $L^{-1}$ (GARRIDO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006 e SHUNDO et al., 2009). Garrido et al. (2003) analisaram 139 amostras de leite pasteurizado e esterilizado coletados em estabelecimentos da cidade de Ribeirão Preto, e encontraram uma maior incidência de amostras contaminadas (79,9%). Destas não foi encontrada nenhuma amostra acima do limite da legislação brasileira. Trabalhos realizados em outros países para determinar a ocorrência de $AFM_1$ em leite cru e comercial apresentaram resultados de incidência semelhantes ao encontrado no presente estudo: na Turquia, Unusan (2006); na Coréia do Sul, Lee et al. (2009); na Argentina, Alonso et al. (2010) encontraram 58,1%, 48% e 64%, respectivamente, de incidência de $AFM_1$ nas amostras analisadas.

A incidência da contaminação de $AFM_1$ é freqüentemente maior no leite comercial do que no leite cru. Isso ocorre devido à diluição do leite cru a granel não contaminado com poucas amostras de leite contaminado. Por essa mesma razão, raramente ocorrem altas concentrações de $AFM_1$ no leite comercial. (GALVANO et al., 2005).

Neste estudo, do total de amostras analisadas, o percentual encontrado acima de 0,5 µg $L^{-1}$, que é o limite máximo do Brasil, foi de 0,7% representando apenas 3 das 429 amostras analisadas, sendo duas na mesorregião de Bauru e uma na de Araçatuba. Nos trabalhos anteriormente citados, Shundo e Sabino (2006) e Pereira et al. (2005) que avaliaram amostras de leite cru, não encontraram nenhuma delas com concentrações acima de 0,5 µg $L^{-1}$. No entanto, Sassahara et al. (2005), que analisaram leite cru de 42 fazendas ao norte do Estado do Paraná, encontrou 7% delas com contaminação acima do limite permitido. Já Gonçalez et al. (2005) avaliando 43 amostras de leite comercial coletadas de diferentes usinas de 27 municípios do estado São Paulo encontraram 11 (25,6%) com concentrações acima de 0,5 µg $L^{-1}$. Em contrapartida, levantamentos realizados avaliando amostras de leite processado (pasteurizado, esterilizado e em pó) não encontraram nenhuma amostra acima deste limite tanto no Brasil (GARRIDO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006; SHUNDO et al., 2009) como em outro países: Nakajima et al. (2004) no Japão; Natchmann et al. (2007) na Itália; Boudra et al. (2007) na França; Alonso et al. (2010) na Argentina; Rahimi et al. (2010) no Iran, Hussain et al. (2010), no Paquistão, e Bilandzic et al. (2010) na Croácia.

O percentual encontrado de amostras acima de 0,05 µg $L^{-1}$ (LMCE) foi de 6,5%, sendo que, a mesorregião de Bauru foi a que apresentou o maior percentual ($p<0,05$) de amostras nessa faixa. Os trabalhos anteriormente citados de Shundo e Sabino (2006) e Pereira et al. (2005) apresentaram percentuais de 9,0% e 5,6% respectivamente, portanto próximos ao encontrado no presente estudo. Os percentuais encontrados acima desse limite em levantamentos recentes realizados em outros países foram: 11% na Argentina (ALONSO et al.,2010), 1,64% na Croácia (BILANDZIC et al., 2010) e 1% na Itália (DECASTELLI et al., 2007).

A média de contaminação das 429 amostras analisadas foi de 0,0166 µg $L^{-1}$ (± 0,055), com um coeficiente de variação (C.V.) igual a 329,3%, indicando uma ampla variação entre os resultados. Em cada mesorregião, a média e o desvio padrão das amostras foi igual a: 0,015 (±0,054), 0,031 (±0,081) e traços (±0,021), referentes a mesorregião de Araçatuba, Bauru e Vale do Paraíba respectivamente. A análise estatística, realizada nos dados transformados, indicou diferença significativa entre as

médias de contaminação sendo que a mesorregião de Bauru apresentou a maior média de contaminação e a mesorregião do Vale do Paraíba a menor.

Os valores de mediana calculados para cada mesorregião foram menores do que o limite de quantificação do método, visto que mais de 50% dos resultados obtidos são de amostras com nível não detectado de $AFM_1$.

Considerando apenas as 120 amostras quantificadas, ou seja, com concentração maior que 0,01 µg $L^{-1}$, a variação da contaminação do total das amostras ocorreu entre 0,010 - 0,617 µg $L^{-1}$, que, coincidentemente também é a faixa de contaminação das fazendas da mesorregião de Araçatuba, ou seja, as amostras de maior e menor concentração de $AFM_1$ foram encontradas nas fazendas da mesorregião de Araçatuba. As faixas de contaminação encontradas para as fazendas das mesorregiões de Bauru e Vale do Paraíba foram, respectivamente, 0,0102 - 0,602 e 0,012 - 0,188 µg $L^{-1}$.

Os percentuais encontrados de amostras acima de 0,05 µg $L^{-1}$, limite máximo da Comunidade Européia, em cada mesorregião estudada foram estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$). A mesorregião do Vale do Paraíba foi a que apresentou o menor percentual de amostras nessa faixa, 2,1% seguida da de Araçatuba com 4,2% e a de Bauru com 13,6%.

### 5.4.1 Resultados da contaminação do leite cru com $AFM_1$ por fazenda

A média e desvio padrão dos resultados originais e transformados de cada fazenda estudadas estão apresentados na Tabela 5.5.

As médias das fazendas de cada mesorregião foram comparadas, sendo a mesorregião de Bauru, a única que apresentou diferença significativa ($p<0,05$) entre as fazendas.

As fazendas 5 e 6 BA apresentaram média de contaminação <LD , que foi significativamente menor ($p<0,05$) do que as fazendas 2 BA (0,024 µg $L^{-1}$), 4 BA (0,017 µg $L^{-1}$), 10 BA (0,061 µg $L^{-1}$) e 13 BA (0,123 µg $L^{-1}$). As demais fazendas não apresentaram diferença estatística entre si.

Tabela 5.5 - Média dos resultados de $AFM_1$ encontrados nas amostras de leite cru de 45 fazendas de três mesorregiões do Estado de São Paulo

| | Araçatuba (AR) | | | | Bauru (BA) | | | | Vale do Paraíba (VP) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fazenda | Média | | T Média | | Média | | T Média | | Média | | T Média | |
| 1 | <LQ* | a | 19,90 | (± 9,00) | <LQ | bc | 18,62 | (±8,03) | <LQ | a | 16,87 | (±6,62) |
| 2 | <LQ* | a | 18,85 | (±8,73) | 0,024 (±0,022) | ab | 8,65 | (±4,10) | 0,038 (±0,068) | a | 13,75 | (±9,20) |
| 3 | 0,013 (±0,016)* | a | 13,90 | (±7,84) | 0,032 (±0,045) | abc | 13,03 | (±9,64) | <LD | a | 21,15 | (±6,03) |
| 4 | 0,073 (±0,192) | a | 15,64 | (±9,82) | 0,017 (±0,010) | ab | 10,20 | (±6,30) | <LD* | a | 23,22 | (±5,15) |
| 5 | 0,015 (±0,018) | a | 13,03 | (±7,59) | <LD | c | 23,48 | (±4,93) | <LQ | a | 21,75 | (±6,72) |
| 6 | <LD** | a | 24,36 | (±4,13) | <LD | c | 23,48 | (±4,93) | <LQ | a | 21,38 | (±7,59) |
| 7 | <LD | a | 21,15 | (±6,03) | 0,126 (±0,199) | abc | 14,71 | (±11,95) | 0,014 (±0,025) | a | 15,01 | (±8,15) |
| 8 | <LD | a | 24,65 | (±3,70) | 0,014 (±0,014) | abc | 16,10 | (±10,30) | <LQ | a | 22,70 | (±6,85) |
| 9 | <LQ | a | 16,01 | (±7,20) | <LQ | abc | 14,75 | (±6,43) | <LD | a | 23,48 | (±4,92) |
| 10 | 0,015 (±0,019)* | a | 15,90 | (±9,78) | 0,061 (±0,022)*** | a | 4,26 | (±0,90) | <LQ* | a | 20,55 | (±8,10) |
| 11 | <LQ | a | 23,92 | (±6,00) | 0,032 (0,063)** | abc | 11,40 | (±6,94) | <LD | a | 22,32 | (±5,64) |
| 12 | 0,019 (±0,038) | a | 17,36 | (±9,53) | 0,012 (0,012)** | abc | 14,95 | (±9,36) | <LQ | a | 23,92 | (±6,01) |
| 13 | <LQ | a | 17,22 | (±7,76) | 0,123 (0,200)** | ab | 9,20 | (±10,36) | <LQ** | a | 22,11 | (±7,06) |
| 14 | 0,032 (±0,054) | a | 13,08 | (±8,05) | 0,020 (0,027)** | bc | 17,84 | (±11,02) | <LQ | a | 23,75 | (±6,54) |
| 15 | 0,014 (±0,016) | a | 15,11 | (±9,55) | <LQ | abc | 14,21 | (±7,15) | <LD | a | 22,31 | (±5,64) |

* Resultados calculados com 9 amostras coletadas.
** Resultados calculados com 8 amostras coletadas.
*** Resultados calculados com 7 amostras coletadas.
<LQ: valores abaixo de 0,01 μg $L^{-1}$.
<LD: valores abaixo de 0,003 μg $L^{-1}$
Nota 1: os demais foram calculados com os resultados dos dez meses de coleta.
Nota 2: Para o cálculo das médias foram considerados todos os resultados, adotando o valor de 0,0015 para amostras com nível não detectado de $AFM_1$ (ND), e 0,0050 para amostras abaixo do limite de quantificação (0,01 μg $L^{-1}$).
Nota 3: T média refere-se ao calculo das médias a partir dos dados transformados.
Nota 4: Letras minúsculas e diferentes na mesma coluna indicam que os resultados são estatisticamente diferentes ($p<0,05$).

Embora as fazendas 3, 7, 11 e 14 BA apresentem contaminação por $AFM_1$ na faixa entre 0,017 e 0,126 µg $L^{-1}$, semelhantes as fazendas consideradas estatisticamente diferentes das fazendas 5 e 6 BA, quando a transformação dos dados foi realizada para a normalização dos mesmos observou-se que as médias das fazendas 5 e 6 BA assumem o valor de 23,48 diferindo estatisticamente das fazendas que apresentam média inferior a 10,2, que são as fazendas 2, 4, 10 e 13 BA.

A distribuição da contaminação do leite cru por faixa de contaminação, em cada mesorregião, está apresentada a seguir.

#### 5.4.1.1 Análises dos resultados de $AFM_1$ na mesorregião de Araçatuba

O resultado da distribuição da contaminação encontrada nas 15 fazendas da mesorregião de Araçatuba está apresentado na Tabela 5.6. Como o número de amostras coletadas de cada fazenda variou no período, os resultados estão apresentados tanto numericamente como em percentual.

Tabela 5.6 - Distribuição da contaminação (em %) das fazendas da mesorregião de Araçatuba

| Fazenda | N° de amostras | Faixa de Contaminação (µg $L^{-1}$) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ND | <0,01 | 0,01<X≤0,05 | 0,05<X≤0,5 | >0,5 |
| 1 AR | 9 | 6 (67%) | 0 | 3 (33%) | 0 | 0 |
| 2 AR | 9 | 5 (56%) | 2 (22%) | 2 (22%) | 0 | 0 |
| 3 AR | 9 | 2 (22%) | 4 (45%) | 3 (33%) | 0 | 0 |
| 4 AR | 10 | 4 (40%) | 3 (30%) | 2 (20%) | 0 | 1 (10%) |
| 5 AR | 10 | 2 (20%) | 3 (30%) | 4 (40%) | 1 (10%) | 0 |
| 6 AR | 8 | 7 (87,5%) | 1 (12,5%) | 0 | 0 | 0 |
| 7 AR | 10 | 6 (60%) | 4 (40%) | 0 | 0 | 0 |
| 8 AR | 10 | 9 (90%) | 1 (10%) | 0 | 0 | 0 |
| 9 AR | 10 | 3 (30%) | 4 (40%) | 3 (30%) | 0 | 0 |
| 10 AR | 9 | 4 (45%) | 1 (11%) | 3 (33%) | 1 (11%) | 0 |
| 11 AR | 10 | 9 (90%) | 0 | 1 (10%) | 0 | 0 |
| 12 AR | 10 | 5 (50%) | 2 (20%) | 2 (20%) | 1 (10%) | 0 |
| 13 AR | 10 | 4 (40%) | 3 (30%) | 3 (30%) | 0 | 0 |
| 14 AR | 10 | 2 (20%) | 4 (40%) | 2 (20%) | 2 (20%) | 0 |
| 15 AR | 10 | 4 (40%) | 1 (10%) | 5 (50%) | 0 | 0 |

Analisando o resultado da distribuição da contaminação das fazendas da mesorregião de Araçatuba, observa-se que todas as fazendas apresentaram ao menos uma amostra contendo a $AFM_1$, ainda que em níveis aceitáveis pelas legislações da Comunidade Européia e do Brasil.

As fazendas 6, 7 e 8 AR apresentaram amostras contaminadas, porém abaixo do limite de quantificação (LQ=0,01 µg $L^{-1}$). Nessas fazendas, 60 a 90% das amostras apresentaram nível não detectado de $AFM_1$.

Considerando o limite máximo da Comunidade Européia (LMCE=0,05 µg $L^{-1}$), das 15 fazendas da mesorregião de Araçatuba, 10 (67%) atenderiam a legislação, 4 (26%) apresentaram uma amostra acima deste limite e apenas 1 (7%), a fazenda 14 AR, apresentou duas das dez amostras analisadas acima deste limite.

Na fazenda 4 AR, das 10 amostras analisadas 4 apresentaram nível não detectado (< 0,003 µg $L^{-1}$), 5 contaminações ≤ 0,05 µg $L^{-1}$, atendendo portanto ao

LMCE, e apenas 1 acima de 0,5 µg $L^{-1}$ (LMBr). Embora neste trabalho não se tenha os dados dos alimentos fornecidos aos animais, pode-se inferir que no mês de coleta da amostra que apresentou contaminação acima de 0,5 µg $L^{-1}$, ocorreu o fornecimento de algum alimento com elevada contaminação por aflatoxina $B_1$, mostrando que o controle constante da qualidade da dieta fornecida, bem como a padronização dos fornecedores, é fundamental para se evitar a contaminação do leite com $AFM_1$.

Na mesorregião de Araçatuba, as fazendas 6 AR e 8 AR apresentaram apenas uma amostra positiva, porém em um nível abaixo do limite de quantificação do método utilizado e as demais amostras com nível não detectado de $AFM_1$.

As fazendas 5 AR e 14 AR foram as que apresentaram o maior percentual de amostras contaminadas. Nessas duas fazendas, apenas 20% das amostras apresentaram nível não detectado de $AFM_1$. A fazenda 5 AR apresentou 70% das suas amostras contaminadas, porém abaixo dos limites da Comunidade Européia e do Brasil, e 10% das amostras desta fazenda estava acima do LMCE. Na fazenda 14 AR, 60% das amostras estavam abaixo do LMCE e 20 % acima.

O valor da contaminação de cada amostra da mesorregião de Araçatuba pode ser visualizado no ANEXO B.

#### 5.4.1.2 Análises dos resultados de $AFM_1$ na mesorregião de Bauru.

O resultado da distribuição da contaminação encontrada nas fazendas da mesorregião de Bauru está apresentado na Tabela 5.7.

Tabela 5.7 - Distribuição da contaminação (em %) nas fazendas da mesorregião de Bauru

| Fazenda | N° de amostras | Faixa de Contaminação (µg $L^{-1}$) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ND | <0,01 | 0,01<X≤0,05 | 0,05<X≤0,5 | >0,5 |
| 1 BA | 10 | 5 (50%) | 3 (30%) | 2 (20%) | 0 | 0 |
| 2 BA | 10 | 0 | 3 (30%) | 6 (60%) | 1 (10%) | 0 |
| 3 BA | 10 | 3 (30%) | 2 (20%) | 3 (30%) | 2 (20%) | 0 |
| 4 BA | 10 | 1 (10%) | 2 (20%) | 7 (70%) | 0 | 0 |
| 5 BA | 10 | 8 (80%) | 2 (20%) | 0 | 0 | 0 |
| 6 BA | 10 | 8 (80%) | 2 (20%) | 0 | 0 | 0 |
| 7 BA | 10 | 5 (50%) | 0 | 1 (10%) | 3 (30%) | 1 (10%) |
| 8 BA | 10 | 5 (50%) | 0 | 5 (50%) | 0 | 0 |
| 9 BA | 10 | 2 (20%) | 5 (50%) | 3 (30%) | 0 | 0 |
| 10 BA | 7 | 0 | 0 | 2 (29%) | 5 (71%) | 0 |
| 11 BA | 8 | 1 (12,5%) | 2 (25%) | 5 (50%) | 1 (12,5%) | 0 |
| 12 BA | 8 | 3 (37,5%) | 1 (12,5%) | 5 (50%) | 0 | 0 |
| 13 BA | 8 | 2 (25%) | 0 | 2 (25%) | 3 (37,5%) | 1 (12,5%) |
| 14 BA | 8 | 5 (62,5%) | 0 | 1 (12,5%) | 2 (25%) | 0 |
| 15 BA | 10 | 3 (30%) | 3 (30%) | 4 (40%) | 0 | 0 |

Na mesorregião de Bauru, 13 (87%) das 15 fazendas atendem apenas a legislação do Brasil (LMBr = 0,5 µg $L^{-1}$), enquanto que 10 (67%) das 15 fazendas atendem a legislação da Comunidade Européia (LMCE = 0,05 µg $L^{-1}$).

As fazendas 5 BA e 6 BA apresentaram nível não detectado de $AFM_1$ em 80 % de suas amostras. Os outros 20% das amostras destas fazendas apresentaram níveis de $AFM_1$ abaixo do limite de quantificação do método (0,01 µg $L^{-1}$).

Já as fazendas 2 BA e 10 BA não apresentaram nenhuma amostra com nível não detectado de $AFM_1$ e 10 e 7% de suas amostras, respectivamente, apresentaram contaminação acima do LMCE. Isto indica que durante todo o período avaliado a dieta fornecida aos animais estava contaminada com $AFB_1$, e em diferentes concentrações.

As fazendas 7 BA e 13 BA apresentaram 1 de suas amostras com contaminação acima do LMBr e, 40 e 50% das amostras dessas fazendas não atendem ao LMCE. Pode-se observar que a fazenda 7 BA apresentou 50% de suas amostras com níveis

não detectados de $AFM_1$. Isso mostra que a qualidade da dieta fornecida aos animais variou durante o período.

O valor da contaminação de cada amostra da mesorregião de Bauru pode ser visualizado no ANEXO C.

#### 5.4.1.3 Análises dos resultados de $AFM_1$ na mesorregião do Vale do Paraíba.

O resultado da distribuição da contaminação encontrada nas fazendas da mesorregião do Vale do Paraíba está apresentado na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 - Distribuição da contaminação nas fazendas da região de Vale do Paraíba

| Fazenda | N° de amostras | Faixa de Contaminação (µg $L^{-1}$) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ND | <0,01 | 0,01<X≤0,05 | 0,05<X≤0,5 | >0,5 |
| 1 VP | 10 | 3 (30%) | 6 (60%) | 1 (10%) | 0 | 0 |
| 2 VP | 10 | 3 (30%) | 2 (20%) | 3 (30%) | 2 (20%) | 0 |
| 3 VP | 10 | 6 (60%) | 4 (40%) | 0 | 0 | 0 |
| 4 VP | 9 | 7 (78%) | 2 (22%) | 0 | 0 | 0 |
| 5 VP | 10 | 7 (70%) | 2 (20%) | 1 (10%) | 0 | 0 |
| 6 VP | 10 | 7 (70%) | 2 (20%) | 1 (10%) | 0 | 0 |
| 7 VP | 10 | 3 (30%) | 3 (30%) | 3 (30%) | 1 (10%) | 0 |
| 8 VP | 10 | 8 (80%) | 1 (10%) | 1 (10%) | 0 | 0 |
| 9 VP | 10 | 8 (80%) | 2 (20%) | 0 | 0 | 0 |
| 10 VP | 9 | 6 (67%) | 1 (11%) | 2 (22%) | 0 | 0 |
| 11 VP | 10 | 7 (70%) | 3 (30%) | 0 | 0 | 0 |
| 12 VP | 10 | 9 (90%) | 0 | 1 (10%) | 0 | 0 |
| 13 VP | 8 | 6 (75%) | 1 (12,5%) | 1 (12,5%) | 0 | 0 |
| 14 VP | 10 | 9 (90%) | 0 | 1 (10%) | 0 | 0 |
| 15 VP | 10 | 7 (70%) | 3 (30%) | 0 | 0 | 0 |

Analisando a distribuição da contaminação encontrada nas fazendas da mesorregião do Vale do Paraíba, quanto aos limites máximos permitidos, todas (100%) as fazendas atendem a legislação nacional, enquanto que 13 (87%) das 15 fazendas atendem a legislação da Comunidade Européia. As fazendas que não atendem a

legislação da Comunidade Européia são as fazendas 2 e 7 VP, que apresentaram 20 e 10%, respectivamente, das suas amostras acima de 0,05 µg $L^{-1}$.

As fazendas 3, 4, 9, 11 e 15 VP, apesar de terem apresentado parte de suas amostras positivas para $AFM_1$, todas as concentrações encontradas estavam abaixo do limite de quantificação do método, e, portanto, estas foram as que apresentaram os melhores resultados dentro da mesorregião do Vale do Paraíba.

As fazendas 12 e 14 VP apresentaram 90% de suas amostras com nível não detectado de $AFM_1$ e apenas 10% delas no intervalo $0,01 \leq x \leq 0,05$ µg $L^{-1}$, ou seja, dentro dos limites da Comunidade Européia e do Brasil.

Vale salientar que, a mesorregião do Vale do Paraíba foi a que apresentou a menor média de contaminação (traços), e o menor percentual de positividade das amostras, em relação às outras duas mesorregiões estudadas.

O valor da contaminação de cada amostra da mesorregião do Vale do Paraíba pode ser visualizado no ANEXO D.

Considerando-se as variações observadas na concentração de $AFM_1$ bem como, e no percentual de amostras contaminadas do leite produzido nas três mesorregiões avaliadas do Estado de São Paulo, a qualidade do alimento fornecido aos animais, no que diz respeito à contaminação com aflatoxinas é de fundamental importância para o controle da contaminação de $AFM_1$.

Nos últimos anos, alguns trabalhos foram realizados no Brasil sobre o monitoramento da contaminação dos alimentos fornecidos ao gado leiteiro. Pontes Netto et al. (2002) analisaram 436 amostras de alimentos fornecidos a animais, provenientes principalmente de propriedades leiteiras de 8 estados brasileiros, incluindo São Paulo, no período de maio de 1997 a março de 2001, e observaram a presença de $AFB_1$, em concentração maior que 4,0 µg $kg^{-1}$, em 31,1% das amostras de ração (de 74 analisadas), 33,3% das de caroço de algodão (de 9), 18,8% das de silagem (de 133), 10,7% das de milho (de 140) e 14,3% das amostras de soja (de 21).

Sassahara et al. (2005) avaliaram diferentes alimentos fornecidos ao gado leiteiro, no Estado do Paraná, e observaram que dentre os alimentos avaliados, os que apresentaram o maior percentual de amostras positivas para aflatoxinas foram as rações comerciais (26% das 27 amostras avaliadas), as rações preparadas nas

fazendas (53% das 15 amostras analisadas), além do farelo de milho (100% das 2 amostras analisadas). Porém, nenhuma das 40 amostras de silagem de milho apresentou contaminação.

Em estudo recente realizado, em propriedades leiteiras do Estado de São Paulo, por Oliveira et al. (2010), avaliando a dieta, fornecida ao animais, à base de milho além de outros ingredientes (caroço de algodão, sorgo, forragem, silagem de milho, cana-de-açúcar, polpa cítrica e trigo) observaram que 40% das mesmas (do total de 30 amostras) estavam contaminadas com $AFB_1$, em concentrações que variaram de 1,2 a 19,5 µg $kg^{-1}$.

Esses estudos demonstram a necessidade de um monitoramento constante da qualidade das matérias primas utilizadas na dieta animal, e a implantação de um controle rigoroso para evitar a contaminação com $AFB_1$, e consequentemente de $AFM_1$ no leite.

## 5.5 Análise da Exposição da População à $AFM_1$ através da ingestão de leite

A partir dos dados de ocorrência obtidos neste estudo foi possível discutir a respeito da exposição da população à $AFM_1$ através da ingestão de leite.

Para os cálculos de ingestão de $AFM_1$ foram considerados os valores de consumo de leite por faixa etária e peso apresentados por Shundo et al. (2009) e Alonso et al. (2010) que foram: 400 mL/dia para crianças e peso de 23 kg e; 350 mL/dia para adultos e peso de 60 kg.

Assim, a ingestão diária de $AFM_1$ pelo consumo do leite foi calculada pela equação apresentada a seguir para cada faixa etária e utilizando-se como concentração de $AFM_1$ no leite as médias e medianas (Tabela 5.9) avaliadas em cada mesorregião, e também a média e mediana geral do total de amostras avaliadas.

$$\text{Ingestão de } AFM_1 = \frac{\text{Concentração de } AFM_1 \text{ X volume de leite consumido por dia}}{\text{peso do indivíduo}}$$

Tabela 5.9 - Resultados da média e mediana referentes à contaminação de $AFM_1$ em amostras de leite cru de 3 mesorregiões do estado de São Paulo

| Mesorregião | Concentração de $AFM_1$ em leite cru (µg $L^{-1}$) | |
|---|---|---|
| | Média | Mediana |
| Araçatuba | 0,015 | 0,003* |
| Bauru | 0,031 | 0,005* |
| Vale do Paraíba | 0,007* | 0,002* |
| Todas as amostras | 0,017 | 0,002* |

*Valores calculados abaixo do limite de quantificação do método (LQ = 0,01 µg $L^{-1}$), foram considerados apenas para efeito dos cálculos de ingestão de $AFM_1$ pelo consumo de leite.

Os valores calculados abaixo de 0,01 µg $L^{-1}$, que foi o limite de quantificação do método, foram considerados apenas para efeito dos cálculos. A estimativa da ingestão de $AFM_1$ através do consumo de leite por faixa etária em cada mesorregião do Estado de São Paulo está apresentada na Tabela 5.10.

Tabela 5.10 - Estimativa da ingestão de $AFM_1$ através do consumo de leite por faixa etária, considerando o leite produzido em três mesorregiões do Estado de São Paulo

| Mesorregião | Estimativa da ingestão diária de $AFM_1$ por faixa etária (ng $kg^{-1}$ peso corpóreo $dia^{-1}$) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Crianças (23 kg) | | Adultos (60 kg) | |
| | Média | Mediana | Média | Mediana |
| Araçatuba | 0,261 | 0,052 | 0,087 | 0,017 |
| Bauru | 0,539 | 0,087 | 0,181 | 0,029 |
| Vale do Paraíba | 0,122 | 0,035 | 0,041 | 0,012 |
| Geral | 0,295 | 0,035 | 0,010 | 0,012 |

De acordo com dados apresentados pelo JECFA (HENRY et al., 2001), a ingestão diária de $AFM_1$ nos países latino americanos foi de 0,058 ng $kg^{-1}$ peso corpóreo $dia^{-1}$, considerando o peso de um adulto igual a 60 kg. Comparando essa estimativa com os valores obtidos nesta pesquisa e apresentados na Tabela 5.10, pode-se observar que apenas na mesorregião do Vale do Paraíba a estimativa de ingestão de $AFM_1$ para adultos, considerando a média da contaminação das amostras está abaixo do que foi apresentado pelo JECFA (HENRY et al., 2001). Já nas

mesorregiões de Araçatuba, Bauru e a média geral das amostras, considerando a média da contaminação, observou-se que estas foram 1,6, 3,1 e 1,7 vezes maiores do que o estimado pelo JECFA (HENRY et al., 2001). Se considerarmos a mediana para o calculo de ingestão, todas as mesorregiões, bem como a média geral estariam abaixo da estimativa apresentada pelo JECFA (HENRY et al., 2001).

Os valores médios estimados de ingestão de $AFM_1$, considerando a média geral de contaminação das amostras, foram de 0,295 e 0,010 ng $kg^{-1}$ peso corpóreo $dia^{-1}$ para crianças (23 kg) e para adultos (60 kg), respectivamente, mostrando-se menores dos que os estimados em trabalhos recentes realizados por Shundo et al. (2009) no Brasil (1,04 e 0,188 ng $kg^{-1}$ peso corpóreo $dia^{-1}$, para crianças e adultos, respectivamente) e por Alonso et al. (2010) na Argentina (0,5 e 0,17 ng $kg^{-1}$ peso corpóreo $dia^{-1}$, para crianças e adultos, respectivamente).

Quando considerada apenas a mesorregião de Bauru, que apresentou concentração média de $AFM_1$ maior do que as outras duas mesorregiões, a estimativa de ingestão de $AFM_1$ foi 1,9 vezes menor, para crianças e semelhante para adultos) do que Shundo et al. (2009) e semelhantes aos resultados apresentados por Alonso et al. (2010).

Dados da estimativa de ingestão de $AFM_1$ pelo consumo de leite na França (Leblanc et al, 2005) indicaram valores de 0,04 e 0,01 ng $kg^{-1}$ peso corpóreo $dia^{-1}$, para crianças e adultos, respectivamente, valores estes menores do que os observados no presente estudo.

Considerando que neste estudo 93,5% das amostras apresentaram contaminação menor ou igual a 0,05 µg $L^{-1}$, que é o limite máximo permitido na Comunidade Européia (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2010), a média de contaminação das amostras seria igual a 0,0071 µg $L^{-1}$ (abaixo do limite de quantificação do método), e dessa forma, a estimativa de ingestão de $AFM_1$ através do consumo de leite seria de 0,12 e 0,04 para crianças e adultos, respectivamente.

Não existem valores definidos de ingestão diária aceitável (IDA) para substâncias com potencial carcinogênico e genotóxicos, que é o caso da $AFB_1$ e $AFM_1$ (IARC, 2003). Porém, se considerarmos as legislações da Comunidade Européia (0,05 µg $L^{-1}$) e a do Brasil (0,5 µg $L^{-1}$), as ingestões máximas permitidas de $AFM_1$, pelo consumo de

leite, seriam de 0,87 e 8,70 ng $kg^{-1}$ peso corpóreo $dia^{-1}$, para crianças, e 0,29 e 2,91 ng $kg^{-1}$ peso corpóreo $dia^{-1}$, para adultos, nos países da Europa e no Brasil, respectivamente. Portanto, a ingestão de $AFM_1$ pelo consumo de leite, calculado a partir da média de contaminação observado nas amostras (geral), foi 2,9 e 29,5 vezes abaixo da estimativa de ingestão máxima calculada com base na legislação da Comunidade Européia e do Brasil, respectivamente, tanto para crianças como para adultos.

## 5.6 Resultados dos Parâmetros de Qualidade e de Composição do leite

### 5.6.1 Avaliação dos Parâmetros de Qualidade

Os parâmetros de qualidade avaliados foram à contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT). Posteriormente, esses parâmetros foram testados para correlação com os resultados de aflatoxina $M_1$.

#### 5.6.1.1 Resultados da Contagem de Células Somáticas (CCS)

Os resultados de média, desvio padrão e mediana de contagem de células somáticas (CCS) do leite cru coletado das 3 mesorregiões estão apresentadas na Tabela 5.11.

Tabela 5.11 - Resultados de Média e desvio padrão da Contagem de Células Somáticas (CCS), em $10^3$ CS $mL^{-1}$, do leite cru obtido de 3 mesorregiões estado de São Paulo

| Mesorregião | Média CCS ($10^3$ CS $mL^{-1}$) | Média TCCS* ($10^3$ CS $mL^{-1}$) | Mediana |
|---|---|---|---|
| Araçatuba | 547 (± 538) a | 2,59 (±0,37) | 403 |
| Bauru | 441 (± 187) a | 2,58 (±0,25) | 466 |
| Vale do Paraíba | 504 (± 251) a | 2,64 (±0,23) | 464 |

*TCCS refere-se a média calculado a partir dos dados transformados de CCS (transformação= $\log CCS$)

Nota: Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que os resultados são estatisticamente diferentes ($p<0,05$).

As médias de CCS de cada mesorregião foram comparadas e não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) entre si, na analise realizada com os dados transformados. As médias das fazendas das 3 regiões, assim como as mediana, mantiveram-se abaixo do limite máximo recomendado pela IN-51, que é de $750.10^3$ CS $mL^{-1}$ (BRASIL, 2002b).

A Tabela 5.12 apresenta a média e mediana dos resultados de CCS, e o número de amostras acima e abaixo de $750.10^3$ CS $mL^{-1}$, valor limite estabelecido pela Instrução Normativa n° 51, obtidos para cada uma das 45 fazendas estudadas.

As fazendas da mesorregião de Araçatuba apresentaram 20,8% das amostras analisadas com valores de CCS acima de $750.10^3$ CS $mL^{-1}$, sendo que as fazendas que apresentaram o maior percentual de amostras acima desse limite foram: 4,13 e 14 AR, representando 90, 70 e 70% das amostras avaliadas, respectivamente. Por esse motivo estas foram as fazendas da mesorregião de Araçatuba que apresentaram tanto a média com a mediana acima do limite em questão. A fazenda 4 BA apresentou o maior valor absoluto de média de CCS e diferiu estatisticamente de 7 das 15 fazendas avaliadas. A fazenda 12 AR apresentou média $625.10^3$ CS $mL^{-1}$ e desvio padrão de $629.10^3$ CS $mL^{-1}$ pelo fato de apenas uma das 10 amostras terem apresentado contagem acima de $750.10^3$ CS $mL^{-1}$ ($3209.10^3$ CS $mL^{-1}$). No entanto, o valor da mediana desta fazenda foi igual a $388.10^3$ CS $mL^{-}1$, abaixo do limite indicado pela IN-51.

Tabela 5.12 - Resultados de média e mediana da contagem de célula somática (CCS) em leite cru, em $10^3$ células somáticas $mL^{-1}$, de fazendas de três mesorregiões do Estado de São Paulo, e o número de resultados por fazenda abaixo e acima do limite indicado pela IN-51

| Fazenda | Araçatuba | | | | | | Bauru | | | | | | Vale do Paraíba | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Média | | | Mediana | <750.10$^3$ CS mL$^{-1}$ | ≥ 750.10$^3$ CS mL$^{-1}$ | Média | | | Mediana | <750.10$^3$ CS mL$^{-1}$ | ≥ 750.10$^3$ CS mL$^{-1}$ | Média | | | Mediana | <750.10$^3$ CS mL$^{-1}$ | ≥ 750.10$^3$ CS mL$^{-1}$ |
| 1 | 361 | (±119) | bcd | 318 | 9 | 0 | 414 | (±94) | bcd | 375 | 10 | 0 | 683 | (±355) | ab | 617 | 7 | 3 |
| 2 | 372 | (±204) | cd | 396 | 8 | 1 | 556 | (±83) | ab | 560 | 10 | 0 | 481 | (±146) | abc | 468 | 9 | 1 |
| 3 | 335 | (±141) | cd | 343 | 9 | 0 | 650 | (±163) | a | 610 | 7 | 3 | 505 | (±263) | abc | 498 | 9 | 1 |
| 4 | 1411 | (±1090) | a | 947 | 1 | 9 | 340 | (±73) | cde | 327 | 10 | 0 | 341 | (±90) | bcd | 320 | 9 | 0 |
| 5 | 610 | (±258) | abc | 671 | 7 | 3 | 606 | (±123) | ab | 550 | 9 | 1 | 852 | (±232) | a | 824 | 3 | 7 |
| 6 | 280 | (±196) | cd | 257 | 8 | 0 | 557 | (±117) | ab | 560 | 10 | 0 | 625 | (±297) | ab | 596 | 8 | 2 |
| 7 | 297 | (±115) | cd | 293 | 10 | 0 | 293 | (±134) | de | 265 | 10 | 0 | 262 | (±178) | cd | 226 | 10 | 0 |
| 8 | 407 | (±73) | abcd | 398 | 10 | 0 | 432 | (±66) | abc | 435 | 10 | 0 | 633 | (±233) | ab | 699 | 7 | 3 |
| 9 | 473 | (±117) | abcd | 436 | 10 | 0 | 229 | (±68) | e | 241 | 10 | 0 | 465 | (±125) | abc | 487 | 10 | 0 |
| 10 | 466 | (±183) | abcd | 445 | 8 | 1 | 72 | (± 15) | f | 78 | 7 | 0 | 572 | (±129) | ab | 567 | 7 | 2 |
| 11 | 208 | (±163) | d | 164 | 10 | 0 | 486 | (±81) | abc | 478 | 8 | 0 | 398 | (±121) | abcd | 326 | 10 | 0 |
| 12 | 625 | (±929) | bcd | 388 | 9 | 1 | 447 | (±111) | abc | 441 | 8 | 0 | 597 | (±255) | ab | 577 | 8 | 2 |
| 13 | 1068 | (±578) | ab | 1011 | 3 | 7 | 654 | (±99) | a | 626 | 7 | 1 | 316 | (±118) | bcd | 276 | 8 | 0 |
| 14 | 818 | (±444) | abc | 841 | 3 | 7 | 555 | (±106) | ab | 520 | 7 | 1 | 343 | (±245) | bcd | 280 | 9 | 1 |
| 15 | 362 | (±294) | cd | 338 | 9 | 1 | 259 | (±113) | e | 215 | 10 | 0 | 463 | (±122) | abcd | 442 | 10 | 0 |

Nota: Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que os resultados são estatisticamente diferentes ($p<0,05$).

Por outro lado, a fazenda 11 AR, que apresentou o menor valor de CCS ($208.10^3$ CS $mL^{-1}$) apresentou média significativamente diferente ($p<0,05$) apenas em relação as fazendas 4 AR (1411 $10^3$ CS $mL^{-1}$), 5 AR ($610.10^3$ CS $mL^{-1}$), 13 AR ($1060.10^3$ CS $mL^{-1}$) e 14 AR ($818.10^3$ CS $mL^{-1}$).

As fazendas da mesorregião de Bauru apresentaram tanto média quanto mediana abaixo de $750.10^3$ CS $mL^{-1}$. Das 139 amostras analisadas, apenas 6 (4,3%) apresentaram-se acima de $750.10^3$ CS $mL^{-1}$ (BRASIL, 2002b). A fazenda 3 BA foi a que apresentou o maior percentual (30%) de amostras acima do limite indicado, sendo a média de CCS desta mesma fazenda ($650.10^3$ CS $mL^{-1}$ ± 163) significativamente maior ($p<0,05$) do que a das fazendas 1 BA ($414.10^3$ CS $mL^{-1}$), 4 BA ($340.10^3$ CS $mL^{-1}$), 7 BA ($293.10^3$ CS $mL^{-1}$), 9 BA ($229.10^3$ CS $mL^{-1}$), 10 BA ($72.10^3$ CS $mL^{-1}$) e 15 BA ($259.10^3$ CS $mL^{-1}$).

A fazenda 10 BA foi a que apresentou a menor média de CCS ($72.10^3$ CS $mL^{-1}$) em relação a todas as 45 fazendas estudadas, e dentro da mesorregião de Bauru a média apresentada por ela foi significativamente menor ($p<0,05$) do que todas as demais fazendas.

Na mesorregião do Vale do Paraíba, das 146 amostras analisadas, 22, ou seja, 15,1% apresentaram CCS acima de $750.10^3$ CS $mL^{-1}$ (BRASIL, 2002b). A fazenda que apresentou o maior percentual de amostras acima deste limite foi a 5 VP, com 70%. A fazenda 5 VP foi a única desta mesorregião que apresentou tanto média como mediana acima dos $750.10^3$ CS $mL^{-1}$, sendo a média da mesma igual a $852.10^3$ CS $mL^{-1}$ que foi significativamente maior ($p<0,05$) do que as médias encontradas nas fazendas 4 VP ($341.10^3$ CS $mL^{-1}$), 7 VP ($262.10^3$ CS $mL^{-1}$), 13 VP ($316.10^3$ CS $mL^{-1}$) e 14 VP ($343.10^3$ CS $mL^{-1}$).

#### 5.6.1.2 Resultados da Contagem Bacteriana Total (CBT)

Os resultados de média, desvio padrão e mediana de contagem bacteriana total (CBT) do leite cru das 3 mesorregiões estudadas estão apresentados na Tabela 5.13.

Tabela 5.13 - Resultados de média, desvio padrão e mediana da Contagem Bacteriana Total (CBT), em $10^3$ UFC $mL^{-1}$, do leite cru de 3 mesorregiões do Estado de São Paulo

| Mesorregião | Média CBT ($10^3$ UFC $mL^{-1}$) | | Média TCBT* ($10^3$ UFC $mL^{-1}$) | Mediana |
|---|---|---|---|---|
| Araçatuba | 1.314 (±2054) | a | 2,56 (±0,75) | 345 |
| Bauru | 75 (±143) | c | 1,36 (±0,53) | 17 |
| Vale do Paraíba | 165 (±413) | b | 1,72 (±0,64) | 53 |

*TCBT refere-se à média calculado a partir dos dados transformados de CBT (transformação= $\log CBT$)

Nota: Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que os resultados são estatisticamente diferentes ($p<0,05$).

A mesorregião de Araçatuba foi a que apresentou a maior ($p<0,05$) média de CBT ($1314.10^3$ UFC $mL^{-1}$), seguida do Vale do Paraíba ($165.10^3$ UFC $mL^{-1}$) e por fim Bauru ($75.10^3$ UFC $mL^{-1}$).

De acordo com a Instrução Normativa n° 51 (IN-51), de 2002, o limite máximo estabelecido para CBT em leite cru é de $750.10^3$ UFC $mL^{-1}$ para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste até 01/07/2011 e a partir desta data passará a ser de $100.10^3$ UFC $mL^{-1}$ para leite individual e de $300.10^3$ UFC $mL^{-1}$ para leite conjunto (BRASIL, 2002b). Dessa forma, a mesorregião de Araçatuba foi a única que apresentou média acima do limite atualmente em vigor.

A avaliação da CBT por fazenda em cada mesorregião esta apresentada na Tabela 5.14, na qual observou-se diferença estatística ($p<0,05$) entre as fazendas da mesma mesorregião.

As fazendas da mesorregião de Araçatuba foram as que apresentaram as maiores médias de CBT em relação às fazendas das outras duas mesorregiões. A fazenda 3 AR foi a que apresentou a maior média de CBT ($p<0,05$), que foi igual a $5014.10^3$ UFC $mL^{-1}$, diferindo de todas as outras fazendas, com exceção da 7 AR, 11 AR e 12 AR. Porém, se observarmos os valores de mediana, a fazenda que apresentou o maior valor de CBT foi a 7 AR ($4580.10^3$ UFC $mL^{-1}$), contra $3720.10^3$ UFC $mL^{-1}$, calculada para a fazenda 3 AR. A menor média observada dentro dessa mesorregião foi a referente a fazenda 4 AR ($362.10^3$ UFC $mL^{-1}$ ± 996), que por

sua vez também apresentou a menor valor de mediana calculado ($25.10^3$ UFC $mL^{-1}$). Das 15 fazendas da mesorregião de Araçatuba, cinco apresentaram média acima de $750.10^3$ UFC $mL^{-1}$, limite máximo estabelecido pela IN-51 (BRASIL, 2002b), sendo elas, 3, 5, 7, 11 e 12 AR. Por outro lado, se considerarmos a mediana, o número de fazendas acima dos $750.10^3$ UFC $mL^{-1}$ cai para 4, isso porque a fazenda 5 AR que apresentou média de CBT igual a $788.10^3$ UFC $mL^{-1}$ apresentou mediana igual a $721.10^3$ UFC $mL^{-1}$, estando portanto abaixo dos $750.10^3$ UFC $mL^{-1}$, estabelecidos pela IN-51.

Analisando a mesorregião de Bauru quanto à contagem bacteriana total (CBT), suas fazendas foram as que apresentaram as médias mais baixas em relação às demais mesorregiões. A fazenda que apresentou a maior média foi a 13 BA ($164.10^3$ UFC $mL^{-1}$) diferindo significativamente ($p<0,05$) das fazendas 10 BA ($17.10^3$ UFC $mL^{-1}$) e 11 BA ($27.10^3$ UFC $mL^{-1}$). Quanto a analise das medianas calculadas, a fazenda que apresentou o menor valor de mediana foi a 11 BA, igual a $4.10^3$ UFC $mL^{-1}$, sendo esta a que também apresentou a menor média de CBT ($27.10^3$ UFC $mL^{-1}$).

Na mesorregião do Vale do Paraíba a fazenda 10 VP apresentou média de $525.10^3$ UFC $mL^{-1}$, que foi significativamente maior do que as fazendas 1 VP ($26.10^3$ UFC $mL^{-1}$), 2 VP ($23.10^3$ UFC $mL^{-1}$), 3 VP ($22.10^3$ UFC $mL^{-1}$) e 11 VP ($79.10^3$ UFC $mL^{-1}$). A fazenda 13 VP foi a que apresentou a maior mediana ($211.10^3$ UFC $mL^{-1}$), enquanto que a menor mediana apresentada foi a da fazenda 3 VP ($7.10^3$ UFC $mL^{-1}$).

Nenhuma das fazendas da mesorregião de Bauru e do Vale do Paraíba apresentou média ou mediana acima dos $750.10^3$ UFC $mL^{-1}$ estabelecidos pela IN-51 (BRASIL, 2002b).

Tabela 5.14 – Resultados de média e mediana da contagem bacteriana total (CBT) em leite cru, em $10^3$ UFC $mL^{-1}$, de fazendas de três mesorregiões do Estado de São Paulo, e o número de amostras por fazenda abaixo e acima do limite indicado pela IN-51

| Fazenda | Araçatuba | | | | | | Bauru | | | | | | Vale do Paraíba | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Média | | | Mediana | <750.10$^3$ UFC $mL^{-1}$ | ≥ 750.10$^3$ UFC $mL^{-1}$ | Média | | | Mediana | <750.10$^3$ UFC $mL^{-1}$ | ≥ 750.10$^3$ CS $mL^{-1}$ | Média | | | Mediana | <750.10$^3$ CS $mL^{-1}$ | ≥ 750.10$^3$ CS $mL^{-1}$ |
| 1 | 213 | (±134) | def | 209 | 9 | 0 | 18 | (±20) | abc | 9 | 10 | 0 | 26 | (±45) | bc | 12 | 10 | 0 |
| 2 | 459 | (±378) | cde | 393 | 8 | 1 | 44 | (±75) | abc | 16 | 10 | 0 | 23 | (±23) | bc | 16 | 10 | 0 |
| 3 | 5014 | (±2102) | a | 3720 | 0 | 9 | 70 | (±100) | ab | 42 | 10 | 0 | 22 | (±45) | c | 7 | 10 | 0 |
| 4 | 362 | (±996) | f | 25 | 9 | 1 | 26 | (±33) | abc | 8 | 10 | 0 | 493 | (±778) | ab | 110 | 7 | 2 |
| 5 | 788 | (±435) | bcde | 721 | 6 | 4 | 27 | (±37) | abc | 11 | 10 | 0 | 127 | (±180) | abc | 35 | 10 | 0 |
| 6 | 175 | (±142) | def | 138 | 8 | 0 | 21 | (±22) | abc | 14 | 10 | 0 | 163 | (±112) | ab | 147 | 10 | 0 |
| 7 | 4079 | (±2242) | ab | 4580 | 9 | 1 | 88 | (±86) | ab | 55 | 10 | 0 | 47 | (±32) | abc | 40 | 10 | 0 |
| 8 | 272 | (±525) | ef | 98 | 9 | 1 | 38 | (±35) | abc | 20 | 10 | 0 | 93 | (±84) | abc | 63 | 10 | 0 |
| 9 | 261 | (±487) | ef | 96 | 9 | 1 | 193 | (±440) | abc | 13 | 9 | 1 | 163 | (±67) | ab | 184 | 10 | 0 |
| 10 | 571 | (±888) | def | 86 | 7 | 2 | 17 | (±7) | bc | 15 | 8 | 0 | 525 | (±1062) | a | 211 | 8 | 1 |
| 11 | 3577 | (±3346) | abc | 2991 | 2 | 8 | 27 | (±63) | c | 4 | 8 | 0 | 79 | (±115) | bc | 9 | 10 | 0 |
| 12 | 2128 | (±2297) | abcd | 1214 | 4 | 6 | 33 | (±59) | abc | 9 | 8 | 0 | 341 | (±885) | abc | 28 | 9 | 1 |
| 13 | 313 | (±252) | def | 270 | 9 | 1 | 164 | (±217) | a | 55 | 8 | 0 | 86 | (±123) | abc | 39 | 8 | 0 |
| 14 | 729 | (±710) | cde | 515 | 6 | 4 | 31 | (±40) | abc | 16 | 8 | 0 | 168 | (±129) | abc | 186 | 10 | 0 |
| 15 | 648 | (±717) | cde | 331 | 6 | 4 | 83 | (±102) | abc | 46 | 9 | 0 | 158 | (±132) | abc | 95 | 10 | 0 |

Nota: letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p<0,05$).

### 5.6.2 Resultados dos Parâmetros de Composição do leite cru

Os parâmetros de composição determinados nas amostras de leite cru foram: gordura (GOR), proteína (PROT), lactose (LACT) e sólidos totais (ST).

Primeiramente, foram analisadas as médias dos parâmetros de composição das mesorregiões. As médias dos resultados de composição de cada mesorregião estão dispostas na Tabela 5.15.

Tabela 5.15 – Média, desvio padrão e coeficiente de variação (C.V.) dos resultados de composição (gordura, proteína, lactose e sólidos totais), todos em % (massa/massa), das amostras de leite cru analisadas por mesorregião

| | Araçatuba | | | | Bauru | | | | Vale do Paraíba | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Média | | | C.V.* | Média | | | C.V.* | Média | | | C.V.* |
| Gordura | 3,60 | (±0,56) | A | 15,7 | 3,63 | (±0,29) | A | 8,00 | 3,55 | (±0,22) | A | 6,2 |
| Proteína | 3,14 | (±0,18) | B | 5,58 | 3,19 | (±0,13) | A | 4,11 | 3,11 | (±0,11) | B | 3,35 |
| Lactose | 4,51 | (±0,15) | A | 3,10 | 4,48 | (±0,11) | A | 2,46 | 4,50 | (±0,10) | A | 2,22 |
| Sólidos Totais | 12,23 | (±0,67) | A | 5,48 | 12,28 | (±0,34) | A | 2,77 | 12,15 | (±0,29) | A | 2,39 |

* Coeficiente de variação.
Nota: Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam que os resultados são estatisticamente diferentes ($p<0,05$).

Dos parâmetros analisados, o teor de proteína foi o único que apresentou diferença significativa entre as regiões. A média obtida das fazendas da mesorregião de Bauru 3,19 % (±0,13) durante o período foi significativamente maior ($p<0,05$) do que as médias obtidas na mesorregião de Araçatuba (3,14 % ±0,18) e Vale do Paraíba (3,11 % ±0,11).

Em relação aos demais parâmetros de composição não foram observadas diferenças estatísticas entre as mesorregiões.

Analisando os resultados da média da composição do leite cru de cada fazenda individualmente, observou-se diferenças estatísticas ($p<0,05$) entre as fazendas dentro de uma mesma região para os cinco parâmetros de composição avaliados. Essas diferenças estão apresentadas nos ANEXOS E, F e G, referentes às mesorregiões de Araçatuba, Bauru e Vale do Paraíba, respectivamente.

## 5.7 Correlação dos parâmetros de qualidade e composição com a presença de $AFM_1$.

Os parâmetros de qualidade avaliados foram: contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT), e os parâmetros de composição: teor de gordura, de proteína, de lactose, de sólidos totais e extrato seco desengordurado. Esses parâmetros foram avaliados para detectar uma possível correlação dos mesmos com a presença de $AFM_1$.

Dos parâmetros avaliados nenhum apresentou correlação significativa com a presença de $AFM_1$ no leite cru. Os valores de correlação obtidos estão apresentados no ANEXO H.

Masoero et al. (2007), sugerem que o aumento do número de células somáticas causado pela infecção do úbere por *Staphilococcus,* causador da mastite, influência o aumento da taxa de conversão de $AFB_1$ em $AFM_1$ com excreção no leite, devido ao aumento da permeabilidade da membrana, além de alterar a composição do leite. Contudo, no presente estudo não foi observada correlação significativa entre CCS e $AFM_1$.

Estudos realizados com ovelhas e gado leiteiro apresentaram correlação entre a CBT e CCS (JAYARAO et al., 2004, RYSANEK e BABAK, 2005 e GONZALO et al., 2006). Koop et al. (2009), realizaram estudo de correlação entre CCS e CBT em leites de tanque originado de rebanho de cabras na Holanda, e obtiveram um coeficiente de correlação igual a 0,4, considerado moderado pelos autores. Para os dados obtidos neste estudo, não foi observada correlação significativa entre os parâmetros citados.

De acordo com Schaellibaum (2000), a mastite, e o conseqüente aumento da CCS, provoca alterações nos três principais componentes do leite, gordura, proteína e lactose. A extensão do aumento da CCS e as mudanças na composição do leite estão diretamente relacionadas com a superfície do tecido mamário atingido pela reação inflamatória, que tem sua capacidade de sintetização diminuída. A influência da concentração de células somáticas sobre os constituintes do leite, como gordura e proteína, é muito discutida. Alguns autores (KING, 1978, citado por MUNRO et al.,1984; ROGERS et al., 1989) sugerem que o aumento significativo de células somáticas

(acima de 500.000 céls./mL) leva a redução do teor de gordura. King (1978) citado por Munro et al. (1984), encontrou uma queda significativa do teor de gordura, comparando quartos do úbere não infectados com quartos com CCS superior a 500.000/ mL. Porém, Munro et al. (1984) não encontraram diferenças significativas no teor de gordura de amostras de leite que apresentavam CCS entre 250.000 e 500.000/ mL. Estudo realizado por Picinin (2003), em 31 propriedades leiteiras na Região Metropolitana de Belo Horizonte, demonstrou que quanto maior a CCS, menores os teores de gordura e sólidos totais no leite. No presente estudo, não foram observadas correlações significativas entre a CCS e os parâmetros de composição do leite cru.

# 6 CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos nas amostras de leite cru bovino avaliados no presente estudo, pode-se concluir que:

- ✓ Do total das 429 amostras analisadas, 210 (49%) apresentaram contaminação com $AFM_1$ em concentrações que variaram de traços (>0,003 a <0,01 µg $L^{-1}$) a 0,617 µg $L^{-1}$. Destas 120 (27,9%) estavam acima de 0,01 µg $L^{-1}$ que foi o limite de quantificação do método empregado.

- ✓ A concentração média de $AFM_1$ das amostras da mesorregião de Bauru (0,031 µg $L^{-1}$) foi estatisticamente maior do que da mesorregião de Araçatuba (0,015 µg $L^{-1}$) e do Vale do Paraíba (traços).

- ✓ Não houve diferença estatística entre as mesorregiões, a respeito da incidência de $AFM_1$ observada.

- ✓ De acordo com as legislações atualmente vigentes, 6,5% das amostras não atenderiam o limite máximo permitido pela Comunidade Européia (0,05 µg $L^{-1}$) e apenas 0,7% não atenderiam o limite máximo do Brasil (0,5 µg $L^{-1}$).

- ✓ Na avaliação individual das fazendas, todas apresentaram ao menos uma amostra de leite cru contaminada com $AFM_1$. No entanto, 30 (67%) das 45 fazendas, não apresentaram nenhuma das 10 amostras coletadas acima de 0,05 µg $L^{-1}$. Considerando o limite máximo permitido no Brasil (0,5 µg $L^{-1}$), 42 (93%) das 45 fazendas, atenderiam a legislação Brasileira, com todas as amostras coletadas.

- ✓ Não foi observada correlação significativa entre a presença de $AFM_1$ com nenhum dos parâmetros de qualidade e composição do leite cru avaliados.

**REFERÊNCIAS**

ALBORZI, S.; POURABBAS, B.; RESHIDI, M.; ASTANEH, B. Aflatoxin M1 contamination in pasteurized Milk in Shiraz (south of Iran). **Food Control**. Guildford, v. 17, p. 582-584, 2006.

ALLCROFT, R.; ROGERS, H.; LEWIS, G.; NABNEY, J.; BEST, P. E. Metabolism of aflatoxin in sheep: Excretion of the “Milk toxin”. **Nature**, London, v. 209, p. 154-155, 1966.

ALONSO, V. A.; MONGE, M. P.; LARRIESTRA, A.; DALCERO, A.; CAVAGLIERI, L. R.; CHIACCHIERA, S. M. Naturally occurring aflatoxin M1 in raw bulk milk from farm cooling tanks in Argentina. **Food and Additives Contaminants**. London, v. 27, p. 373-379, 2010.

ALVIM, R. Brasil cresce no comércio de produtos lácteos. **Revista SEBRAE Agronegócios**, Brasília, n. 6, p. 10-13, out. 2007.

BAGGIO, E. C. R. **Determinação de aflatoxina M1 em leite pasteurizado pelos métodos de CCD e CLAE utilizando coluna de imunoafinidade.** 2006. 111p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

BARCINA, Y.; ROS, G.; RINCON, F. Azidiol as a preservative for milk samples. **Anales de Veterinaria de Murcia**, Murcia, v.3, p.65-69, 1987.

BARRIENTOS, A. A.; ARROYO, J.; CANTÓN, R.; NOMBELA. C. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington, v. 13, n. 2, p. 167-195, 2000.

BATTACONE, G., NUDDA, A., CANNAS, A., CAPPIO BORLINO, A., BOMBOI, G., PULINA G. Excretion of aflatoxin M1 in Milk of dairy ewes treated with different doses of aflatoxin B1. **Journal Dairy Science**. Lancaster, v. 86, p. 2667-2675, 2003.

BATTACONE, G.; NUDDA, A.; PALOMBA, M.; MAZZETTE, A.; PULINA, G. The transfer of aflatoxina M1 in milk of ewes fed diet naturally contaminated by aflatoxins and effect of inclusion of dried yeast culture in the diet. **Journal Dairy Science**. Lancaster, v. 92, p. 4997-5004, 2009.

BENNET, J. W.; FERNHOLZ, F. A. Effect of light on aflatoxines, anthraquinones, and sclerotia in Aspesgilllus flavus and Arpergillus parasiticus. **Mycologia**. Lancaster, v. 70, p. 106-116, 1978.

BENTLEY INSTRUMENTS. Disponível em: http://www.bentleyinstruments.com. Acesso em: 12 mar. 2008.

_____.**Somacount 300**: operator's manual. Chaska, 1995 (a). 12p.

_____.**Bentley 2000:** operator's manual. Chaska, 1995 (b). 77p.

_____.**Bactocount 150:** operator's manual. Chaska, 2004. 35p.

BILANDZIC, N.; VARENINA, I,; SOLOMUN, B. Aflatoxin M1 in raw milk in Croatia. **Food Control**. Guildford, v. 21, p. 1279-1281, 2010.

BOUDRA, H., J. BARNOUIN, S. DRAGACCI, AND D. P. MORGAVI. 2007. Aflatoxin M1 and ochratoxin A in raw bulk milk from French dairy herds. **Journal Dairy Science**. Lancaster, v. 90; p. 3197–3201.

BOX, G. E. P.; COX, D. R. "An analysis of transformations". **Journal of the Royal Statistical Society**, Series B. London, v. 26, n. 2, p. 211–252, 1964.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução GMC nº 25/02, de 2002 (a). Regulamento técnico Mercosul sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim, no milho. **Diário Oficial.** Brasília, DF, 16 out. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002 (b). Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, do Leite Tipo B, do Leite Tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 set. 2002. Seção 3. Disponível em: < http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa/in51.htm >. Acesso em: 25 set. 2002.

BRESSAN, M. & MARTINS, M. C. Segurança Alimentar na cadeia produtiva do leite e alguns de seus desafios. **Revista de Política Agrícola**, Ano XIII, nº 3; 2004.

BRUSTOLIN, J.C. **Uso de natamicina no controle do desenvolvimento de fungos em salame tipo italiano.** 2009. 53p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Santa Maria - Centro de Ciências Rurais. Santa Maria, RS. 2009.

CARVAJAL, M., BOLONOS, A., ROJO, F., MENDEZ, I. Aflatoxin in pasteurized and ultrapasteurized Milk with different fat content in Mexico. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 66, n. 10, p. 1885-1892, 2003.

CARVALHO, L. B.; AMARA; F. R. BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C.; BRITO, J. R. F. L.; LEITE, R. C. Contagem de células somáticas e isolamento de agentes causadores de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.59, n.1, p.242-245, 2007**.**

CHEMICAL LAND21. 2-BROMO-2-NITRO-1,3-PROPANEDIOL. Disponível em: http://www.chemicalland21.com/arokorhi/specialtychem/perchem/BRONOPOL.htm. Acesso em: 10 ago. 2010.

COMUNIDADE EUROPÉIA 2010. 2010/165 (CE) N°165/2010 de 26 de fevereiro 2010 que altera o regulamento (CE) n° 1881/2006, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios, no que diz respeito às aflatoxinas. **Jornal Oficial da Comunidade Européia** L 50, p. 8-12.

CORREA, B., GALHARDO, M., COSTA, E. O., SABINO, M. Distribution of molds and aflatoxins in dairy catlle feeds and raw milk. **Revista de Microbiologia**. São Paulo, v. 28, p. 279-283, 1997.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECNOLOGY (CAST). Mycotoxins: risk´s in plant, animal and human systems. Washington, 2003, 199 p. (Task Force Report, 139).

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effect of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters Review**.London, v. 127, p. 19-28, 2002.

DECASTELLI, L.; LAI, J.; GRAMAGLIA, M.; MONACO, A.; NATCHMANN, C.; OLDANO, F.; RUFFIER, M.; SEZIAN, A.; BANDIROLA, C. Aflatoxins occurrence in Milk and feed in Northern Italy during 2004-2005. **Food Control**. Guildford, v.18, p. 1263-1266, 2007.

DIENER, U.L.; DAVIS, N.D. **Aflatoxin formation in peanuts by Aspergillus flavus.** Auburn, Alabama Agricultural Experi-ment Station, 1977. 44p. (Bulletin, 493).

DRAGACCI, S.; GROSSO, F. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin M1 in liquid milk: collaborative study. **Journal of AOAC International**. Arlington, v. 84, n. 2, p. 437-443, 2001.

EMBRAPA GADO LEITE. **Produção de leite, vacas ordenhadas e produtividade animal no Brasil – 1980/2008***. 2008(a). Disponível em: http://www.cnpgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0230.php . Acesso em: 2 ago. 2008.

_____. **Classificação mundial dos principais países produtores de leite de vaca - 2007**. 2008(b). Disponível em: http://www.cnpgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0212.php . Acesso em: 30 jul. 2010.

_____. **Ranking da produção anual de leite por Estado no Brasil, 2006**. 2008(c). Disponível em: <http://www.cnpgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0240.php>. Acesso em: 25 mai. 2010.

_____. **Principais mesorregiões produtoras de leite no Estado de São Paulo 2002-2006**. 2008 (d). Disponível em: <http://www.cnpgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0242.php>. Acesso em: 15/07/2008 e 25/05/2010.

EUROPEAN COMMUNITY 2006. 2006/401/EC. Commission Regulation (EC) Nº 401/2006 of 23 february 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. **Official Journal of the European Union** L 70, p. 12-34.

FERRO, A. B. **Recorde: Brasil exportou US$ 273,3 milhões em lácteos em 2007**. 2008. Disponível em: www.milkpoint.com.br. Acesso em: 15 fev. 2008.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000.

GALVANO, F., GALOFARO, V., DE ANGELIS, A., GALVANO, M., BOGNANNO, M.; GALVANO G. Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Italy. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 61, p. 738-741, 1998.

GALVANO, F., RITIENI, A., PIVA, G., PIETRI, A. Mycotoxins in the human food chain. DIAZ, D. (Ed.) **The mycotoxin blue book.** Nottingham University Press, 2005, p. 187-224.

GARNER, R.C. Human biomonitoring for aflatoxin exposure at the molecular level. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS. 8., Mexico City, 1992. **Proceedings…** Mexico City: IUPAC, 1992. p. 35.

GARRIDO, N. S.; IHA, M. H.; SANTOS ORTOLANI, M. R.; DUARTE FÁVARO, R. M. Occurrence of aflatoxin $M_1$ and $M_2$ in Milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brasil. **Food Additives and Contamminats**. London, v. 20, n. 1, p. 70-73, 2003.

GIMENO, A. (2005) **Aflatoxina M1 no Leite; Riscos para a Saúde Pública, Prevenção e Controlo.** Disponível em: http://pt.engormix.com/MA-pecuaria-leite/saude/artigos/aflatoxina-leite-riscos-saude_3.htm. Acesso em: 10 ago. 2010.

GONÇALEZ, E., PINTO, M. M., MANGINELLI, S., FELICIO, J. D. Intoxicação de vacas leiteiras por farelo de algodão naturalmente contaminado com aflatoxinas. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 171-174, 2004.

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

GONZALO, C., CARRIEDO J.A., BENEITEZ E., JUAREZ M.T., DE LA FUENTE L.F., SAN PRIMITIVO F. Short communication: Bulk tank total bacterial count in dairy sheep:

Factors of variation and relationship with somatic cell count. **Journal Dairy Science**. Lancaster, v. 89, n. 2, p. 549-552, 2006.

HENRY, S. H.; WHITAKER, T.; RABBANI, I.; BOWERS, J.; PARK, D.; PRINCE, W.; BOSCH, F. X.; PENNINGTON, J.; VERGER, P.; YOSHIZAKA, T.; van EGMOND, H.; JONKER, M. A.; COKER, R. Aflatoxin $M_1$. In: WHO. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food.** Gevena, 2001. Chap. 1, p. 1-102. (WHO - Food Additives Series, 47).

HISADA, K., TERADA, H., YAMAMOTO, K., TSUBOUCHI, H., SAKABE, Y. Reverse-phase liquid chromatography determination and confirmation of aflatoxin M1 in cheese. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**. Washington, v. 67, p. 601–606, 1984.

HUNT, D. M.; RIBEIRO, R., SHIKI, S.; BIASI, D.; FARIA, A. P. Comparação de indicadores de desempenho de produtores de leite localizados dentro e fora do assentamento de reforma agrária no triangulo mineiro. **Revista de Economia e Sociologia Rural**. Brasília, v. 47, n. 1, p. 211-248, 2009.

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

HUSSAIN, I.; ANWAR, J.; ASI, M. R.; MUNAWAR, M. A.; KASHIF, M. Aflatoxin M1 contamination in milk from five dairy species in Pakistan. **Food Control**. Guildford, v. 21; p. 122-124; 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos** – DOQ – CGCRE - 008. Revisão 03 - fev. 2010. 20p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). IBGE Estados@. **Síntese do Estado de São Paulo**, dados de 2007. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=sp>. Acesso em: 25 maio 2010.

_____. IBGE Estados@. **Estado de São Paulo:** censo agropecuário 2006 – Resultados Preliminares. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=sp&tema=censoagro>. Acesso em: 25 maio 2010.

_____. **Pesquisa agropecuária municipal**. Embrapa Gado de Leite. Atualizado em março/ 2008. Disponível em: <http://www.cnpgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0242.php>. Acesso em: 25 maio 2010.

_____. **Histórico da divisão regional. (2010).** Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/geografia/default_div_int.shtm. Acesso em: 23 jun. 2010.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **IARC monograph series on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Lyon, n. 56, 1993.

_____. **IARC monograph on the evaluations of carcinogenics risks to human.** Lyon, v. 82, n. 171, 2002.

JANEWAY, C. A., TRAVERS, P. **Immunobiology**. London: Garland Publishing. 2001.

JAYARAO, B. M., PILLAI, S. R.; SAWANT, A. A.; WOLFGANG, D. R.; HEGDE, N. D. Guidelines for monitoring bulk tank somatic cell and bacterial counts. **Journal Dairy Science**. Lancaster, v. 87; p. 3561–3573, 2004.

KOOP, G.; NIELEN, M.; van WERVEN, T. Bulk milk somatic cell counts are related to bulk milk total bacterial counts and several herd-level risk factors in dairy goats. **Journal Dairy Science**. Lancaster, v. 92, p. 4355-4364, 2009.

LAFONT, P., SARFATI, J., GAILLARDIN, M., LAFONT, J. Influences de facteurs pathologiques et nutritionnels sur l'elimination de l'aflatoxine par la memelle chez la vache. **Microbiologie Aliments Nutrition**. Paris, v. 1; p. 293-300, 1983.

LEBLANC, J. C., TARD, A., VOLATIER, J. L., VERGER, P. (2005). Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from the first French total diet study. **Food Additives and Contaminants**. London, 22(7), 652–672.

LEE J.E., KWAK B.-M., AHN J.-H., JEON T.-H. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk in South Korea using an immunoaffinity column and liquid chromatography. **Food Control**. Guildford, v. 20; n. 2; p. 136-138**;** 2009.

LEITE BRASIL. **Mapa do leite no Estado de São Paulo.** 2006. Disponível em: <http://www.leitebrasil.org.br/download/mapadoleitesp.pdf >. Acesso em: 15 jul. 2010.

LEWIS, M. J. Heat treatment in milk. In: ROBINSON, R. K. (Ed.) **Modern dairy technology**. 2 th ed., London, Elsevier Applied Science Publishers, 1999.

LÓPEZ, C. E.; RAMOS, L. L.; RAMADÁN, S. S.; BULACIO, L. C. Presence of aflatoxin M1 in Milk for human consumption in Argentina. **Food Control**. Guildford, v. 14, p. 31-34, 2003.

MALLMANN, C. A.; SANTURIO, J. M.; SCHNEIDER, L. G.; ALMEIDA, C. A. A.; FONTANA, F. Z.; POZZOBON, M. C. Prevalência e sazonalidade de aflatoxina $M_1$ no leite produzido e comercializado no município de Santa Maria, RS – Brasil, In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICOTOXICOLOGIA, 2, 1997, Maracay. **Programa y Resumenes.** Maracay: Universidad Central de Venezuela / Sociedade Latinoamericana de Micotoxicologia, 1997, p. 91. (Resumo).

MARTINS, J. L. S.; MARTINS, I. S. Aflatoxina M1 no leite tipo “B” comercializado no município de São Paulo, SP. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, v. 20, n. 4, p. 303-308, 1986.

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

MASOERO, F.; GALLO, A.; MOSCHINI, M.; PIVA, G.; DIAZ, D. Carry-over of aflatoxin from feed to Milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. **Animal**. Cambridge, v. 1, n. 9, p. 1344-1350, 2007.

Mc KINNEY, J. E.; CAVANAGH, G. C.; BELL, J. T.; HOVERSLAND, A. S.; NELSON, D. M.; PEARSON, J.; SELKIRK, R. J. Effects of ammoniation on aflatoxins in ration fed lactating cows. **Journal Association Official Analytical Chemistry Society,** Arlington, v. 50, p. 79-84, 1973.

MERCOSUL/GMC. (2002). Res. N_ 25/02. **Regulamento técnico mercosul sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/mercosul/alimentos/25_02.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2010.

MONTAGNA, M. T.; NAPOLI, C.; DE GIGLIO, O.; IATTA, R.; BARBUTTI, G. Occurrence of Aflatoxin $M_1$ in Dairy Products in Southern Italy. **International Journal of Molecular Sciences**. Basel, v. 9, p. 2614 - 2621, 2008.

MUNRO, G.L.; G RIEVE, P.A.; KITCHEN, B.J. Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. **Australian Journal of Dairy Technology.** Melbourne, v.39, n.1, p.7-16, 1984.

NAKAJIMA, M., TABATA, S., AKIYAMA, H., Itoh, Y., TANAKA, T., SUNAGAWA, H., TYONAN, T., YOSHIZAWA, T.; KUMAGAI, S. Occurrence of aflatoxin M1 in domestic milk in Japan during the winter season. **Food Additives and Contaminants**: Part A. London, v. 21, n. 5, p. 472-478, 2004.

NATCHMANN, C.; GALLINA, S.; RASTELLI, M.; FERRO, G. L.; DECASTELLI, L. Regional monitoring plan regarding the presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk and UHT milk in Italy. **Food Control**. Guildford, v. 18, p. 623-629, 2007.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L.; BIRD, C.; PINTO, C. A. Immunochemical assessment of aflatoxin $M_1$ in milk powder consumed by infants in São Paulo, Brazil. **Food Additives and Contamminants**. London, v. 14, n. 1, p. 7-10, 1997.

OLIVEIRA, C. A.; ROSMANINHO, J.; ROSIM, R. Aflatoxin $M_1$ and cyclopiazonic acid in fluid milk trated in São Paulo, Brasil. **Food Additives and Contamminats**. London, v. 23, n. 2, p. 196-201, 2006.

OLIVEIRA, C. A. F.; SEBASTIÃO, L. S.; FAGUNDES, H.; ROSIM, R. E.; FERNANDES, A. M. Determinação de aflatoxina B1 em rações e aflatoxina M1 no leite de propriedades do Estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 30, p. 221-225, 2010.

ORGANIZATION PANAMERICANA DA LA SALUD. **Micotoxinas**. México, 1983. 131p. (Publicación Cientifica, 453).

PAAPE, M., MEHRZAD, J. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. **Journal Mammary Gland Biology and Neoplasia**. Springer, v.7, n.2, p.109-21, 2002.

PARREIRAS, J. F. M. **Ocorrência de aflatoxina $M_1$ e $B_1$ em leite e forragens na microrregião de Viçosa - MG**. 1985. 62 p. Dissertação (*Magister Scientiae* em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa – Viçosa, MG. 1985.

PARK, D. L. Effect of processing on aflatoxina. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. New York, v. 504, p. 173-179, 2002.

PEITRI, A.; BERTUZZI, T.; BERTUZZI, P.; PIVA, G. Aflatoxin M1 occurrence in samples of Grana Padano cheese. **Food Additives and Contamminants**. London, v. 14; p. 341-344, 1997.

PEREIRA, M. M. G., CARVALHO, E. P., PRADO, G., ROSA, C. A. R., VELOSO, T., SOUZA, L. A. F., RIBEIRO, J. M. M. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovines e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 29, n. 1, p. 106-112, 2005.

PETTERSSON, H. **Carry-over of aflatoxin from feedingsttufs to Milk. Swedish derogations from EC legislation in the area of feedingsttufs. Report 2. Undesirable substances and products.** Stockholm: Ministry of Agriculture, 1997. p. 23-27.

PETTERSSON, H., BERTILSSON, J., WENNBERG, O. **Carry-over of aflatoxina from dairy catlle feed to milk. Healthy animal, safe foods, healthy man**. In: WORLD ASSOCIATION OF VETERINARY FOOD HIGIENISTS, 10., Berlin, 1989. Stockholm: 2 jul. 1989, p. 97-102.

PICININ, L.C. **A Qualidade do leite e da água de algumas propriedades leiteiras de Minas Gerais.** 2003. 89p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

PIETRI, A.; BERTUZZI, T.; BERTUZZI, P.; PIVA, G. Aflatoxin $M_1$ occurrence in samples of Grana Padano cheese. **Food Additives and Contaminants**: Part A. London, v. 14, n. 4, p. 341 - 344, 1997.

POLAN, C. E. HAYES, J. R. CAMPBELL, T. C. Consumption and fate of aflatoxina B1 by lactating cows. **Journal of Agriculture Food Chemistry**. Washington, v. 22, p. 635-638. 1984.

PONTES NETTO, D.; ZANLUCHI, A. T.; SASSAHARA, M.; YANAKA, E. K. Micotoxinas em alimentação animal no período de maio/ 1997 a março/ 2001 no laboratório de toxicologia veterinária na Universidade Estadual de Londrina. **Ciências Agrárias**. Londrina, v. 23, n. 1, p. 63-69. jan/jun, 2002.

PRADO, G., OLIVEIRA, M. S., ABRANTES, F. M. SANTOS, L. G., SOARES, C. R., VELOSO, T. Ocorrência de aflatoxina M1 em leite consumido na cidade de Belo Horizonte – Minas Gerais/Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19; n. 3, p. 420-423, 1999.

RAHIMI, E.; BONYADIAN, M.; RAFEI, M.; KAZEMEINI, H. R. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. **Food and Chemical Toxicology.** London, v. 48, p. 129-131, 2010.

REZA-OVEISI, M., JANNAT, B., SADEGHI, N., HAJIMAHMOODI, M., NIKZAD, A. Presence of aflatoxina $M_1$ in milk and infant milk products in Tehran, Iran. **Food Control**. Guildford, v. 18, p. 1216-1218, 2007.

ROGERS, S.A.; MITCHELL, G.E.; BARTLEY, J.P. The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk. 4. Non-protein constituents. **Australian Journal of Dairy Technology**. Melbourne, v.44, n.2 p.53-56, 1989.

ROMERO, A. C. **Mensuração de Biomarcador de Exposição às Aflatoxinas em Fluidos Biológicos**. 90p. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). USP/ Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2007.

ROY, A.K.; CHOURASIA, H.K. Inhibition of aflatoxins produc-tion by microbial interaction. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v.36 n.1, p. 59-62, 1990.

RYSANEK, D; BABAK, V. Bulk tank milk somatic cell count as an indicator of the hygiene status of primary milk production. Journal of Dairy Research. London, v. 72, p.1-6, 2005.

SAS INSTITUTE. **SAS system for windows**. Version 9.1. Cary: SAS Institute Inc. 2003.

SASSAHARA, M.; PONTES NETO, D.; YANAKA, E. K. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw Milk in the North of Paraná State. **Food and Chemical Toxicology**. London, v. 43; p. 981-984, 2005.

SCHAELLIBAUM, M. Efeitos de altas contagens de células somáticas sobre a produção e qualidade de queijos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO

LEITE, 2, 2000, Curitiba, **Anais...**Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2000. p. 21-29.

SCUSSEL, V. M.; **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis. Ed. Insular 1998. 144p.

SHUNDO, L.; SABINO, M. Aflatoxin M1 in milk by immunoaffinity column clenup with TCL/ HPLC determination. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v. 37, p. 164-167, 2006.

SHUNDO, L., NAVAS, S. A; LAMARDO, L. C.; RUVIERI, V.; SABINO, M. Estimate of aflatoxin M1 exposure in milk and occurrence in Brazil**. Food Control**. Lancaster, v. 20, p. 655-657, 2009.

SILVEIRA, T. M. L.; FONSECA L. M.; CANÇADO S. V.; FERRAZ V. Comparação entre os métodos de referência e a análise eletrônica na determinação da composição do leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** Belo Horizonte, v.56, n.6, p.782-787, 2004.

SYLOS, C. M.; RODRIGUES-AMAYA, D. B.; CARVALHO, P. R. N. Ocorrência de aflatoxina M1 em leite e derivados comercializados em Campinas, Brasil. **Food Additives and Contamminats**. London, v. 13, n. 2, p. 169-172, 1996.

TAKEDA, N. Determination of aflatoxin M1 in milk by reversedphase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**. Amsterdam, v. 288, p. 484–488, 1984.

TEIXEIRA, M. L. P.; FREITAS, R. M. V. Acidentes do trabalho rural no interior paulista. **São Paulo em Perspectiva,** São Paulo, v. 17, n. 2, p. 81-90, 2003.

THOMPSON, M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. **Analyst,** , v. 125, p. 385–386, 2000.

TRUCKSESS, M.W. Natural Toxins. In: HORWITZ, W.; LATIMER, G. W. (Ed.) **Official methods of analysis of AOAC international.** 18 th ed. Gaithersburg: AOAC International, 2006. chap. 49, p.99.

UNUSAN, N. Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**. London, v. 44, p. 1897–1900, 2006.

VAZ, A. K. O que as células somáticas realmente representam? In: PERSPECTIVAS E AVANÇOS DA QUALIDADE DO LEITE NO BRASIL, 2., 2006. Goiânia. **Anais**... Goiania: Talento, 2006. p. 175-180.

Van EGMOND, H. P. Aflatoxin $M_1$: Occurrence, toxicity and regulation. Van EGMOND, H. P. (Ed.) **Mycotoxin in dairy products.** London: Elsevier Applied Science, 1989. p. 11-15.

VELDMAN, A.; MEIJS, J. A. C.; BORGGREVE, G. J.; HEERES VAN DE TOL, J. J. Carry-over of aflatoxina from cow's food to milk. **Animal Production Science**. Victoria, v. 55, p. 163-168, 1992.

VILELA, D. Leite: sua importância econômica, social e nutricional. **Minas de Leite,** Juiz de Fora, v.3, n. 2, p. 17-18, 2002.

WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. Imagem: **Mesorregiões do Estado de São Paulo**. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Imagem:SaoPaulo_MesoMicroMunicip(2).jpg#filehistory>. Acesso em: 15 jun. 2008.

ZERINGUE JUNIOR, H. J.; HATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E. C15H24 volatile comounds unique to aflatoxingenic strains of *Aspesgilllus flavus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.59, p.2264-2270, 1993.

ZOCCAL, R. (2009). O leite que o Brasil precisa. Disponível em: http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2009/o-leite-de-que-o-brasil-precisa/. Acesso em : 26 jul. 2010.

# ANEXOS

## ANEXO A

### Perda da fluorescência da $AFM_1$

Dos testes realizados durante o inicio da validação da metodologia observou-se a perda da fluorescência da $AFM_1$ após a concentração do eluato metanólico. Para confirmação dessa observação preparou-se uma solução em acetonitrila de padrão de $AFM_1$ cuja concentração equivalia a aproximadamente 0,027 µg $L^{-1}$ de $AFM_1$ no leite. Duas alíquotas de 1 mL foram colocadas em 2 flaconetes previamente lavados com ácido denominados **A** e **B**. A alíquota **A** foi levada a secura (banho maria a 50 $^{o}$C e fluxo de ar) e em seguida ressuspendida em 3 mL de metanol (mesmo volume do eluato) ficando em repouso por 10 minutos, que representa aproximadamente o tempo de espera para e eluição total da toxina da coluna de imunoafinidade. Em seguida foi realizada a secagem e ressuspensão em 1 ml de acetonitrila: $H_2O$ Milli-Q (1:3). A alíquota **B** foi levada a secura (banho maria a 50 $^{o}$C e fluxo de ar) e em seguida ressuspendida em 1 ml de acetonitrila: $H_2O$ Milli-Q (1:3), ou seja, não teve contato com metanol. De cada solução foram injetados 100 µL e os cromatogramas estão apresentados na Figura A, onde pode-se observar que houve uma diminuição significativa na área do pico de $AFM_1$ referente a solução **A** que sofreu concentração quando estava dissolvida em metanol.

O valor da área do padrão “tratado” com metanol foi igual a 67.290, enquanto que o padrão “não-tratado” foi de 162.712.

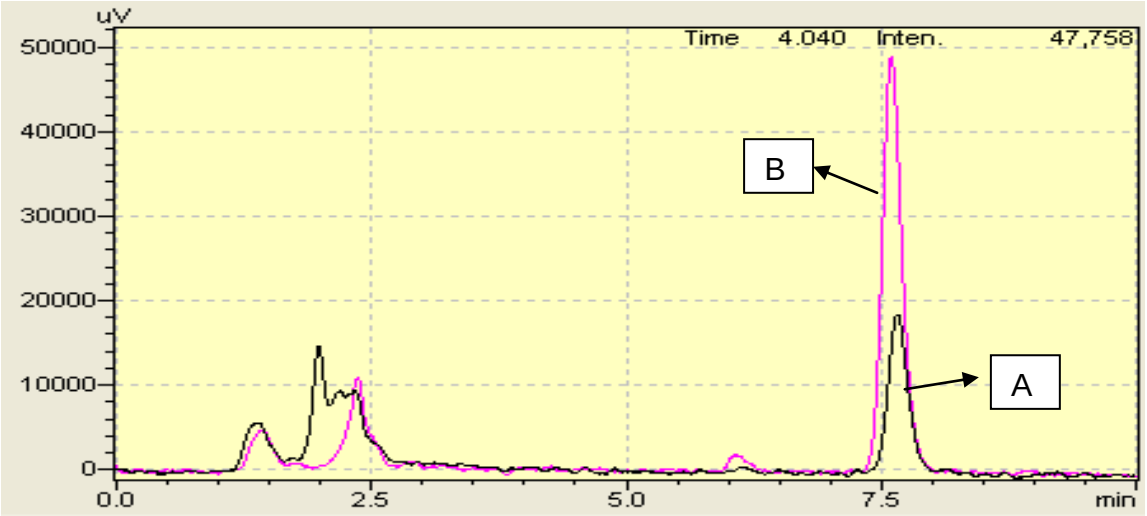


Figura A - Cromatogramas do padrão de $AFM_1$ “tratado” com metanol (A) e “não tratado” (B) sobrepostos

Assim, após a realização desse teste, adotou-se como procedimento o pré tratamento do padrão com metanol.

Para o preparo da curva de calibração retirava-se uma alíquota da solução padrão estoque (que estava em acetonitrila) para se preparar o ponto de maior concentração da curva (ponto 7). Essa alíquota era levada a secura e em seguida ressuspendida com 3 mL de metanol simulando-se o que ocorria com a amostra no processo de extração. Após 10 minutos, a mesma era levada novamente a secura e em seguida ressuspendida com acetonitrila:$H_2O$ Milli-Q (1:3). A partir dessa solução “tratada” eram feitas as diluições subseqüentes para preparo dos demais pontos da curva de calibração.

**ANEXO B**

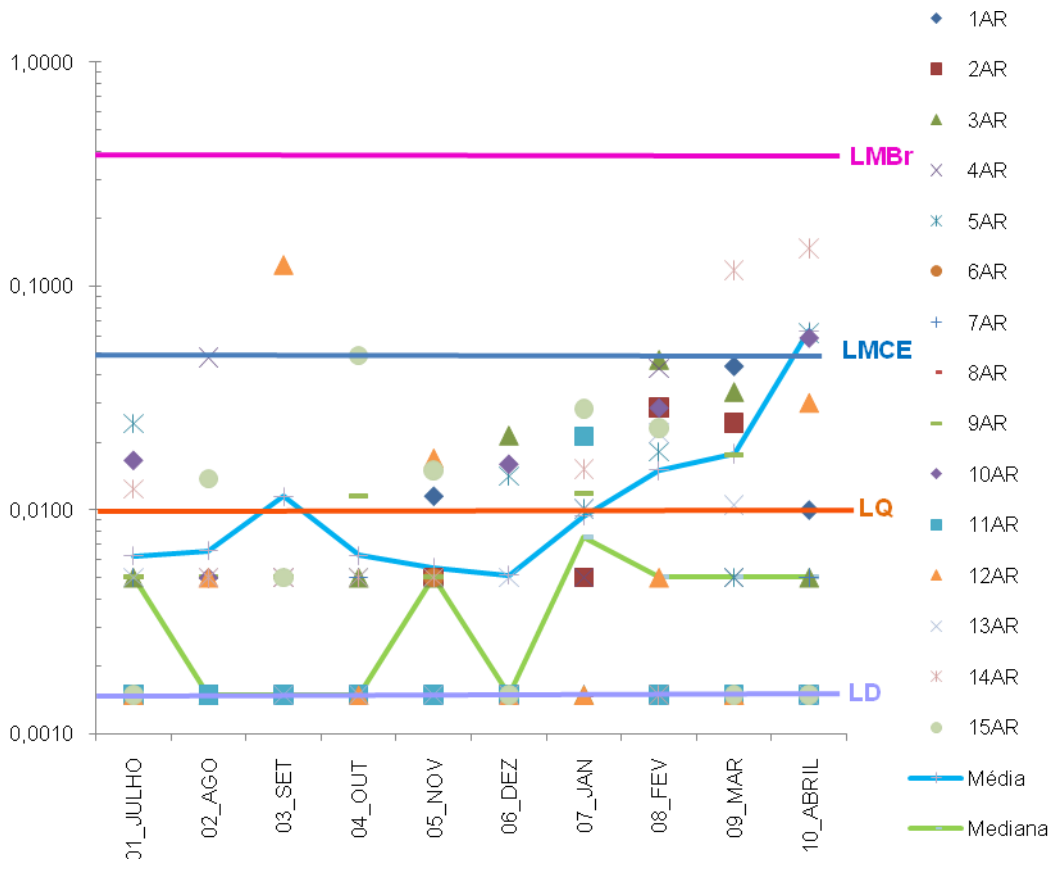


Figura B - Distribuição da contaminação das fazendas da mesorregião de Araçatuba

**ANEXO C**

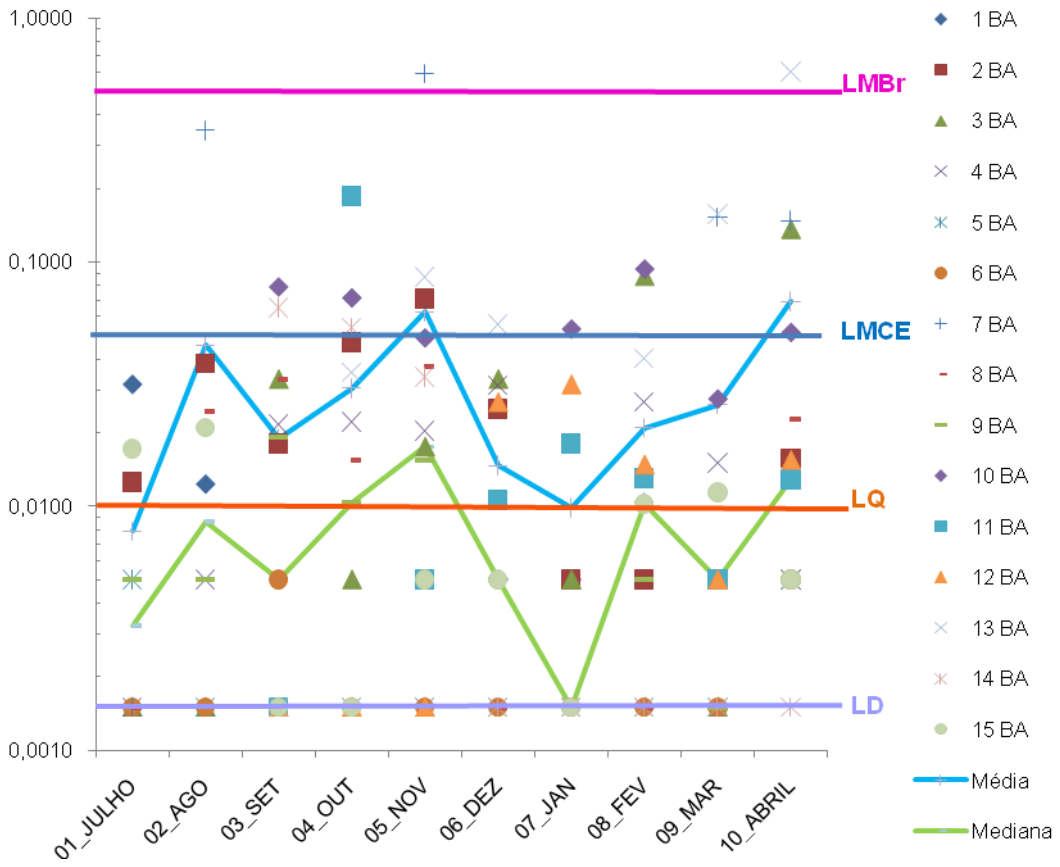


Figura C - Distribuição da contaminação das fazendas da mesorregião de Bauru

**ANEXO D**

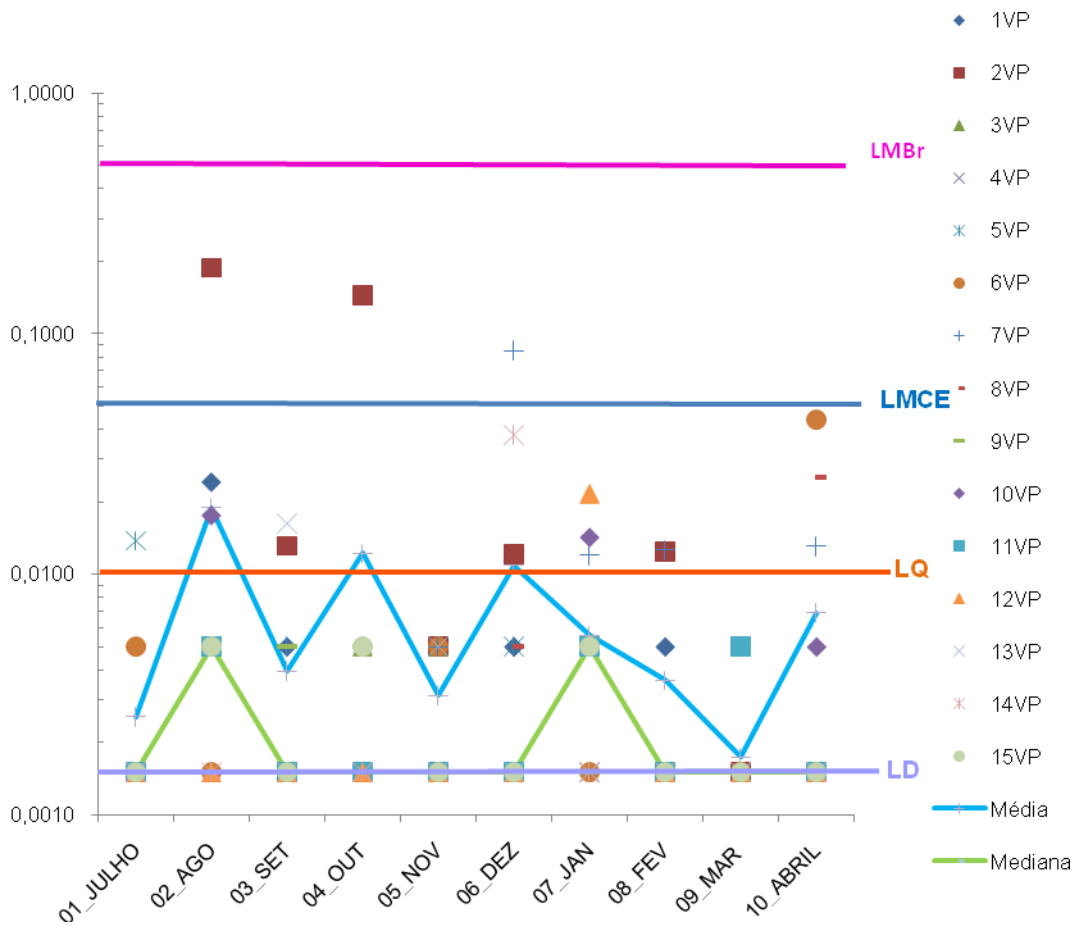


Figura D - Distribuição da contaminação das fazendas da mesorregião do Vale do Paraíba

**ANEXO E**

Figura E - Resultados das médias dos parâmetros de composição das amostras de leite cru provenientes de 15 fazendas da mesorregião de Araçatuba

| | GORDURA | | | | PROTEÍNA | | | | LACTOSE | | | | SÓLIDOS TOTAIS | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fazenda | Média | | | Mediana | Média | | | Mediana | Média | | | Mediana | Média | | | Mediana |
| 1 AR | 3,48 | (±0,27) | ab | 3,35 | 3,44 | (±0,12) | a | 3,44 | 4,58 | (±0,07) | a | 4,57 | 12,50 | (±0,25) | ab | 12,43 |
| 2 AR | 3,62 | (±0,14) | ab | 3,61 | 3,12 | (±0,14) | cde | 3,07 | 4,55 | (±0,05) | a | 4,56 | 12,27 | (±0,23) | ab | 12,22 |
| 3 AR | 3,46 | (±0,14) | ab | 3,50 | 3,06 | (±0,13) | cde | 3,05 | 4,45 | (±0,08) | a | 4,45 | 11,94 | (±0,21) | bc | 11,92 |
| 4 AR | 4,16 | (±1,64) | a | 3,51 | 3,04 | (±0,17) | cde | 3,05 | 4,46 | (±0,08) | a | 4,50 | 12,61 | (±1,41) | ab | 12,10 |
| 5 AR | 3,68 | (±0,15) | ab | 3,70 | 3,25 | (±0,07) | abc | 3,24 | 4,56 | (±0,06) | a | 4,57 | 12,47 | (±0,22) | ab | 12,44 |
| 6 AR | 3,39 | (±0,24) | ab | 3,39 | 3,17 | (±0,12) | bcd | 3,14 | 4,51 | (±0,12) | a | 4,50 | 12,02 | (±0,30) | b | 12,00 |
| 7 AR | 3,57 | (±0,14) | ab | 3,53 | 3,11 | (±0,09) | cde | 3,07 | 4,54 | (±0,07) | a | 4,56 | 12,20 | (±0,21) | ab | 12,12 |
| 8 AR | 3,53 | (±0,18) | ab | 3,54 | 3,08 | (±0,12) | cde | 3,07 | 4,58 | (±0,09) | a | 4,57 | 12,20 | (±0,23) | ab | 12,22 |
| 9 AR | 3,58 | (±0,60) | ab | 3,56 | 3,20 | (±0,11) | bcd | 3,18 | 4,54 | (±0,07) | a | 4,53 | 12,31 | (±0,61) | ab | 12,27 |
| 10 AR | 3,71 | (±0,17) | ab | 3,68 | 3,18 | (±0,10) | bcd | 3,14 | 4,58 | (±0,09) | a | 4,61 | 12,45 | (±0,23) | ab | 12,47 |
| 11 AR | 3,57 | (±0,27) | ab | 3,56 | 3,08 | (±0,13) | cde | 3,05 | 4,60 | (±0,05) | a | 4,58 | 12,22 | (±0,36) | ab | 12,18 |
| 12 AR | 3,39 | (±0,17) | ab | 3,41 | 2,99 | (±0,10) | de | 2,98 | 4,47 | (±0,19) | a | 4,47 | 11,81 | (±0,18) | bc | 11,78 |
| 13 AR | 3,65 | (±0,32) | ab | 3,49 | 3,13 | (±0,08) | cde | 3,13 | 4,48 | (±0,05) | a | 4,47 | 12,23 | (±0,35) | ab | 12,07 |
| 14 AR | 4,10 | (±0,59) | a | 3,91 | 3,38 | (±0,28) | abc | 3,35 | 4,59 | (±0,04) | a | 4,58 | 13,04 | (±0,88) | a | 12,87 |
| 15 AR | 3,10 | (±0,44) | b | 3,03 | 2,93 | (±0,23) | e | 2,92 | 4,18 | (±0,30) | b | 4,06 | 11,13 | (±0,77) | c | 11,07 |

Nota 1: Entre parênteses está o desvio padrão para cada média calculada.
Nota 2 : Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que os resultados são estatisticamente diferentes ($p<0,05$).

**ANEXO F**

Figura F - Resultados das médias dos parâmetros de composição das amostras de leite cru provenientes de 15 fazendas da mesorregião de Bauru

| | GORDURA | | | | PROTEÍNA | | | | LACTOSE | | | | SÓLIDOS TOTAIS | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fazenda | Média | | | Mediana | Média | | | Mediana | Média | | | Mediana | Média | | | Mediana |
| 1 BA | 3,86 | (±0,15) | a | 3,83 | 3,29 | (±0,06) | ab | 3,28 | 4,43 | (±0,05) | cd | 4,45 | 12,60 | (±0,21) | ab | 12,52 |
| 2 BA | 3,85 | (±0,22) | a | 3,86 | 3,24 | (±0,07) | abc | 3,24 | 4,47 | (±0,05) | bc | 4,45 | 12,54 | (±0,29) | abcd | 12,61 |
| 3 BA | 3,85 | (±0,13) | a | 3,87 | 3,26 | (±0,09) | ab | 3,26 | 4,53 | (±0,05) | bc | 4,54 | 12,65 | (±0,17) | a | 12,61 |
| 4 BA | 3,88 | (±0,09) | a | 3,87 | 3,22 | (±0,10) | abcd | 3,21 | 4,48 | (±0,06) | bc | 4,47 | 12,56 | (±0,16) | abc | 12,55 |
| 5 BA | 3,39 | (±0,11) | cd | 3,38 | 3,08 | (±0,07) | def | 3,06 | 4,34 | (±0,04) | de | 4,33 | 11,78 | (±0,16) | g | 11,75 |
| 6 BA | 3,69 | (±0,16) | ab | 3,64 | 3,06 | (±0,06) | def | 3,07 | 4,50 | (±0,05) | bc | 4,51 | 12,25 | (±0,23) | bcdef | 12,17 |
| 7 BA | 3,36 | (±0,24) | cd | 3,28 | 3,33 | (±0,13) | a | 3,32 | 4,51 | (±0,07) | bc | 4,53 | 12,17 | (±0,25) | def | 12,10 |
| 8 BA | 3,77 | (±0,16) | ab | 3,74 | 3,17 | (±0,07) | bcde | 3,17 | 4,29 | (±0,04) | e | 4,27 | 12,21 | (±0,20) | cdef | 12,16 |
| 9 BA | 3,83 | (±0,10) | ab | 3,84 | 3,20 | (±0,10) | abcde | 3,18 | 4,45 | (±0,10) | c | 4,46 | 12,45 | (±0,15) | abcde | 12,48 |
| 10 BA | 3,03 | (±0,32) | e | 2,88 | 3,29 | (±0,08) | ab | 3,32 | 4,71 | (±0,07) | a | 4,74 | 12,00 | (±0,34) | fg | 11,94 |
| 11 BA | 3,76 | (±0,06) | ab | 3,78 | 3,28 | (±0,06) | ab | 3,27 | 4,52 | (±0,06) | bc | 4,51 | 12,53 | (±0,13) | abcd | 12,52 |
| 12 BA | 3,56 | (±0,06) | bd | 3,56 | 3,00 | (±0,06) | f | 3,02 | 4,51 | (±0,09) | bc | 4,54 | 12,04 | (±0,20) | fg | 12,10 |
| 13 BA | 3,67 | (±0,25) | ab | 3,77 | 3,06 | (±0,09) | ef | 3,06 | 4,47 | (±0,06) | bc | 4,47 | 12,18 | (±0,42) | def | 12,29 |
| 14 BA | 3,16 | (±0,23) | de | 3,11 | 3,33 | (±0,14) | a | 3,29 | 4,56 | (±0,06) | b | 4,57 | 12,01 | (±0,26) | fg | 11,99 |
| 15 BA | 3,56 | (±0,12) | bc | 3,57 | 3,10 | (±0,13) | cdef | 3,07 | 4,49 | (±0,08) | bc | 4,47 | 12,09 | (±0,22) | efg | 12,04 |

Nota 1: Entre parênteses está o desvio padrão para cada média calculada.
Nota 2 : Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que os resultados são estatisticamente diferentes ($p<0,05$).

**ANEXO G**

Figura G - Resultados das médias dos parâmetros de composição das amostras de leite cru de 15 fazendas da mesorregião do Vale do Paraíba

| | GORDURA | | | | PROTEÍNA | | | | LACTOSE | | | | SÓLIDOS TOTAIS | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fazenda | Média | | | Mediana | Média | | | Mediana | Média | | | Mediana | Média | | | Mediana |
| 1 VP | 3,74 | (±0,22) | a | 3,81 | 3,15 | (±0,14) | abc | 3,15 | 4,62 | (±0,08) | a | 4,60 | 12,47 | (±0,31) | a | 12,53 |
| 2 VP | 3,70 | (±0,08) | abc | 3,70 | 3,15 | (±0,10) | abc | 3,17 | 4,44 | (±0,03) | cde | 4,44 | 12,27 | (±0,13) | ab | 12,33 |
| 3 VP | 3,44 | (±0,15) | abc | 3,43 | 3,01 | (±0,03) | bc | 3,00 | 4,54 | (±0,06) | abc | 4,55 | 11,96 | (±0,18) | bc | 11,96 |
| 4 VP | 3,52 | (±0,16) | abc | 3,55 | 3,01 | (±0,05) | bc | 3,03 | 4,45 | (±0,08) | cde | 4,44 | 11,96 | (±0,21) | bc | 11,94 |
| 5 VP | 3,34 | (±0,16) | bc | 3,31 | 3,09 | (±0,12) | abc | 3,10 | 4,34 | (±0,09) | e | 4,33 | 11,75 | (±0,25) | c | 11,79 |
| 6 VP | 3,71 | (±0,22) | ab | 3,64 | 3,14 | (±0,13) | abc | 3,10 | 4,48 | (±0,07) | abcde | 4,49 | 12,31 | (±0,27) | ab | 12,28 |
| 7 VP | 3,32 | (±0,34) | c | 3,32 | 3,18 | (±0,09) | ab | 3,15 | 4,57 | (±0,09) | abc | 4,58 | 12,05 | (±0,34) | abc | 12,06 |
| 8 VP | 3,75 | (±0,16) | a | 3,77 | 3,19 | (±0,09) | ab | 3,20 | 4,38 | (±0,10) | de | 4,37 | 12,31 | (±0,14) | ab | 12,31 |
| 9 VP | 3,61 | (±0,12) | abc | 3,61 | 3,14 | (±0,04) | abc | 3,14 | 4,48 | (±0,07) | abcde | 4,49 | 12,20 | (±0,15) | abc | 12,15 |
| 10 VP | 3,56 | (±0,18) | abc | 3,57 | 3,13 | (±0,10) | abc | 3,16 | 4,60 | (±0,09) | ab | 4,62 | 12,26 | (±0,29) | ab | 12,25 |
| 11 VP | 3,48 | (±0,14) | abc | 3,44 | 3,23 | (±0,12) | a | 3,26 | 4,57 | (±0,04) | abc | 4,57 | 12,28 | (±0,21) | ab | 12,24 |
| 12 VP | 3,54 | (±0,23) | abc | 3,55 | 2,99 | (±0,08) | c | 2,98 | 4,46 | (±0,07) | bcde | 4,47 | 11,98 | (±0,28) | bc | 11,92 |
| 13 VP | 3,55 | (±0,26) | abc | 3,49 | 3,07 | (±0,11) | abc | 3,04 | 4,54 | (±0,05) | abc | 4,55 | 12,12 | (±0,37) | abc | 11,99 |
| 14 VP | 3,53 | (±0,20) | abc | 3,56 | 3,15 | (±0,08) | abc | 3,15 | 4,50 | (±0,06) | abcde | 4,49 | 12,16 | (±0,23) | abc | 12,21 |
| 15 VP | 3,53 | (±0,22) | abc | 3,49 | 3,10 | (±0,08) | abc | 3,07 | 4,54 | (±0,06) | abc | 4,53 | 12,17 | (±0,26) | abc | 12,13 |

Nota 1: Entre parênteses está o desvio padrão para cada média calculada.
Nota 2 : Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que os resultados são estatisticamente diferentes ($p<0,05$).

**ANEXO H**

Figura H - Correlação da concentração de $AFM_1$ encontrada com os parâmetros de qualidade e composição do leite cru

| | Concentração de $AFM_1$ | |
|---|---|---|
| Parâmetros de qualidade e composição do leite | valor de r * | Valor de p ** |
| Contagem Bacteriana Total (CBT) | 0,0868 | 0,0897 |
| Contagem de Células Somáticas (CCS) | -0,0040 | 0,9371 |
| Teor de Gordura | -0,0096 | 0,8512 |
| Teor de Proteína | -0,1042 | 0,0415 |
| Teor de Lactose | -0,0314 | 0,5400 |
| Teor de Sólidos Totais | -0,0532 | 0,2993 |

* Coeficiente de correlação de Pearson
** p igual a probabilidade