

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARISA MATIAS DE FRANÇA

**Avaliação da contaminação fúngica e da ocorrência de aflatoxinas na
bovinocultura leiteira orgânica**

Pirassununga

2023

MARISA MATIAS DE FRANÇA

**Avaliação da contaminação fúngica e da ocorrência de aflatoxinas na
bovinocultura leiteira orgânica**

VERSÃO CORRIGIDA

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Ricardo Luiz Moro de Sousa.

Prof^a. Dr^a. Andrezza Maria Fernandes (*In memoriam*).

Pirassununga

2023

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

F814a França, Marisa Matias
Avaliação da contaminação fúngica e da ocorrência de aflatoxinas na bovinocultura leiteira orgânica / Marisa Matias França ; orientador Ricardo Luiz Moro Sousa. -- Pirassununga, 2023.
126 f.

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

1. Aflatoxinas . 2. Bovinocultura de leite. 3. Queijos. 4. Produção orgânica de leite. 5. Exposição alimentar à Aflatoxina M1. I. Sousa, Ricardo Luiz Moro, orient. II. Título.

MARISA MATIAS DE FRANÇA

**Avaliação da contaminação fúngica e da ocorrência de aflatoxinas na
bovinocultura leiteira orgânica**

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Ricardo Luiz Moro de Sousa.

Prof^a. Dr^a. Andrezza Maria Fernandes (*In memoriam*).

Data de aprovação: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora:

Nome completo do 1º Examinador – Presidente da Banca Examinadora
Prof. + titulação (caso tenha) + instituição a que pertence

Nome completo do 2º Examinador
Prof. + titulação (caso tenha) + instituição a que pertence

Nome completo do 3º Examinador
Prof. + titulação (caso tenha) + instituição a que pertence

Pirassununga

2023

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais, por tornarem este sonho possível. À minha orientadora Profa. Dra. Andrezza Fernandes (*in memoriam*) por toda dedicação investida neste trabalho até seus últimos dias neste plano. Aos amigos e profissionais que ajudaram a realizar este trabalho, e a todos os envolvidos na produção orgânica de leite.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar e guiar meus caminhos, mantendo-me perseverante em todos os momentos.

Aos meus pais Sebastião Luiz de França e Maria Matias S. de França, e meu irmão André Luiz de França, por todos os ensinamentos, apoio e amor incondicionais. Sem eles este sonho não seria possível.

Aos meus cães, Malzbier, Biscoito, Zeus, e Venom, e aos que conviveram comigo neste período da minha vida oferecendo amor e companhia, Max e Penélope, que partiram antes que esse trabalho pudesse ser concluído.

Ao meu noivo Jackson, pelo carinho e companheirismo. E aos seus familiares pelo carinho e acolhimento.

Aos produtores orgânicos de leite que aceitaram participar deste trabalho, e abriram as portas de suas propriedades para a pesquisa com tanto carinho.

Aos amigos e companheiros de pós-graduação do Laboratório de Microbiologia e Higiene Zootécnica: Waldelucy Felix (Wal), Thaís Correa, Talita Lázaro, Nathalia Alcântara (Ritinha), Carla Afonso, Natália Barbosa (Aparecida), Juliana Navarro (Ju), Lilian Vieira, Milena Chaguri, Marcelo Reis, Renata Corrêa, Gabriela Ballarin e Nycolas Pereira. Às agregadas Caroline Meira (Carol Maia), e à Mellory Martins (Mel). Agradeço por cada café, cada momento de apoio nesta jornada. Obrigada a todos desta lista que foram responsáveis pelas idas às coletas de campo, Deus abençoe imensamente.

Às amigas Monalisa Bonfim (Mona), Marina Massocco, Anna Alencar (Annie), Juliana Baldin, Mariana Rentas (Mel) e Michelle Alessandra pelo apoio e carinho mesmo à distância.

À Thaís, Annie e Silvia pelo apoio com as correções do artigo oriundo desta tese. O apoio de vocês foi fundamental.

À técnica do Laboratório de Microbiologia e Higiene Zootécnica, Silvia Seraphin, que se tornou colega de pós-graduação e também uma amiga. Obrigada pelo auxílio técnico em tudo e muita paciência dedicada durante todo o experimento. Sem você, esta caminhada seria imensamente mais difícil.

Em especial, agradeço a Wal, Thaís, Talita, Ritinha, Carla, Natália, Lilian, Carol, Mel, Ju, Mona, Marina e Annie por todo apoio nos momentos mais difíceis desse doutorado.

À Maria Fernanda Burbarelli e Leonardo de Oliveira Seno pela disponibilidade em auxiliar na padronização de parte da metodologia e realizar as análises estatísticas dos dados. Obrigada por todo apoio e empatia, vocês foram indispensáveis para a conclusão dos trabalhos da nossa equipe.

À minha orientadora, Profa. Dra. Andrezza Maria Fernandes (*in memoriam*), por me confiar o projeto que deu origem a esta tese. Mesmo diante de tamanha batalha pessoal e obstáculos imensuráveis, nunca deixou de orientar, apoiar e compreender. Eu serei eternamente grata pela oportunidade de integrar sua

equipe todos esses anos e honrar a conclusão de sua pesquisa. Agradeço por acreditar em mim, mesmo quando nem eu mesma acreditava.

Ao Profº Ricardo Luiz Moro de Sousa, pelo auxílio, conselhos e apoio, e por me acolher e orientar nas etapas de finalização deste trabalho mediante circunstâncias tão difíceis.

À Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pelo oferecimento do curso de Pós-graduação em Zootecia. A todos os envolvidos no programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em especial a Maria Cecília Albernaz e Érica Ferraz.

À FAPESP pela concessão do auxílio (Processo:18/07481-8) que permitiu a realização deste projeto, e à CAPES ela bolsa concedida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

EPÍGRAFE

“A vida é assim, esquenta, depois esfria, aperta, daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. (..) Carece de ter coragem.”
O Grande Sertão Veredes, João Guimarães Rosa.

RESUMO

FRANÇA, M. M. **Avaliação da contaminação fúngica e da ocorrência de aflatoxinas na bovinocultura leiteira orgânica.** 2023. 126 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga – SP, 2023.

O presente trabalho foi dividido em dois capítulos. O objetivo do capítulo I foi avaliar a ocorrência de fungos aflatoxigênicos e aflatoxinas em alimentos de dietas destinadas a bovinos em sistemas orgânicos de produção de leite e avaliar a ocorrência de AFM₁ no leite produzido por estes animais. Foram coletadas, em propriedades no estado de São Paulo, 36 amostras de alimentos destinados à dieta de vacas leiteiras em sistema orgânico, sendo 26 de concentrados e 10 de silagens, e 25 amostras de leite cru refrigerado. A AFB₁ foi a aflatoxina maior ocorrência nas amostras de alimentos. Os valores máximos quantificados de aflatoxinas foram de 92,9 µg/kg⁻¹ para AFB₁, 9,26 µg/kg⁻¹, para AFB₂, 3,14 µg/kg⁻¹ para AFG₁ e 1,37 µg/kg⁻¹ para AFG₂, sendo que em uma amostra de alimento concentrado apresentou nível de AFB₁ acima do recomendado pela legislação brasileira para a soma de aflatoxinas em alimentos destinados ao consumo animal. A ocorrência de AFM₁ nas amostras de leite cru refrigerado foi considerada baixa, porém com concentrações atingiram níveis de 2,89 µg/L, sendo que três amostras se apresentaram fora do limite máximo AFM₁ para leite fluido no Brasil. Concluiu-se que, apesar da baixa ocorrência de aflatoxinas detectada, foram identificados índices acima das recomendações tanto para alimentos destinados a animais em sistema de produção, quanto para o leite fluido, e dessa forma, há necessidade de controle e mitigação da presença de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, e AFM₁ no sistema orgânico de produção de leite. O objetivo do capítulo II foi comparar a ocorrência de AFM₁ em diferentes tipos de queijos entre os sistemas de produção, orgânico e convencional, e avaliar o risco de exposição alimentar à AFM₁. Foram analisados 176 queijos comerciais de 17 tipos, sendo 84 de origem orgânica e 92 de origem convencional. Os resultados demonstram ocorrência de AFM₁ em 30,5% das 176 amostras analisadas. Não houve diferença estatística na ocorrência ($p=0,1780$) de AFM₁ e concentração ($p=0,1810$), entre os queijos produzidos nos sistemas orgânico e convencional, pelo teste Qui-quadrado e pela análise de variâncias pelo teste T, respectivamente. Também não houve diferença estatística no IDPM ($p=0,1729$)

e no índice de risco (HI) ($p=0,1802$) de AFM₁ entre as amostras dos dois sistemas, pela análise de variâncias pelo teste T, indicando que a probabilidade de exposição à AFM₁ pelo consumo desses produtos é semelhante. Concluiu-se que os queijos oriundos de ambos os sistemas, podem expor os consumidores aos mesmos cenários de risco pela presença de AFM₁, apesar das distintas normas de produção específicas e o estigma de que os alimentos orgânicos são mais “saudáveis”. Em suma, o presente trabalho concluiu que a AFM₁ é um obstáculo para o sistema de produção de leite e derivados de forma geral e há necessidade de mitigação da presença de AFM₁ em leite e derivados de forma geral.

Palavras-chave: AFM₁; *Aspergillus spp*; Propriedades; HPLC; Laticínios.

ABSTRACT

FRANÇA, M. M. **Evaluation of fungal contamination and the occurrence of aflatoxins in organic dairy farming.** 2023. 126 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga – SP, 2023.

The present work was divided into two chapters. The objective of chapter I was to evaluate the occurrence of aflatoxigenic fungi and aflatoxins in feed from diets intended for cattle in organic milk production systems and to evaluate the occurrence of AFM1 in milk produced by these animals. A total of 36 samples of feed for the diet of dairy cows in an organic system were collected from farms in the state of São Paulo, 26 of which were concentrates and 10 of silages, and 25 samples of refrigerated raw milk. AFB1 was the most common aflatoxin in food samples. The maximum quantified values of aflatoxins were 92.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -1 for AFB1, 9.26 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -1 for AFB2, 3.14 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -1 for AFG1 and 1.37 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -1 for AFG2, and in a sample of concentrated feed it presented a level of AFB1 above that recommended by the Brazilian legislation for the sum of aflatoxins in food intended for animal consumption. The occurrence of AFM1 in refrigerated raw milk samples was considered low, but with concentrations reaching levels of 2.89 $\mu\text{g}/\text{L}$, and three samples were outside the maximum AFM1 limit for fluid milk in Brazil. It was concluded that, despite the low occurrence of aflatoxins detected, indices above the recommendations were identified both for feed for animals in the production system and for fluid milk, and thus, there is a need to control and mitigate the presence of AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, and AFM1 in the organic milk production system. The objective of chapter II was to compare the occurrence of AFM1 in different types of cheeses between organic and conventional production systems, and to evaluate the risk of dietary exposure to AFM1. A total of 176 commercial cheeses of 17 types were analyzed, 84 of organic origin and 92 of conventional origin. The results show the occurrence of AFM1 in 30.5% of the 176 samples analyzed. There was no statistical difference in the occurrence ($p=0.1780$) of AFM1 and concentration ($p=0.1810$) between the cheeses produced in the organic and conventional systems, by the Chi-square test and by the analysis of variances by the T test, respectively. There was also no statistical difference in the PMDI ($p=0.1729$) and risk index (HI) ($p=0.1802$) of AFM1 between the samples of the two systems, by analysis of variances by the

t-test, indicating that the probability of exposure to AFM1 by the consumption of these products is similar. It was concluded that cheeses from both systems can expose consumers to the same risk scenarios due to the presence of AFM1, despite the different specific production standards and the stigma that organic foods are "healthier". In summary, the present study concluded that AFM1 is an obstacle to the milk and dairy products production system in general and there is a need to mitigate the presence of AFM1 in milk and dairy products in general.

Keywords: AFM₁, *Aspergillus spp*; Dairy; Farms; HPLC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Selo SisOrg - identificação dos produtos orgânicos.....	27
Figura 2. Distribuição geográfica das unidades orgânicas produtoras de leite (CNPO, MAPA) no Brasil em 2020.....	30
Figura 3- Estruturas químicas das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ e M ₁	36
Figura 4 – Esquema da biotransformação de aflatoxina B ₁	38
Figura 5. Localização por município das propriedades em sistema de produção orgânico participantes do experimento.....	44
Figura 6 - Amostragem de alimentos de consumo animal.	46
Figura 7 - Armazenagem de alimentos - Propriedade C.	47
Figura 8 - Sala de armazenagem de alimentos - Propriedade E.....	48
Figura 9 – Interior da sala de armazenagem de alimentos – Propriedade E....	48
Figura 10 - Silo para estoque de concentrado localizado ao lado da sala de armazenagem - Propriedade E.	49
Figura 11 - Armazenagem de alimentos - Propriedade G.	49
Figura 12- Silo de armazenagem para concentrado – Propriedade D.	50
Figura 13 - Curvas de calibração das AFG ₁ , AFB ₁ , AFB ₂ e AFG ₂	53
Figura 14 - Cromatograma com os tempos de retenção de cada aflatoxina na concentração de 5,0µg/kg.	54
Figura 15 - Curva de Calibração da AFM ₁	61
Figura 16 - Cromatograma com o tempo de retenção da aflatoxina M ₁ na concentração de 3 µg/L.....	61
Figura 17 - Fungo do gênero <i>Aspergillus</i> em ágar dextrose batata (PDA).	72
Figura 18- Fungo do gênero <i>Aspergillus</i> em “ágar AFPA”.	72
Figura 19 - Resultado de Cromatografia em Camada Delgada (CCD).	73
Figura 20 - Correlação entre variáveis qualitativas e quantitativas com dimensões principais.	83
Figura 21 – Representação das variáveis quantitativas e qualitativas de acordo com suas associações com cada uma das 5 dimensões.	86
Figura 22 - Representação das associações entre as variáveis quantitativas com as dimensões principais.	87
Figura 23 - Representação da influência do local de coleta (Propriedade) no agrupamento entre os indivíduos.	88

Figura 24 - Representação da influência da estação do ano no agrupamento entre os indivíduos.	88
Figura 25 - Representação da influência do tipo de alimento no agrupamento entre os indivíduos.	90
Figura 26 - Representação da influência do tipo de sala de armazenamento dos alimentos no agrupamento entre os indivíduos.	91
Figura 27 - Representação da influência do tipo de sala de armazenamento dos alimentos no agrupamento entre os indivíduos.	91
Figura 28 - Preferências essas preferências de consumo de queijo por região do Brasil de acordo com dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (2017-2018) do IBGE.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de atividade de água para crescimento e produção de micotoxinas para algumas espécies de fungos potencialmente toxigênicos. ...	33
Tabela 2- Classificação das principais micotoxinas segundo o IARC.	39
Tabela 3. Algumas recomendações do LAMIC para limites máximos toleráveis de micotoxinas ($\mu\text{g}/\text{kg}$) em alimentos de algumas espécies de animais domésticos.	41
Tabela 4 – Síntese dos limites máximos tolerados para as principais micotoxinas em alguns alimentos pela legislação brasileira (ANVISA).	42
Tabela 5 - Visitas técnicas nas propriedades e número de amostras coletadas por visita.	45
Tabela 6. Limite de detecção e Limite de quantificação de amostras de concentrado (Método I).	54
Tabela 7. Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1 AFG2 em amostras de concentrado (Método I).	56
Tabela 8. Limite de detecção e Limite de quantificação de amostras de silagens (Método II).	57
Tabela 9. Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1 AFG2 em amostras de silagem (Método II).	59
Tabela 10 - Limite de Detecção e Limite de quantificação de amostras de leite.	62
Tabela 11 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxina M ₁ em amostras de leite.	63
Tabela 12 - Resultados da análise da microbiota dos alimentos coletados na propriedade A.	65
Tabela 13 - Resultados da análise da microbiota dos alimentos coletados na propriedade B.	66
Tabela 14 - Resultados da análise da microbiota dos alimentos coletados na propriedade C.	67

Tabela 15 - Resultados da análise da microbiota dos alimentos coletados na propriedade D.....	68
Tabela 16 - Resultados da análise da microbiota dos alimentos coletados na propriedade E.....	69
Tabela 17 - Resultados da análise da microbiota dos alimentos coletados na propriedade F.....	70
Tabela 18 - Resultados da análise da microbiota dos alimentos coletados na propriedade G.	71
Tabela 19 - Aflatoxina B ₁ em concentrados totais.....	75
Tabela 20 - Aflatoxina B ₂ em concentrados totais.....	75
Tabela 21 - Aflatoxina G ₁ em concentrados totais.	76
Tabela 22 - Aflatoxina G ₂ em concentrados totais.	76
Tabela 23 - Aflatoxina B ₁ em silagens.....	77
Tabela 24 - Aflatoxina B ₂ em silagens.....	77
Tabela 25 - Aflatoxina G ₁ em silagens.	78
Tabela 26 - Aflatoxina G ₂ em silagens.....	78
Tabela 27 - Detecção e quantificação de aflatoxina M ₁ em amostras de leite cru refrigerado oriundo de rebanhos de bovinos de leite em sistema orgânico de produção.	80
Tabela 28 – Análise estatística descritiva das variáveis quantitativas.....	82
Tabela 29 - Autovalores e porcentagens das variâncias, explicada e cumulativa, por dimensão.....	84
Tabela 30 - Contribuições das variáveis quantitativas e qualitativas nas dimensões.....	85
Tabela 31 - Limite de Detecção e Limite de Quantificação de amostras de queijo.	103
Tabela 32 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxina M ₁ em amostras de queijo.....	104
Tabela 33 - Número de amostras por nível de Aflatoxina M ₁ em cada tipo queijo, oriundos de sistema de produção orgânico e convencional.....	107
Tabela 34 - Comparação dos níveis de Aflatoxina M ₁ entre queijos do tipo frescal e os demais tipos analisados.	108

Tabela 35 - Comparação dos níveis de Aflatoxina M1 entre amostras de queijos oriundas de sistema de produção orgânico e convencional.....	109
Tabela 36 - Níveis de Aflatoxina M1 em cada um dos tipos de queijos oriundos de sistema de produção orgânico e convencional.....	109
Tabela 37. Índices calculados para avaliação do risco à saúde pela exposição alimentar à aflatoxina M ₁ , em queijos oriundos de sistemas de produção convencionais e orgânicos.	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa: Atividade de água

AF: Aflatoxina

AFB₁: Aflatoxina B₁

AFB₂: Aflatoxina B₂

AFG₁: Aflatoxina G₁

AFG₂: Aflatoxina G₂

AFM₁: Aflatoxina M₁

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CCD: Cromatografia de Camada Delgada

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

IARC: International Agency for Research on Cancer

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

min: Minuto

ppb: Partes por bilhão

rpm: Rotação por Minuto

UFC/g: Unidade Formadora de Colônia por Grama

LISTA DE SIMBOLOS

α : Alfa

$^{\circ}\text{C}$: Grau Celsius

g: Grama

μg : Micrograma

μL : Microlitro

μm : Micrômetro

M: Molar

mg: Miligrama

ng: Nanograma

nm: Nanômetro

%: Porcentagem

kg: Quilograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	21
2	Capítulo I: Ocorrência de fungos aflatoxigênicos e aflatoxinas EM alimentos de dietas destinadas A bovinos em sistema orgânico de produção de leite, e Ocorrência de Aflatoxina M ₁ no leite produzido.....	22
2.1	INTRODUÇÃO	24
2.2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.2.1	A produção em sistema orgânico e a produção de leite em sistema orgânico	26
2.2.2	Fungos filamentosos e as micotoxinas na produção na agricultura	31
2.2.2.1	Principais fungos toxigênicos em alimentos destinados à dieta de animais em sistemas de produção	34
2.2.3	Aflatoxinas.....	35
2.2.4	Aflatoxinas na bovinocultura leiteira	39
2.2.5	Limites máximos para micotoxinas e legislação	40
2.3	Objetivos.....	43
2.3.1	Objetivo geral	43
2.3.2	Objetivos específicos.....	43
2.4	MATERIAL E MÉTODOS	43
2.4.1	Amostragem em propriedades de sistemas orgânicos.....	43
2.4.2	Caracterização dos alimentos e locais de armazenagem	45
2.4.3	Análises das amostras de alimentos	50
2.4.3.1	Mensuração da atividade de água	50
2.4.3.2	Avaliação da microbiota	50
2.4.3.2.1	Contagem de bolores e leveduras	50
2.4.3.2.2	Identificação de <i>Aspergillus Secção flavi</i>	51
2.4.3.2.3	Avaliação do potencial toxigênico dos isolados de <i>Aspergillus seção Flavi</i>	51
2.4.4	Determinação de aflatoxinas nas amostras de alimentos e leite cru refrigerado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	52
2.4.4.1	Preparação das amostras de alimentos	52

2.4.4.2 Método I: determinação das aflatoxinas AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ e AFG ₂ em concentrado.....	52
2.4.4.2.1 Padrões e solventes	52
2.4.4.2.2 Curva de calibração e tempos de retenção	52
2.4.4.2.3 Limites de detecção do método	54
2.4.4.2.4 Descrição do método I:.....	54
2.4.4.2.5 Desempenho do método analítico I: ensaios de recuperação	
55	
2.4.4.3 Método II: Determinação das aflatoxinas AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ e AFG ₂ em silagens.....	57
2.4.4.3.1 Padrões e solventes	57
2.4.4.3.2 Curva de calibração e tempos de Retenção	57
2.4.4.3.3 Limites de detecção do método	57
2.4.4.3.4 Descrição do método II:.....	57
2.4.4.3.5 Desempenho do método analítico II: ensaios de recuperação	
58	
2.4.4.4 Método III: Determinação de Aflatoxina M ₁ em leite cru refrigerado	60
2.4.4.4.1 Padrões e solventes	60
2.4.4.4.2 Curva de calibração e tempo de retenção	60
2.4.4.4.3 Limites de detecção.....	61
2.4.4.4.4 Descrição do método III:.....	62
2.4.4.4.5 Desempenho do método analítico III: ensaios de recuperação	
62	
2.4.4.5 Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .	63
2.4.5 Análise estatística.....	64
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
2.5.1 Análises da micobiota.....	64
2.5.2 Cromatografia em camada delgada	73
2.5.3 Determinação das aflatoxinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	73
2.5.3.1 Resultados da determinação de aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ em amostras de alimentos (concentrados e silagens).....	73

2.5.3.2	Resultados da determinação de aflatoxina M ₁ em amostras de leite cru refrigerado.....	79
2.5.4	Resultados da análise fatorial de dados mistos (FAMD)	81
2.6	CONCLUSÃO.....	93
3	Capítulo II: COMPARAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE AFLATOXINA M ₁ EM QUEIJOS ORIUNDOS DE SISTEMA de produção ORGÂNICO E CONVENCIONAL E ANÁLISE DE RISCO À EXPOSIÇÃO ALIMENTAR.	94
3.1	INTRODUÇÃO	96
3.2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	97
3.2.1	Consumo de lácteos no Brasil	97
3.2.2	Presença de aflatoxina M ₁ em leite e queijos no Brasil	99
3.2.3	Aflatoxina M ₁ na produção de queijos.....	100
3.3	OBJETIVOS	101
3.3.1	OBJETIVO GERAL.....	101
3.3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	101
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	101
3.4.1	Amostragem dos queijos comerciais	101
3.4.2	Determinação de aflatoxina M ₁ em queijos	102
3.4.2.1	Padrões e solventes	102
3.4.2.2	Curva de calibração e tempo de retenção.....	102
3.4.2.3	Limites do método	102
3.4.2.4	Descrição do método analítico - Determinação de aflatoxina M ₁ em queijos (Método IV).....	103
3.4.2.5	Desempenho do método	103
3.4.2.6	Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	104
3.4.3	Avaliação de risco à saúde.....	105
3.4.3.1	Cálculo da ingestão diária provável média - IDPM.....	105
3.4.3.2	Estimativa do índice de risco (Hazard Index -HI)	105
3.5	Análise estatística.....	106
3.6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	106
3.6.1	Determinação de aflatoxina M ₁ em amostras de diversos tipos de queijos orgânicos e convencionais.....	106

3.6.2	Análise de risco à saúde	110
3.7	<i>CONCLUSÃO</i>	113
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	114
	Referências	115
	APÊNDICE A.....	125
	APÊNDICE A.....	126

1 INTRODUÇÃO GERAL

O mercado de produtos orgânicos em 2020 movimentou 120,6 bilhões de dólares (Ecovia intelligence) e, de acordo com FIBL e IFOAM (2022), havia 74,9 milhões de hectares compondo áreas de propriedades em sistema orgânico e cerca de 1,6 % das propriedades agrícolas mundiais estão em sistema orgânico. O leite faz parte da variedade de alimentos oriundo de sistemas orgânicos e sua produção vem aumentando significativamente desde 2008 para atender à crescente demanda. Em 2017, esta produção atingiu 4,7 milhões de toneladas, representando 3% do leite produzido pelos países da União Européia (FIBL & IFOAM – ORGANICS INTERNATIONAL., 2019). O cenário atual dos produtos orgânicos demonstra aumento de demanda mundial contínuo, consumidores na busca por produtos considerados mais saudáveis e um mercado com necessidade de expor claramente os benefícios e diferenciais de seus produtos (SAHOTA, 2022).

A produção de alimentos orgânicos é crescente no mundo e no Brasil, no qual a regulamentação é recente, havendo potencial de desenvolvimento e ocupação de espaço no mercado de acordo com a evolução da demanda (VILELA *et al.*, 2019a). Há poucas pesquisas realizadas com lácteos oriundos dos sistemas de produção orgânicos; além disso, há necessidade de definir o que é um produto orgânico, um dos desafios das empresas que atuam neste mercado, pois as definições para os consumidores são vagas (SAHOTA, 2022).

Tanto o sistema convencional quanto o sistema orgânico de produção estão sujeitos ao desenvolvimento de fungos nas matérias primas utilizadas na elaboração das dietas animais, como grãos de milho, soja, sorgo, fornecidos na forma fresca, de concentrado ou como silagens. Os principais gêneros de fungos toxigênicos encontrados em grãos são *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Scott (1991) e Falasconi (2005) afirmam que, devido a suas características fisiológicas e a execução de práticas irregulares de manejo na agricultura, o crescimento de fungos é favorecido em diversas etapas do crescimento vegetativo e florescimento e até depois da colheita nos processos de beneficiamento, armazenagem e expedição dos grãos.

O sistema de produção orgânico segue regras específicas e, portanto, os padrões de produção são restritos e diferentes do sistema convencional de produção. É interessante entender se a restrição ao uso de fungicidas e

pesticidas em geral pode resultar em maior contaminação dos grãos por fungos aflatoxigênicos e Aflatoxina B₁. Bovinos leiteiros do sistema orgânico que ingerem esses alimentos em suas dietas podem excretar AFM₁ em seu leite, que conseqüentemente será transferido para os derivados.

Dessa forma, o presente trabalho pretendeu avaliar a contaminação fúngica e a ocorrência de aflatoxinas na bovinocultura leiteira orgânica e foi dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo refere-se ao experimento I, o qual tem foco na investigação de aflatoxinas em propriedades que adotam o sistema orgânico de produção de leite, e é intitulado “Ocorrência de fungos aflatoxigênicos e aflatoxinas em alimentos de dietas destinadas a bovinos em sistema orgânico de produção de leite, e ocorrência de aflatoxina M₁ no leite produzido”. O segundo capítulo refere-se ao experimento II, focado na pesquisa de AFM₁ nos queijos de ambos os sistemas de produção, orgânico e convencional, e intitulado “Comparação da ocorrência de aflatoxina M₁ em queijos oriundos de sistema de produção orgânico e convencional e análise de risco à exposição alimentar”.

2 CAPÍTULO I: OCORRÊNCIA DE FUNGOS AFLATOXIGÊNICOS E AFLATOXINAS EM ALIMENTOS DE DIETAS DESTINADAS A BOVINOS EM SISTEMA ORGÂNICO DE PRODUÇÃO DE LEITE, E OCORRÊNCIA DE AFLATOXINA M₁ NO LEITE PRODUZIDO.

RESUMO

Os sistemas orgânicos vêm conquistado espaço no mercado mundial conforme a demanda de produtos, e o leite orgânico está entre eles. Tanto o sistema convencional quanto o sistema de produção orgânico agropecuários estão sujeitos ao desenvolvimento de fungos nas matérias primas utilizadas na elaboração das dietas animais. Fungos do gênero *Aspergillus* podem produzir, de acordo com as condições ambientais, aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, das quais a mais importante para pecuária leiteira é a AFB₁, pois além de mais tóxica, sofre biotransformação no fígado para AFM₁, que é excretada no leite. Há poucas pesquisas realizadas em sistemas de produção orgânicos e do mesmo modo na pecuária de leite orgânica, mediante seu caráter emergente. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de fungos aflatoxigênicos e

aflatoxinas em alimentos de dietas destinadas a bovinos em sistemas orgânicos de produção de leite e avaliar a ocorrência de AFM₁ no leite produzido por estes animais. Foram coletadas, em propriedades no estado de São Paulo, 36 amostras de alimentos destinados à dieta de vacas leiteiras em sistema orgânico, sendo 26 de concentrados e 10 de silagens, e 25 amostras de leite cru refrigerado. Nas amostras de alimentos concentrados foram identificados gêneros de fungos esperados como o *Aspergillus spp*, *Fusarium spp*, *Penicillium spp.*, sendo que houve alta prevalência de *Aspergillus spp* e *Aspergillus seção Flavi*. A AFB₁ foi a aflatoxina maior ocorrência nas amostras de alimentos. Os valores máximos quantificados de aflatoxinas foram de 92,9 µg/kg⁻¹ para AFB₁, 9,26 µg/kg⁻¹, para AFB₂, 3,14 µg/kg⁻¹ para AFG₁ e 1,37 µg/kg⁻¹ para AFG₂, sendo que em uma amostra de alimento concentrado apresentou nível de AFB₁ acima do recomendado pela legislação brasileira para a soma de aflatoxinas em alimentos destinados ao consumo animal. A ocorrência e os níveis quantificáveis nas silagens foram expressivamente inferiores, sendo que somente AFG₁ foi identificada em níveis quantificáveis em uma amostra, com concentração de 10,6 µg/kg⁻¹. A ocorrência de AFM₁ nas amostras de leite cru refrigerado foi considerada baixa, porém com concentrações atingiram níveis de 2,89 µg/L, sendo que três amostras se apresentaram fora do limite máximo AFM₁ para leite fluido no Brasil. Concluiu-se que, apesar da baixa ocorrência de aflatoxinas detectada, foram identificados índices acima das recomendações tanto para alimentos destinados a animais em sistema de produção, quanto para o leite fluido, e dessa forma, há necessidade de controle e mitigação da presença de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, e AFM₁ no sistema orgânico de produção de leite.

Palavras - chaves: AFM₁, *Aspergillus spp.*, propriedades, HPLC, Laticínios

ABSTRACT

Organic systems have been gaining space in the world market according to the demand for products, and organic milk is among them. Both the conventional system and the organic agricultural production system are subject to the development of fungi in the raw materials used in the preparation of animal diets. Fungi of the genus *Aspergillus* can produce, according to environmental conditions, aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂, of which the most important for dairy

farming is AFB₁, because in addition to being more toxic, it undergoes biotransformation in the liver to AFM₁, which is excreted in milk. There is little research carried out in organic production systems and likewise in organic dairy farming, due to its emergent character. Thus, the objective of this study was to evaluate the occurrence of aflatoxigenic fungi and aflatoxins in feed from diets intended for cattle in organic milk production systems and to evaluate the occurrence of AFM₁ in milk produced by these animals. A total of 36 samples of feed for the diet of dairy cows in an organic system were collected from farms in the state of São Paulo, 26 of which were concentrates and 10 of silages, and 25 samples of refrigerated raw milk. In the concentrate feed samples, expected fungal genera such as *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.* were identified, and there was a high prevalence of *Aspergillus spp* and *Aspergillus section Flavi*. AFB₁ was the most common aflatoxin in food samples. The maximum quantified values of aflatoxins were 92.9 µg/kg⁻¹ for AFB₁, 9.26 µg/kg⁻¹ for AFB₂, 3.14 µg/kg⁻¹ for AFG₁ and 1.37 µg/kg⁻¹ for AFG₂, and in a sample of concentrated feed it presented a level of AFB₁ above that recommended by the Brazilian legislation for the sum of aflatoxins in food intended for animal consumption. The occurrence and quantifiable levels in the silages were significantly lower, and only AFG₁ was identified at quantifiable levels in one sample, with a concentration of 10.6 µg/kg⁻¹. The occurrence of AFM₁ in refrigerated raw milk samples was considered low, but with concentrations reaching levels of 2.89 µg/L, and three samples were outside the maximum AFM₁ limit for fluid milk in Brazil. It was concluded that, despite the low occurrence of aflatoxins detected, indices above the recommendations were identified both for feed for animals in the production system and for fluid milk, and thus, there is a need to control and mitigate the presence of AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, and AFM₁ in the organic milk production system.

Key words: AFM₁, *Aspergillus spp.*; Dairy; Farms; HPLC

2.1 INTRODUÇÃO

O leite está presente em uma parcela significativa dos alimentos utilizados na nutrição humana, seja na forma fluida ou de derivados. De acordo com o anuário leite da Embrapa Gado de Leite, 2020 foi um ano de crescimento de

ofertas e demandas para o setor leiteiro, apesar do impacto da pandemia. Porém, em 2021, de forma geral o cenário foi diferente, apontando queda nas vendas, produção e rentabilidade no setor (CARVALHO; ROCHA, 2022a). Carvalho e Rocha (2022a) reiteram que houve prejuízo na renda familiar e conseqüentemente no consumo de lácteos de forma geral. Houve também, elevação constante dos custos de produção, que culminaram na redução da rentabilidade. Dessa forma, houve redução na disponibilidade de leite no Brasil em relação a 2020. Os autores também relatam que em 2021, de acordo com dados do IBGE, também houve queda no volume de leite inspecionado no país (CARVALHO; ROCHA, 2022b). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de leite (MAPA, 2023). Segundo o IBGE (2023), O volume de leite produzido no país em 2022 foi de 34.609.218 mil litros, arrecadando um valor de produção de 80.043.813 mil reais, sendo o estado de maior produção, Minas Gerais, com 9.362.690 mil litros produzidos e arrecadação de 22.886.012 mil reais.

Fungos do gênero *Aspergillus* são potenciais produtores naturais das aflatoxinas. A espécie *A. parasiticus* possui potencial de produção de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e a espécie *A. flavus* pode produzir aflatoxinas B₁ e B₂ (PITT; HOCKING, 2009). Segundo MOSS (1998), apesar da identificação de 18 diferentes tipos de aflatoxinas (AF), as mais comuns em contaminação dos ingredientes de dietas são B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂). Para a produção leiteira, a AFB₁ é a de maior representatividade, pois além de apresentar maior toxicidade, promove a excreção de aflatoxina M₁ (AFM₁) no leite. De acordo com Oliveira et al. (2014), a presença de resíduos de AFM₁ no leite e derivados configura um risco para a saúde pública.

Há poucos estudos acerca a bovinocultura leiteira em sistema orgânico de forma geral, conseqüentemente há poucos dados sobre a presença de aflatoxinas neste sistema de produção. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de fungos aflatoxigênicos e aflatoxinas em alimentos de dietas destinadas a bovinos em sistemas orgânicos de produção de leite e avaliar a ocorrência de AFM₁ no leite produzido por estes animais.

2.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.2.1 A produção em sistema orgânico e a produção de leite em sistema orgânico

A ideologia do sistema de produção orgânico se iniciou na Inglaterra, através do agrônomo Albert Howard após observação de resultados do uso de dejetos animais como fertilizantes naturais na Índia. Tais fundamentos foram difundidos e alcançaram os Estados Unidos anos depois, estabelecendo-se como escola inglesa de agricultura baseada nos recursos naturais. Em 1972, estabeleceu-se a *International Federation of Organic Agriculture Movements* – IFOAM, com o intuito de padronizar e caracterizar a produção de alimentos produzidos sem químicos agrícolas como fertilizantes e pesticidas, de acordo com a demanda crescente do mercado. Surgiu então a definição do termo “produção orgânica” (KHATOUNIAN, 2001).

Neste contexto, uma das ações da IFOAM foi caracterizar esta produção, não somente quanto a inibição do uso de agroquímicos, como os agrotóxicos e adubos, mas foram incluídas também medidas para conservação dos recursos naturais e manejo de bem-estar animal, de modo que tal sistema de produção cumprisse normas pré-estabelecidas para que pudesse ser comercializada com identificação de produto orgânico (KHATOUNIAN, 2001).

O Brasil iniciou sua atuação na produção orgânica de forma mais significativa a partir da década de 1990, porém, só foi normatizada em 2003, após a promulgação da lei federal nº 10.831 (BRASIL, 2003) e regulamentada em 2007 pelo decreto nº 6.323 (BRASIL, 2007), (VILELA *et al.*, 2019a). Em outubro de 2011, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou a Instrução Normativa nº 46 com o intuito determinar um regulamento técnico para os sistemas de produção orgânicos e padronizar uma lista de substâncias e práticas permitidas neste sistema (BRASIL, 2011a).

Em 15 de março de 2021, a IN 46 foi alterada pela Portaria N. 52 do MAPA (BRASIL, 2021a), com o objetivo de atualizar a legislação devido ao crescimento do setor. Segundo Dias (2021), presidente do Instituto Brasil Orgânico, a Portaria N. 52 contempla alterações estruturais da IN 46 para facilitar sua compreensão, a incorporação de conteúdo das IN 37/2011 (BRASIL, 2011b), de produção de sementes e mudas orgânicas, e a INs 38/2011 (BRASIL, 2011c) , sobre a

produção de cogumelos orgânicos, além da inclusão de substâncias permitidas para uso no sistema, inseridas no anexo VIII, referente aos ingredientes para uso em formulações comerciais de produtos fitossanitários.

De acordo com a legislação vigente, os sistemas de produção orgânica devem buscar adotar práticas de manejo que objetivem a proteção, a conservação e o uso racional dos recursos naturais, além da regeneração de áreas degradadas. No caso de sistemas animais, deve-se buscar a adoção de práticas que priorizem a sanidade e bem-estar animal. Além disso, os aspectos sociais dos envolvidos na cadeia de produção também devem ser considerados. As práticas produtivas como: manejo de solo, controle de pragas e sanidade, nutrição e reprodução dos animais estão dispostas na legislação, a qual contém anexo detalhado com lista das substâncias e insumos permitidos para uso. Os estabelecimentos orgânicos devem elaborar um plano que contenha suas práticas e insumos utilizados, o qual deverá ser avaliado pelo órgão responsável por sua certificação (BRASIL, 2011c); (BRASIL, 2021).

A comercialização dos orgânicos no Brasil só é permitida mediante veiculação com o selo único oficial do Sistema Brasileiro de Avaliação da Conformidade Orgânica, que dá garantia de sua identidade, o selo SisOrg, (**Figura 1**) instituído pelo MAPA através da IN 18 de 20 de junho de 2014 (BRASIL, 2014; VILELA et al., 2019)

Figura 1 - Selo SisOrg - identificação dos produtos orgânicos.



Fonte: Instrução Normativa nº 18 de 20 de junho de 2014, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Brasil (2014).

A concessão do selo garante a certificação do produto e, de acordo com a legislação vigente no país, ela pode ser realizada de três formas: por empresa privada ou pública credenciadas pelo MAPA, denominada certificação por

auditoria; por grupo de interesse, produtores, consumidores e técnicos, que seja constituído por Organismo Participativo de Avaliação da Conformidade (OPAC) legal, denominado Sistema participativo de garantia da qualidade orgânica; e no caso de agricultura familiar, há opção dos órgãos fiscais oficiais credenciarem grupos de produtores familiares, seja associação ou cooperativa, para a emissão de certificados de produtos orgânicos, denominada certificação por controle social na venda direta (OCS) (VILELA et al., 2019).

O mercado de leite orgânico tem se apresentado promissor no Brasil e no Mundo, com potencial de crescimento. Segundo Siqueira e Arcuri (2019), os lácteos orgânicos apresentam crescimento anual mundial de 8% e representaram 20% das vendas totais de orgânicos em 2017, com arrecadação de um montante de US\$ 18 bilhões, ultrapassados somente por itens como frutas e vegetais. Dentre os produtos lácteos, o leite fluido representou 24% das vendas totais, considerado o produto mais expressivo do setor, sendo que 50% das vendas mundiais são realizadas nos Estados Unidos, o maior mercado orgânico de leite.

De acordo com a análise da Embrapa Gado de leite, a produção orgânica de leite no Brasil ainda está em processo de estruturação e tem potencial de expansão, já que no sistema orgânico a produção deve ser preferencialmente à pasto e esta modalidade caracteriza a maior parte da produção no país, atrelada ao uso de raças adaptadas ao clima tropical. Porém, a carência no levantamento e atualização de dados do setor de forma sistematizada pode prejudicar seu desenvolvimento (MACHADO et al., 2021).

Em 2018, o Brasil contava com 17.167 propriedades em sistema de produção orgânica de produtos diversos, certificadas e cadastradas no sistema do MAPA. Considerando apenas a produção em sistema orgânico de leite certificada, a estimativa era de 30 mil litros de leite por dia, sendo esta considerada pequena quando comparado à demanda crescente e tamanho das populações dos grandes centros (SNA/SP, 2018).

Em diversas regiões, o país conta com produtores estabelecidos no mercado de orgânicos há bastante tempo, os quais são detentores de laticínios e marcas próprias, e escoam seus produtos, como por exemplo, leite pasteurizado, iogurtes, queijos e manteigas, em comércios locais. Entre os anos de 2018 e 2020, observou-se um crescimento de 26% no número de unidades

produtoras orgânicas de leite inseridos no Cadastro Nacional de Produtores Orgânicos (CNPO), passando de 76 para 96, em abril de 2020. Tal aumento na adesão de produtores está relacionado ao investimento de empresas como a Nestle e a Danone, entre os anos de 2018 e 2020, que implantaram projetos de incentivo à conversão ao orgânico e tecnificação de unidades já certificadas, para captação de leite cru refrigerado. Neste período, só a Nestle captou cerca de 35.000 litros por dia oriundos de aproximadamente 40 produtores participantes do projeto orgânico (MACHADO *et al.*, 2021).

Além da atuação da iniciativa privada, o surgimento de ações como projetos de capacitação no sistema, advindos de instituições como, por exemplo, a Embrapa e o Sebrae, também influenciou o aumento de produtores em conversão para o orgânico no estado de São Paulo (MACHADO *et al.*, 2021). A remuneração do produtor em sistema orgânico de leite é diferenciada, aproximadamente 50% acima do preço do litro calculado pelo Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea), para o Estado de São Paulo, além da bonificação por qualidade; porém, há acréscimos nos custos de produção devido aos investimentos com insumos e produtos específicos utilizados (SNA/SP SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA., 2018).

A Embrapa Gado de leite realizou um levantamento de informações a partir do banco de dados do CNPO, obrigatório para produtos orgânicos, considerando os cadastrados com escopo em “atividade primária animal” e atividades relacionadas a produção de leite. Constatou-se que em abril de 2020 havia 96 unidades de produção inscritas, localizadas em 11 estados, 68% delas presentes na região Sudeste, com 47% concentradas no estado de São Paulo, e 26% na região Sul, compondo as duas regiões com maior concentração de produtores (MACHADO *et al.*, 2021). A distribuição geográfica das propriedades está ilustrada na **Figura 2**.

demonstraram que as propriedades apresentavam área média de 270 hectares, sendo mínimo de 3 ha e no máximo 2.980 ha, e média de 81,5 ha destinados à pecuária orgânica. Os rebanhos eram compostos em 33% por animais de composição Holandês-Gir, 29% por Holandês-Jersey e 22% da raça Jersey. No quesito produção de leite, as médias diárias variavam entre 930 litros de leite, entre 60 L/dia e 5.000 L/dia, e média de 14 L/dia por vaca, com máximo de 25 L/dia, e rebanhos com média de 78, entre 5 vacas e 310, e média de 57 vacas em lactação. Em 46% das propriedades, o sistema a pasto era dotado como exclusivo; em contraponto, em 56% prevalecia o semiconfinamento. Observou-se também a adoção do pastejo rotacionado em 86% das propriedades, bem como silagem de milho, silagem de sorgo e silagem de capim, como suplementação de inverno mais utilizados (MACHADO *et al.*, 2021).

O estudo serviu de base para fomentar novas iniciativas, em maior escala, por parte da Embrapa, como por exemplo, a proposta do projeto de pesquisa “Observatório do leite orgânico”, que consiste em uma plataforma digital para inclusão de dados do sistematizados da produção em sistema orgânico⁷⁷⁷ de leite com o intuito de caracterizar o setor, além de inserção de informações acerca de fornecedores e insumos utilizados para nortear os demais produtores. De acordo com Fábio Homero Diniz, analista da Embrapa Gado de Leite, tal proposta poderá sanar as lacunas de informação dos diferentes setores da cadeia de leite orgânico, consideradas um gargalo no desenvolvimento da produção (NEIVA, 2021).

O cenário de investimento da iniciativa privada mudou no ano de 2021, com a interrupção do projeto de captação de leite orgânico por parte da Danone, e redução de produtores inscritos no programa da Nestle (NEIVA, 2021).

2.2.2 Fungos filamentosos e as micotoxinas na produção na agricultura

De acordo com Miranda (2018), a produção de soja, milho e algodão na safra de 2016 a 2017 corresponderam a cerca de 86% da área plantada com grãos e cereais, 35% das exportações do agronegócio e a mais de 70% das vendas de agrotóxicos. O Centro de Pesquisas Econômicas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (CEPEA -ESALQ) estimou que os produtores de soja tenham investido aproximadamente R\$ 8,3 bilhões de reais em fungicidas

na safra de 2018. Esta alta taxa de uso de agrotóxicos nas principais culturas demonstra a necessidade do combate às pragas que afetam a qualidade da lavoura, como por exemplo os fungos filamentosos abordados por esta revisão.

Segundo Tortora; Funke e Case (2012), os fungos filamentosos, em geral, podem causar diversas doenças em plantas de importância econômica, dessa forma causam prejuízos que podem atingir 1 bilhão de dólares ao ano na agricultura mundial. Os fungos são organismos pertencentes ao reino Fungi, eucarióticos, podem ser unicelulares, como as leveduras, ou pluricelulares, denominados fungos filamentosos, e são quimio-heterotróficos, ou seja, utilizam materiais orgânicos para obtenção de energia. São aeróbios ou anaeróbios facultativos e, em alguns poucos casos descritos, podem ser anaeróbios. Os fungos filamentosos podem formar esporos reprodutivos, sexuados ou assexuados, e possuem formações denominadas hifas (aéreas e vegetativas), as quais em conjunto formam o micélio.

Diversos fatores podem interferir na qualidade e produtividade na agricultura, como por exemplo as variações climáticas, as condições do solo, técnicas de manejo e nutrição das plantas e presença de pragas como nematoides, ácaros, vírus, bactérias, fungos, insetos e plantas invasoras (MIRANDA, 2018). Scott (1991) e Falasconi et al. (2005) afirmam que, devido à composição dos grãos e cereais e à execução de práticas irregulares de manejo na agricultura, o crescimento de fungos é favorecido em diversas etapas do crescimento vegetativo e florescimento e até depois da colheita nos processos de beneficiamento, armazenagem e expedição de tais alimentos. A remoção mecânica das partes visíveis dos fungos, como o micélio, não é suficiente para eliminar a presença das micotoxinas, pois estes metabólitos apresentam resistência aos tratamentos físicos e químicos utilizados no processamento e armazenamento dos insumos destinados às dietas dos animais.

Os fungos filamentosos potencialmente toxigênicos desenvolvem-se em alimentos como grãos de acordo com características propícias, como a atividade de água (Aa), temperatura, aeração e também danos físicos nas sementes, ocasionados por isentos, por exemplo, e interações microbianas (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003; OMINSKI *et al.*, 1994). Durante o período de estocagem dos grãos, a atividade de água e a temperatura são fatores que mais influenciam a produção de toxinas nos grãos contaminados

por fungos toxigênicos (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003). A **Tabela 1** reúne valores de atividade de água ideais para crescimento e para produção das micotoxinas para algumas espécies potencialmente toxigênicas.

Tabela 1 - Valores de atividade de água para crescimento e produção de micotoxinas para algumas espécies de fungos potencialmente toxigênicos.

Fungo	Aa mínima	Aa ótima	Atividade
<i>Aspergillus flavus</i>	0,80	0,98	crescimento
<i>Aspergillus flavus</i>	0,82	0,95 a 0,99	produção de aflatoxinas
<i>Aspergillus parasiticus</i>	0,80 a 0,83	0,99	crescimento
<i>Aspergillus parasiticus</i>	0,86 a 0,87	0,95	produção de aflatoxinas
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,79	0,95 a 0,99	crescimento
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,83	0,98 a 0,99	produção de ocratoxina A
<i>Fusarium graminearum</i>	0,90	-	crescimento
<i>Fusarium graminearum</i>	0,95	-	produção de desoxinivalenol
<i>Fusarium verticillioides</i>	0,87	-	crescimento
<i>Fusarium verticillioides</i>	0,92	-	produção de fumonisina B ₁
<i>Penicillium verrucosum</i>	0,80	-	crescimento
<i>Penicillium verrucosum</i>	0,86 a 0,87	-	produção de ocratoxina A

Fonte: (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010) Micotoxinas em alimentos. Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agrônomicas. v. 7 p.138-161, 2010.

As micotoxinas podem ser produzidas por diversos fungos nos períodos pré e pós-colheita dos grãos, influenciados por múltiplos fatores, por isso seu controle de forma universal é complexo. As boas práticas na agricultura, armazenagem e transporte dos grãos podem ser utilizadas na mitigação dos níveis de micotoxinas. Práticas na lavoura, como por exemplos, controle de insetos, uso de agentes antifúngicos e manutenção da integridade das sementes e limpeza, controle de umidade e temperatura durante a armazenagem são pontos a serem considerados (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003). Segundo Di Gregorio et al. (2014), as boas práticas agrícolas são consideradas a principal forma de controle da presença de fungos e micotoxinas, porém, não garantem a prevenção total de tais toxinas nas culturas.

2.2.2.1 Principais fungos toxigênicos em alimentos destinados à dieta de animais em sistemas de produção

A presença de fungos do gênero *Aspergillus* em grãos e cereais é considerada uma das maiores causas de perdas por degradação de produtos agrícolas (KLICH, 2002). Pitt e Hocking (2009) afirmam que tais fungos têm hábito de crescimento preferencialmente em locais de temperaturas mais elevadas e, por isso, são muito comuns nas regiões de clima tropical e subtropical.

Nos grãos e cereais de interesse econômico, espécies como *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. ochraceus* são muito importantes não só pela degradação e perda da qualidade dos produtos agrícolas, mas também pelo risco associado à saúde humana e animal devido à produção de micotoxinas. *A. parasiticus* possui potencial de produção de aflatoxinas e pode produzir as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e o *A. flavus* pode produzir as aflatoxinas B₁ e B₂ (PITT; HOCKING, 2009).

Fusarium é o gênero de fungos mais encontrado nas culturas de milho no país; dessa forma, destaca-se pelos prejuízos econômicos e riscos à saúde humana e dos animais de produção (OLIVEIRA *et al.*, 2004; PINTO; OLIVEIRA; FERNANDES, 2007). Este gênero abrange diversas espécies responsáveis pela produção de micotoxinas como as fumonisinas (FUMO), zearalenona (ZEA) e toxinas da classe dos tricotecenos.

De acordo com Costa *et al.* (2014), a espécie mais associada ao milho no país é o *Fusarium verticillioides*. Em estudo realizado pela Embrapa Milho e Sorgo, em 2014, Costa e colaboradores obtiveram uma taxa de 99,13% de identificação de *F. verticillioides* dentre isolados fúngicos de amostras de milho coletadas em 15 cidades nas regiões de maior produção de milho do país. Além disso, dos 50 isolados selecionados para testes de produção de toxinas, 100% apresentaram capacidade de produção de fumonisinas.

Há diversos tipos de fumonisinas, mas as principais são as fumonisinas B₁, B₂ e B₃. De acordo com Ostry *et al.* (2017), as FB₂ foram classificadas pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer – IARC em 1993, e a FB₁ em 2002, como grupo 2B, ou seja, possivelmente cancerígenas para humanos. Esta inclusão ocorreu quando os estudos existentes não foram suficientes para evidenciar o efeito carcinógenos das FB₁ e FB₂ em humanos; porém, as

pesquisas experimentais demonstraram tais evidências para carcinogenicidade em animais.

Algumas espécies de animais domésticos são mais sensíveis aos efeitos destas micotoxinas. Nos suínos, o principal sintoma observado pela intoxicação por fumonisinas é o edema pulmonar (HASCHEK *et al.*, 2001). Os suínos também são sensíveis a ingestão de alimentos contaminados por zearalenona (ZEA), principalmente relacionada a problemas reprodutivos no parto, redução na taxa de concepção e repetição de cio.

Nos equinos, a ingestão de FB₁ pode levar ao comprometimento neurológico devido à leucoencefalomalácia, doença descrita por diversos autores em animais alimentados com milho e outros cereais contaminados por *F. verticillioides* (WILSON *et al.*, 1990). No Brasil, é comum relatos de equinos intoxicados esta micotoxina em animais alimentados com dietas diversas. Echenique *et al.* (2019) confirmaram a morte de dois equinos após o consumo de milho verde fresco contaminado por fumonisina. Os autores relataram a morte dos animais após 24 horas do início de sinais clínicos e confirmaram a causa via necrópsia e análise histológica de amostras do sistema nervoso central.

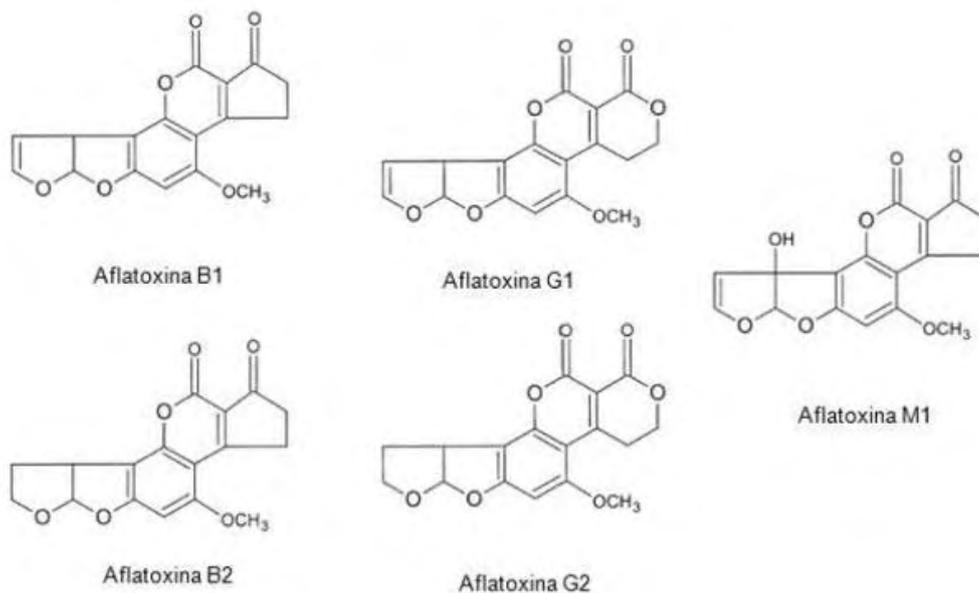
2.2.3 Aflatoxinas

Na década de 60, a aflatoxicose, intoxicação por ingestão da aflatoxina produzida por fungos como *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus flavus*, ficou conhecida pelo evento que matou cerca de 100.000 perus na Inglaterra. Até a descoberta de sua verdadeira causa, ficou conhecida como “doença X dos perus” (PITT; HOCKING, 1986). Outros surtos ocorrem posteriormente, como o relatado em 1974 que afetou 379 pessoas e gerou 108 mortes pela ingestão de milho contaminado por aflatoxina B₁ no noroeste da Índia. Em 1982, no Quênia, também se registrou surto relacionado à ingestão de alimento contaminado com aflatoxina B₁, quando 20 pessoas adoeceram e 12 delas morreram (FREIRE *et al.*, 2007). Devido à alta letalidade dos episódios de intoxicação causados por ingestão de micotoxinas, os estudos avançaram na área de micologia e micotoxicologia.

Segundo MOSS (1998), apesar da identificação de 18 diferentes tipos de aflatoxinas (AF), as mais comuns em contaminação dos ingredientes de dietas

são B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂). As estruturas químicas estão dispostas na **Figura 3**.

Figura 3- Estruturas químicas das aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁.



Fonte: Adaptado de: Souto et al. Principais micotoxicoses em suínos. *Vet. e Zootec.* 2017 Set; 24(3): 480-494 (2017).

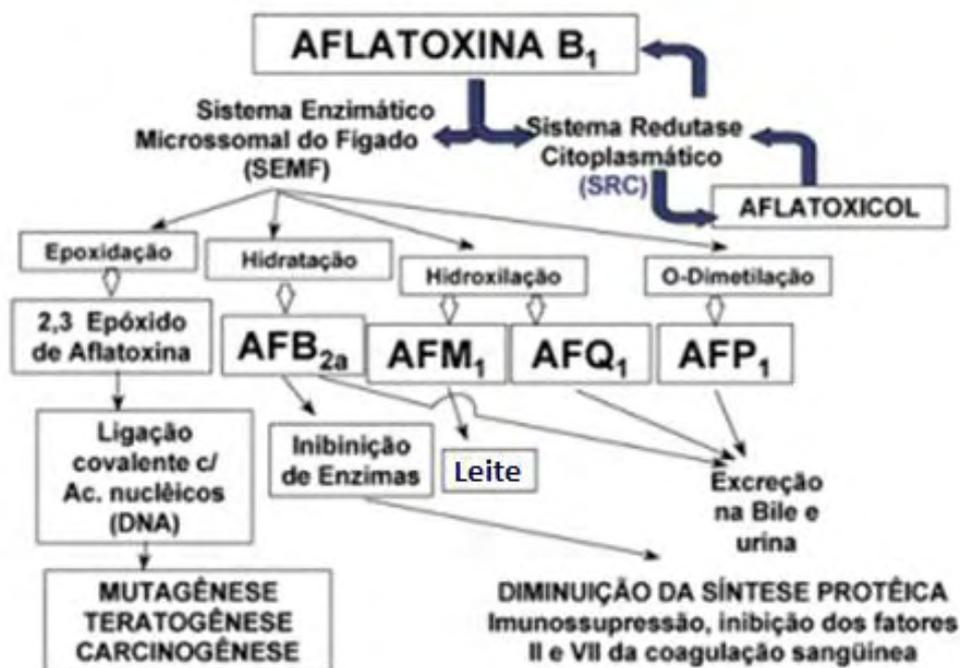
Após a ingestão de alimentos contaminados com aflatoxina B₁, ocorre absorção e início de um processo de detoxificação no fígado, a partir da ativação de sistemas como o complexo enzimático microsossomal denominado citocromo P-450. Esta primeira fase do processo de detoxificação compreende a ação das enzimas microsossomais na reação de epoxidação (ligação de um oxigênio) na dupla ligação do éter vinílico da estrutura bifuróide que compõe a molécula de AFB₁, formando a forma ativa denominada 8,9 óxido de AFB₁. A partir da reação de hidroxilação, o complexo enzimático gera mais três compostos, de alta solubilidade e capacidade de excreção nos fluidos corporais, AFB_{2α}, AFM₁ e AFQ₁, e por reação de O-demetilação, origina a AFP₁ (BIEHL; BUCK, 1987; OLIVEIRA; GERMANO, 1997). Além deste complexo enzimático, enzimas citoplasmáticas do fígado são capazes de reduzir a AFB₁ em um composto denominado aflatoxicol, o qual demonstra menor toxicidade, porém é considerado importante devido à reversibilidade da reação (BIEHL; BUCK, 1987). A AFM₁ pode ser excretada também no leite.

A segunda etapa do processo de biotransformação da AFB₁ é caracterizada pela conjugação dos compostos hidrossolúveis, como por exemplo a ligação entre os compostos AFB_{2α}, AFM₁ e AFQ₁ com ácido glicurônico e sulfatos, a qual possibilita excreção em fluidos como urina, bile e fezes (BIEHL; BUCK, 1987; OLIVEIRA; GERMANO, 1997). A AFM₁ pode ser excretada também no leite.

A AFB₁ é considerada mutagênica, carcinogênica e teratogênica. Os mecanismos de mutagênese e carcinogênese são relacionados à capacidade do 8,9 óxido de AFB₁ ligar-se à molécula de DNA a partir das guaninas, formando compostos denominados adutos, fato que modifica a estrutura molecular e a atividade biológica da molécula, como por exemplo danos a genes supressores de tumores (HSIEH; ATKINSON, 1990; OLIVEIRA; GERMANO, 1997).

O composto 8,9 óxido de AFB₁ também tem afinidade com outras macromoléculas, como a albumina sérica e forma adutos por reações tautoméricas dialdeído com o grupo amino da lisina (JAGER *et al.*, 2011). Tais adutos podem sofrer ação enzimática e liberar um composto denominado AFB₁-lisina (SABBIONI, 1990). A **Figura 4** ilustra a biotransformação da AFB₁ baseada no metabolismo de aves (GONÇALVES *et al.*, 2017).

Figura 4 – Esquema da biotransformação de aflatoxina B₁.



Fonte: Adaptado de: Farias et al. (2005), Aflatoxina M₁ em leite: Um risco para a saúde pública. Embrapa Agroindústria de Alimentos. Documento 67. Rio de Janeiro, RJ; 2005.

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer – IARC, na França, classificou algumas das micotoxinas em categorias, de acordo com a probabilidade de serem cancerígenas em humanos, baseadas em análises de evidências científicas em humanos e experimentos realizados com animais. As aflatoxinas produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₁), além da M₁ (AFM₁), produto da biotransformação da AFB₁, foram classificadas pela IARC em 2012 como grupo 1, ao qual são incluídas as substâncias químicas com evidências científicas suficientes para concluir que podem causar câncer em humanos (OSTRY *et al.*, 2017). A **Tabela 2** demonstra a classificação, segundo o IARC, das aflatoxinas em comparação às demais principais micotoxinas.

Tabela 2- Classificação das principais micotoxinas segundo o IARC.

Micotoxina	Grupo	Classificação	Referências
Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ e M ₁	1	Carcinogênico para humanos	IARC, 2012
-	2A	Provalmente carcinogênico para humanos	-
Fumonisinias B1			IARC,2002
Fumonisinias B2	2B	Possivelmente carcinogênico	IARC, 1993
Ocratoxina A			IARC, 1993
Deoxinivalenol, Nivalenol, T-2 e Zearalenona	3	Não classificável quando à carcinogenicidade para humanos	IARC, 1993
Patulina			IARC, 1987
-	4	Provavelmente não carcinogênico para humanos	-

Fonte: Adaptado de: Ostry et al, Mycotoxins as human carcinogens - the IARC Monographs classification. Mycotoxin Res (2017) 33:65–73.

2.2.4 Aflatoxinas na bovinocultura leiteira

As micotoxinas, seus metabólitos ou compostos gerados por interações têm sido utilizados em pesquisas como biomarcadores de exposição. Em bovinos leiteiros, a quantificação de AFM₁ é utilizada para verificação de exposição à AFB₁ e eficiência de métodos de redução da biodisponibilidade de AFB₁ em bovinos que a receberam experimentalmente em doses específicas (GONÇALVES *et al.*, 2017). Outro exemplo desta prática é o uso de AFB₁-lisina, antes empregada no monitoramento em humanos, para avaliações em suínos e aves (SOUTO *et al.*, 2017).

Nos bovinos leiteiros, redução na produção de leite, no consumo de alimentos e na conversão alimentar, além de prejuízos reprodutivos, claudicação, imunossupressão, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade são observados como efeitos de aflatoxicose em animais expostos a dietas contaminadas de forma experimental com AFB₁ (KEMBOI *et al.*, 2020; WHITLOW; HAGLER JR., 2008). A fermentação ruminal também pode ser afetada e, por consequência, causar prejuízos no aproveitamento de nutrientes. Estudos com emprego de AFB₁ *in vitro* relataram efeitos como a redução na produção de gás, digestibilidade da matéria seca e concentrações de amônia-N e produção de ácidos graxos, fato que indica a aflatoxicose como importante risco para a produção leiteira (KEMBOI *et al.*, 2020).

De acordo com Gonçalves et al. (2017), a literatura acerca dos efeitos da exposição de bovinos leiteiros a AFB₁ na produção e composição do leite apresentam resultados conflitantes. Em estudo conduzido a partir da administração oral, por gavagem, de 480 µg de AFB₁ ao dia, os autores não encontram diferenças significativas na produção e composição do leite, concluindo que a divergência entre dados literários demonstra que a susceptibilidade dos bovinos leiteiros à toxicidade da AFB₁ é variável e pode sofrer influência de diversos fatores, como nível e tempo de exposição à toxina e forma de administração, além de características intrínsecas ao animal como produção de leite, raça e sensibilidade individual.

A quantidade de AFM₁ excretada por animais expostos a AFB₁ em relação ao nível da toxina ingerida é denominada taxa de transferência. Em bovinos leiteiros, a taxa de transferência de AFM₁ no leite ocorre em torno de 1% a 2%, variando em até 6% (EFSA, 2004). Porém, assim como a suscetibilidade aos efeitos tóxicos da AFB₁, a taxa de excreção de AFM₁ no leite também é variável e apresenta divergências na literatura. De acordo com Xiong et al. (2015), a excreção de AFM₁ no leite pode ser influenciada pelo nível de AFB₁ ingerido, além de fatores intrínsecos ao animal como, por exemplo, produção de leite, estágio de lactação, saúde da glândula mamária e a sensibilidade do indivíduo.

Independente dos efeitos sintomáticos e influências negativas sob o desempenho de produção ocasionados pela exposição à aflatoxina B₁, a excreção de AFM₁ ocorrerá no leite de animais que ingeriram alimentos contaminados mesmo em concentrações subtóxicas de AFB₁ (DIAZ *et al.*, 2004). Este fato destaca a relevância da detecção deste metabólito na produção leiteira, tanto como diagnóstico e controle de aflatoxicose no rebanho, como para a segurança dos alimentos.

2.2.5 Limites máximos para micotoxinas e legislação

No Brasil, não há legislação específica sobre os limites máximos tolerados para cada uma das micotoxinas nos diversos insumos utilizados como base para a alimentação dos animais de produção. De acordo com a portaria nº7 do Ministério da Agricultura publicada em 1988, que estabelece padrões mínimos das diversas matérias primas empregadas na alimentação animal, qualquer

matéria prima destinada ao consumo animal deve respeitar o limite máximo de 50 µg/kg para aflatoxinas (BRASIL, 1988).

O Laboratório de Análises Micotoxicológicas – LAMIC, localizado na Universidade Federal de Santa Maria, no Rio Grande do Sul, elaborou recomendações de limites máximos das principais micotoxinas de interesse econômico para algumas espécies de animais domésticos de acordo com suas fases fisiológicas e estágios dentro dos sistemas de produção. Na **Tabela 3** estão dispostos alguns dos limites recomendados pelo LAMIC para seis tipos de micotoxinas.

Tabela 3. Algumas recomendações do LAMIC para limites máximos toleráveis de micotoxinas (µg/kg) em alimentos de algumas espécies de animais domésticos.

Estágio de produção ou fase fisiológica	Micotoxina					
	AFLA	FUMO	OCRA	DON	T-2	ZEA
<i>Aves</i>						
Frango inicial	ND	100	ND	200	ND	500
Frangos em crescimento	2	500	2	500	50	600
Frango Final	5	500	5	1000	50	1000
Poedeiras	10	500	5	1000	100	500
Matrizes	10	500	5	1000	100	500
<i>Suínos</i>						
Inicial	ND	500	50	200	ND	10
Crescimento	5	500	100	200	50	50
Terminação	10	1000	100	400	100	25
Matrizes	5	1000	100	400	100	ND
<i>Bovinos</i>						
Bezerros	20	2000	500	1000	400	250
Touros adultos	20	5000	3000	1000	400	250
Vacas em lactação	0	3000	2000	2000	400	250
<i>Equinos</i>						
Todos	20	500	100	500	1000	100
<i>Perus</i>						
Até 21 dias	ND	100	50	100	ND	10
Acima de 21 dias	5	500	100	200	50	50

Afla: aflatoxina / Fumo: Fumonisina / Ocratoxina / DON: Deoxinivalenol/ T-2: Toxina T-2 / ZEA: Zearalenona. / ND: Não detectado.

Fonte: Adaptado de Laboratório de Análises Micotoxicológicas – LAMIC, Universidade Federal de Santa Maria – Santa Catarina (LAMIC, 2020).

Devido aos riscos oferecidos para a saúde dos consumidores, diversos alimentos possuem limites máximos toleráveis para contaminação pelas principais classes de micotoxinas, os quais estão listados no anexo II da IN nº 88 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), publicada em 2021, que define os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. Tal legislação abrange desde grãos, farinhas, até produtos destinados à alimentação infantil. A **Tabela 4** apresenta um compilado dos limites de algumas das principais micotoxinas em alguns dos alimentos listados na legislação brasileira.

Tabela 4 – Síntese dos limites máximos tolerados para as principais micotoxinas em alguns alimentos pela legislação brasileira (ANVISA).

Micotoxina	Alimento	LMT (µg/Kg)
Afla M ₁	Leite fluido	0,5
	Leite em pó	5
	Queijos	2,5
Afla B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	Amendoim	20
	Milho	20
	Feijões	5
	Cereais e produtos de cereais	5
Fumonisinias B1 + B2	Farinha de milho	1500
	Milho de pipoca	2000
	Milho em grão para processamento	5000
	Amido de milho	1000
Zeralenona	Milho em grão para posterior processamento	400
Desoxinivalenol	Arroz integral	400
	Farinha de trigo	1000
Ocratoxina A	Feijões	10
	Produtos à base de cacau	5
Patulina	Suco e polpa de maçã	50

Fonte: Adaptado do anexo II da IN nº 88 de 26 de março de 2021 que estabelece limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos – ANVISA – (Brasil, 2021b)

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo geral

Avaliar a ocorrência de fungos aflatoxigênicos e aflatoxinas em alimentos de dietas destinadas a bovinos em sistemas orgânicos de produção de leite e avaliar a ocorrência de AFM₁ no leite produzido por estes animais.

2.3.2 Objetivos específicos

a) Avaliar a microbiota e a ocorrência de fungos aflatoxigênicos em alimentos destinados à dieta de bovinos leiteiros em sistema orgânico de produção;

b) Avaliar a ocorrência de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ em alimentos destinados à dieta de bovinos leiteiros em sistema orgânico;

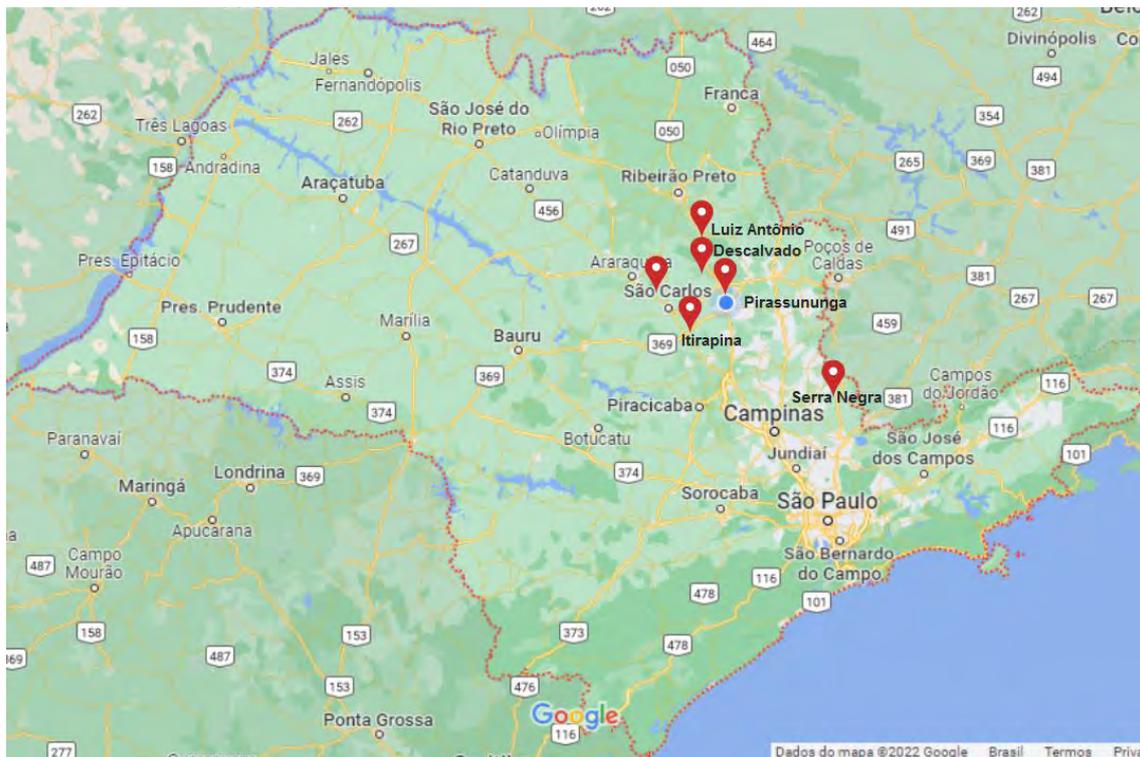
c) Avaliar a ocorrência de aflatoxina M₁ em leite cru refrigerado produzido em sistema orgânico;

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Amostragem em propriedades de sistemas orgânicos

Foram coletadas, em propriedades no estado de São Paulo, 36 amostras de alimentos destinados à dieta de vacas leiteiras em sistema orgânico, sendo 26 de concentrados e 10 de silagens, e 25 amostras de leite cru refrigerado. As propriedades estão localizadas no interior do estado de São Paulo, nos municípios de Pirassununga, Descalvado, Luiz Antônio, São Carlos, Itirapina e Serra Negra, como demonstrado na **Figura 5**. As propriedades foram escolhidas entre as produtoras orgânicas de leite da macrorregião de Pirassununga/SP de acordo com a distância e interesse na participação no projeto durante o período estabelecido, permitindo a visita técnica da equipe e amostragens. As identidades das propriedades leiteiras e laticínios foram preservadas e para identificação em publicação de dados foram utilizadas letras em ordem alfabética escolhidas de forma aleatória.

Figura 5. Localização por município das propriedades em sistema de produção orgânico participantes do experimento.



Fonte: Adaptado de Google Maps, 2022. Disponível em: <https://www.google.com/maps/place/S%C3%A3o+Paulo/@-22.5481643,-50.8804391,7z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0x94ce597d462f58ad:0x1e5241e2e17b7c17!8m2!3d-21.2922457!4d-50.3428431>

As visitas para coleta das amostras ocorreram de agosto de 2019 a dezembro de 2022, com interrupção de março de 2020 a setembro de 2021 devido à pandemia de COVID -19. As frequências amostrais foram de caráter acíclico, englobando primavera, verão e inverno. Durante o período de suspensão das visitas, as propriedades A, B e F encerraram a produção orgânica de leite e por isso deixaram de participar do projeto. O número de visitas técnicas e a quantidade de amostras coletadas por visita em cada propriedade está representado na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Visitas técnicas nas propriedades e número de amostras coletadas por visita.

Propriedade	Número de visitas	Amostras coletadas por visita		
		Concentrado	Silagem	Leite
A	2	2	1	2
B	2	2	1	2
C	7	7	0	7
D	2	2	1	2
E	6	7	6	6
F	1	1	1	1
G	5	5	0	5
Total	25	26	10	25

Fonte: Própria autoria.

Os alimentos foram amostrados de acordo com a disponibilidade e manejo alimentar da propriedade. Cerca de 500 g de cada categoria foram coletados, em sacos estéreis, de diferentes pontos do local armazenado, constituindo uma única amostra de 2 kg. As amostras de leite foram constituídas por 500 ml, por visita, coletados assepticamente do tanque de refrigeração das propriedades após homogeneização. As amostras foram identificadas e acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e transportadas para o Laboratório Multiusuário de Microbiologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP em Pirassununga/SP para as análises.

Foram registradas informações da estação do ano em que cada coleta foi realizada e características dos locais utilizados no estoque dos alimentos coletados. Os locais de estoque foram caracterizados como: “presença ou ausência de sala fechada específica para armazenagem de ingredientes e alimentos destinados à dieta dos animais” e “uso de estrados (tipo *pallets*) de materiais diversos para acomodação das embalagens de ingredientes e alimentos destinados à dieta dos animais”.

2.4.2 Caracterização dos alimentos e locais de armazenagem

De forma geral, as propriedades utilizavam ingredientes semelhantes na composição das dietas destinadas às vacas em lactação, sendo eles farelos de milho, soja, amendoim e trigo. Os alimentos concentrados, componentes das dietas amostradas, foram adquiridos de fornecedores e somente armazenados e misturados nas propriedades. Tais alimentos estão listados como permitidos

para alimentação de bovinos leiteiros em produção orgânica, na legislação vigente para sistemas orgânicos, Instrução Normativa nº46, de outubro de 2011, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. A comprovação da aquisição de alimentos permitidos pela legislação é feita diretamente entre o produtor e a empresa certificadora.

Nas propriedades em que o manejo permitiu a coleta de silagens, os tipos amostrados foram: silagem de milho, silagem de sorgo, silagem de capim mombaça, silagem de consórcio entre sorgo e capim mombaça, e consórcio entre sorgo e leguminosa (Lab-lab). A **Figura 6** ilustra a coleta de amostras de concentrado e silagem.

Figura 6 - Amostragem de alimentos de consumo animal.



Legenda: **A.** Concentrado em uso na composição de dietas para bovinos em sistema orgânico de produção de leite. **B.** Silagem, coletada diretamente do silo, em uso como fonte de volumoso em dietas para bovinos em sistema orgânico de produção de leite.

Fonte: Própria autoria.

Os locais de armazenagem dos alimentos concentrados eram diversos. Com o intuito de categorizar as instalações e possibilitar a comparação, foram registradas as informações a seguir:

- Presença de sala fechada específica para estocagem de alimentos, sendo que neste quesito considerou-se “ausente” quando o local não possuía paredes inteiras com porta, ou a sala também era utilizada para maquinário e implementos agrícolas;

- Presença de estrados (tipo *pallet*), de qualquer material, para acomodação das embalagens de ingredientes e concentrados totais, com objetivo de não permitir o contato com o chão;
- Presença de silo para armazenagem do concentrado;

As **Figuras 7 a 12**, ilustram algumas das infraestruturas utilizadas para a armazenagem dos alimentos destinados à nutrição das vacas em lactação nas propriedades amostradas.

Figura 7 - Armazenagem de alimentos - Propriedade C.



Legenda: **A.** Interior da sala de armazenagem de alimentos. **B.** Armazenagem das embalagens de insumos sob estrado de madeira tipo *pallet*. **C:** Silo para estoque de concentrado localizado ao lado da sala de armazenagem.

Fonte: Própria autoria.

Figura 8 - Sala de armazenagem de alimentos - Propriedade E.



Fonte: Própria autoria.

Figura 9 – Interior da sala de armazenagem de alimentos – Propriedade E.



Legenda: Armazenagem das embalagens de insumos sob estrado de madeira tipo *pallet*.

Fonte: Própria autoria.

Figura 10 - Silo para estoque de concentrado localizado ao lado da sala de armazenagem - Propriedade E.



Fonte: Própria autoria.

Figura 11 - Armazenagem de alimentos - Propriedade G.



Legenda: **A.** Exemplo de sala de armazenagem de alimentos “aberta”. **B.** Armazenagem das embalagens de insumos sob estrado de madeira tipo *pallet*. **C:** Armazenagem de concentrado localizado dentro da sala de armazenagem.

Fonte: Própria autoria.

Figura 12- Silo de armazenagem para concentrado – Propriedade D.



Fonte: Própria autoria.

2.4.3 Análises das amostras de alimentos

2.4.3.1 Mensuração da atividade de água

As amostras de alimentos, concentrados e silagens foram submetidas à determinação da atividade de água, para avaliar a quantidade de água disponível nos produtos, utilizando o equipamento AQUALAB 4TE (Decagon Devices, Inc., Pullman, EUA).

2.4.3.2 Avaliação da micobiota

2.4.3.2.1 Contagem de bolores e leveduras

As amostras de alimentos foram submetidas à avaliação da micobiota. Dez gramas de cada amostra, previamente homogeneizadas, foram diluídas em 90 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}) e homogeneizadas. A partir desta, foram realizadas diluições sucessivas até 10^{-5} , com a inoculação em superfície de 0,1 mL em meio de cultivo DRBC ($A_a > 0,95$) e DG18 ($A_a < 0,95$), de acordo com a atividade de água apresentada pelas amostras. As placas foram incubadas à temperatura de 25°C por cinco dias e, após este período, foi efetuada a contagem de colônias. A partir deste resultado, foi aplicada correção pelo fator de diluição, para o cálculo do número de unidades formadoras de colônia por grama de amostra (UFC/g) (SILVA *et al.*, 2010).

As colônias de diferentes tipos morfológicos foram isoladas em ágar batata e identificadas pela técnica de microcultivo (RIDDELL, 1950). Após o período de microcultivo, foram observadas as características morfológicas (macroscópicas e microscópicas) das colônias formadas conforme descrito por Pitt e Hocking (2009) e classificados de acordo com o gênero.

2.4.3.2.2 Identificação de *Aspergillus* Seção *flavi*

As colônias características do gênero *Aspergillus* foram submetidas a triagem em meio diferencial AFPA (*Ágar Aspergillus flavus e parasiticus*) a 30 °C por 48 a 72 h de acordo com metodologia de (PITT, J. I.; HOCKING; GLENN, 1983). O meio AFPA é utilizado para diferenciação dos *Aspergillus* Seção *flavi*. As colônias de *A. flavus* e *A. parasiticus* apresentam base com coloração amarelo alaranjada devido a produção do ácido aspergílico que reage com o citrato de ferro amoniacal presente no meio. Os fungos identificados como positivos para *Aspergillus* seção *Flavi* serão testados quanto ao potencial toxigênico.

2.4.3.2.3 Avaliação do potencial toxigênico dos isolados de *Aspergillus* seção *Flavi*

Na sequência, para avaliação do potencial aflatoxigênico foi utilizada a técnica preconizada por Lin e Dianese (1976). Um inóculo da colônia de *Aspergillus* seção *Flavi*, obtido do cultivo da cepa em ágar Batata Dextrose a 25°C, foi semeado em ágar coco e incubado a 25°C por 15 dias. Após esse período, todo o conteúdo da placa foi transferido para frasco erlenmeyer de 250 mL e, para cada 10 g da cultura com o ágar, 30 mL de clorofórmio foram acrescentados. Os frascos foram submetidos a agitador mecânico horizontal durante 30 minutos. Os extratos clorofórmicos foram filtrados em papel de filtro e recolhidos em frascos âmbar. Os filtrados foram evaporados até resíduo em banho-maria (60°C) e armazenados a - 4 °C até a análise.

Foi realizada triagem através de cromatografia em camada delgada (CCD) com os extratos ressuspendidos em 1 mL de clorofórmio e aplicados 10 µL de cada extrato em cromatofolha de sílica gel G60 (Merck). A cromatografia foi realizada em cuba cromatográfica contendo como fase móvel solução saturada de clorofórmio:acetona (9:1, v/v). Após a corrida cromatográfica, as cromatofolhas foram secas em capela de exaustão e observadas em sala escura

sob luz UV com comprimento de onda (λ) de 360 nm. As manchas das amostras foram comparadas às dos padrões de aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) de acordo com o R_f dos padrões.

2.4.4 Determinação de aflatoxinas nas amostras de alimentos e leite cru refrigerado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para a determinação de Aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, os alimentos foram analisados utilizando o método I para os concentrados e o método II para as silagens. Já para a determinação de AFM₁ nas amostras de leite foi utilizado o método III.

2.4.4.1 Preparação das amostras de alimentos

Para as análises de aflatoxinas, as amostras de concentrado foram homogeneizadas, seguido de pesagem da amostra analítica (25g) (OLIVEIRA *et al.*, 2010). As amostras de silagem foram pesadas, submetidas a pré-secagem a 60° durante 72 horas para posterior moagem em moinho tipo Wiley. O material moído foi alíquotado em unidades de 25g para pesagem da amostra analítica para determinação de aflatoxinas.

2.4.4.2 Método I: determinação das aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ em concentrado

2.4.4.2.1 Padrões e solventes

Os padrões de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ (Sigma-Aldrich Mix de aflatoxina Oekanal® 20 µg/mL B₁, G₁, B₂, G₂ em acetonitrila) foram diluídos em acetonitrila para obtenção da concentração exata das aflatoxinas. Os solventes utilizados foram metanol e acetonitrila Grau HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

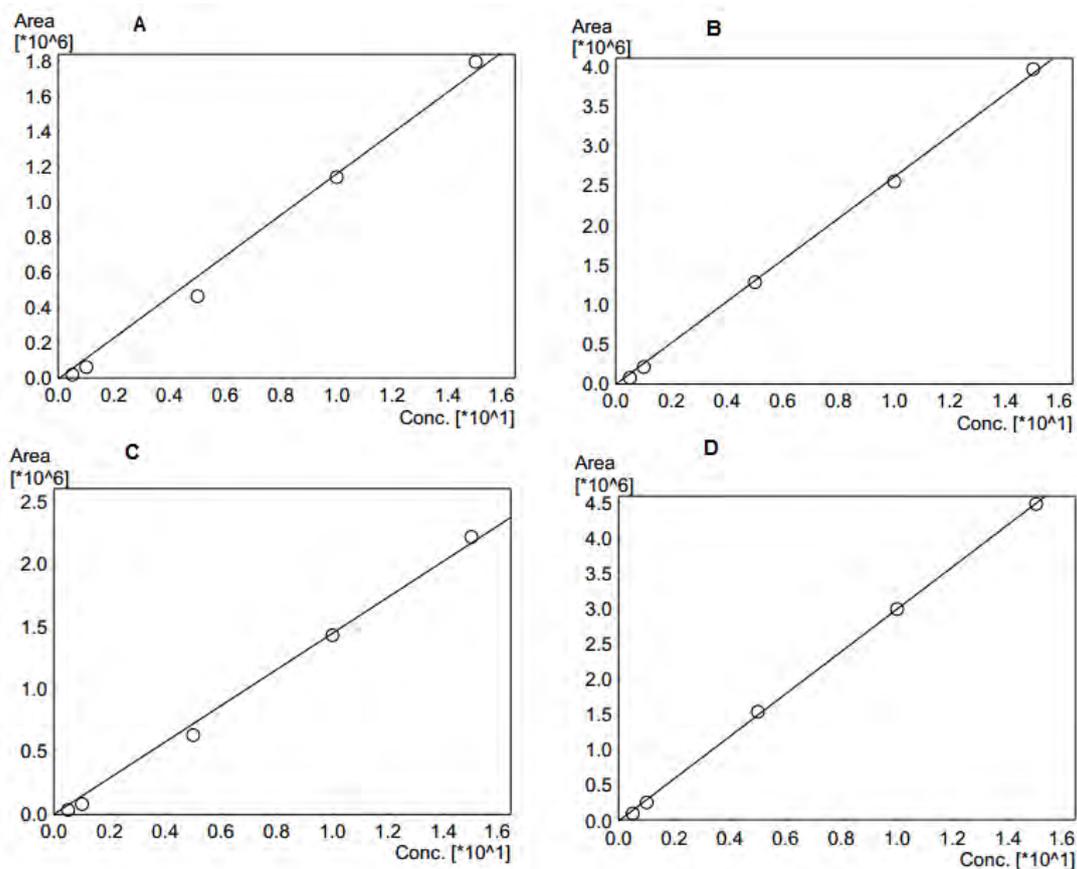
2.4.4.2.2 Curva de calibração e tempos de retenção

Para as curvas de calibração das AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ foram utilizadas cinco concentrações, com 0,5, 1, 5, 10 e 15 ng/mL de cada padrão. As quantidades correspondentes a cada concentração foram colocadas em um vial e evaporadas até a secagem sob fluxo de ar comprimido. Em seguida, procedeu-se a derivatização com 25 µL de ácido trifluoroacético por 5 minutos, ressuspensão com 975 µL de acetonitrila-água (2:8, v/v) e homogeneização em

vórtex por 1 minuto. Injetou-se 50 μL de cada solução padrão no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

O coeficiente de determinação (R^2) das curvas de AFG₁, AFB₁, AFG₂, e AFB₂ foram, 0,9966, 0,9996, 0,9988 e 0,9996 respectivamente. As curvas obtidas podem ser observadas na **Figura 16**.

Figura 13 - Curvas de calibração das AFG₁, AFB₁, AFB₂ e AFG₂.

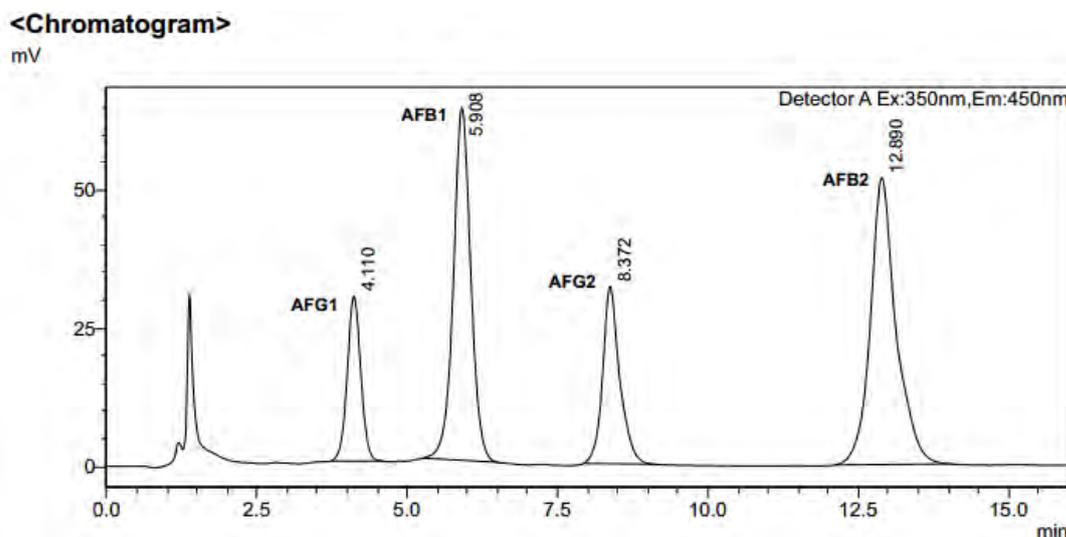


Curvas de calibração com 5 pontos obtidas da solução padrão de (A) AFG₁ (coeficiente de correlação $r = 0,9983$), (B) AFB₁ (coeficiente de correlação $r = 0,9998$), (C) AFG₂ (coeficiente de correlação $r = 0,9994$), (D) AFB₂ (coeficiente de correlação $r = 0,9998$).

Fonte: Própria autoria.

Os tempos de retenção de cada aflatoxina podem ser verificados na **Figura 14**.

Figura 14 - Cromatograma com os tempos de retenção de cada aflatoxina na concentração de 5,0µg/kg.



Cromatograma com os tempos de retenção de cada aflatoxina, sendo: AFG₂: 4.110 min, AFG₁: 5.908 min, AFB₂: 8.372 min e para AFB₁ e 12.890 min.

Fonte: Própria autoria.

2.4.4.2.3 Limites de detecção do método

Os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ) foram determinados a partir do preparo das soluções padrões de aflatoxinas (Sigma-Aldrich Mix de aflatoxina Oekanal® 20 µg/mL B₁, G₁, B₂, G₂ em acetonitrila), até atingir a menor concentração detectada e quantificada de aflatoxinas nas amostras de concentrados (CASSIANO *et al.*, 2009).

O resultado do limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) do método I está disposto na **Tabela 6**.

Tabela 6. Limite de detecção e Limite de quantificação de amostras de concentrado (Método I).

Limites	Concentrado (AF µg/kg)
LOD	0,03
LOQ	0,09

LOD: Limite de Detecção e LOQ: Limite de Quantificação.

Fonte: Própria autoria.

2.4.4.2.4 Descrição do método I:

A determinação de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) nas amostras de concentrados foi efetuada de acordo com a metodologia realizada no Toxicology

Laboratory da University of Missouri, Columbia, USA, sob coordenação do Dr. George E. Rottinghaus, utilizando-se colunas de imunoafinidade Aflatest WB® (Vicam, Watertown, EUA) e sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito resumidamente a seguir (Método I) (MICHELIN *et al.*, 2017).

A amostra de concentrado foi homogeneizada e pesada. A amostra analítica (25 g) foi colocada em um frasco, juntamente com 5 g de NaCl e 100 mL de metanol-água (80:20, v:v). Após a agitação a 250 rpm em mesa agitadora (Lucadema, São Paulo, Brasil) por 30 minutos, procedeu-se a filtração da mistura em papel de filtro Whatman nº1 (Inc. Clifton, New Jersey, EUA) e o recolhimento em outro recipiente.

Em um tubo cônico de 15mL, adicionaram-se 10 mL de solução de tampão fosfato 0,01M, e 1mL da amostra filtrada. A solução foi passada através da coluna de imunoafinidade Aflatest WB® (Vicam, Watertown, EUA) com fluxo de 1-2 gotas/s. Em seguida, a coluna foi lavada com 15 mL de solução de tampão fosfato 0,01 M. Realizou-se a eluição das micotoxinas com a passagem de 1,5 mL de metanol pela coluna de imunoafinidade. Recolheu-se o eluato em um vial de 2mL e, em seguida, procedeu-se a evaporação até a secagem sob fluxo de ar comprimido. Os vials foram armazenados a -20° até o momento da derivatização e injeção no sistema CLAE (MICHELIN *et al.*, 2017).

2.4.4.2.4.1 Derivatização das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂

Foi utilizado o método de derivatização pré coluna. As amostras de alimentos e os padrões utilizados na curva e desempenho dos métodos foram evaporados, derivatizados com 25 µL de ácido trifluoroacético por 5 minutos, ressuspendidas com 975 µL de ACN:H₂O (2:8, v/v), totalizando 1 mL, e homogeneizadas em vórtex por 1 minuto para injeção no sistema CLAE.

2.4.4.2.5 Desempenho do método analítico I: ensaios de recuperação

Para a avaliação do desempenho do método analítico foram realizados ensaios de recuperação em amostras de concentrados, que foram contaminadas artificialmente com as aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ nas concentrações de 5,0 e 20 ng/ml. As amostras foram preparadas em triplicata para cada concentração do composto, seguindo o método descrito anteriormente na **seção 2.4.4.2.4.(pág. 55 e 56)**. As aflatoxinas foram incluídas no conteúdo filtrado, após

a etapa de extração por solvente, antes da passagem na coluna de imunoafinidade. Procedeu-se a derivatização e injeção no sistema CLAE para obtenção de percentuais de recuperação e coeficiente de variação.

A recuperação média para os dois níveis de aflatoxinas no concentrado foi de 85% para AFB₁, 92,9% para AFB₂, 81,4% para AFG₁ e de 88,4% para AFG₂. Os níveis e porcentagens de recuperação obtidos podem ser observados na **Tabela 7**.

Tabela 7. Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ AFG₂ em amostras de concentrado (Método I).

AFB₁ Adicionada (µg/kg)	AFB₁ Observada (µg/kg)	AFB₁ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	3,8	4,1	81,2	9,3
	3,9			
	4,5			
20,0	16,0	17,7	88,7	9,7
	17,7			
	19,5			
AFB₂ Adicionada (µg/kg)	AFB₂ Observada (µg/kg)	AFB₂ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	4,2	4,5	90,6	7,4
	4,5			
	4,9			
20,0	18,6	19,0	95,1	5,9
	18,2			
	20,3			
AFG₁ Adicionada (µg/kg)	AFG₁ Observada (µg/kg)	AFG₁ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	3,7	4,1	82,3	7,7
	4,3			
	4,3			
20,0	16,9	16,1	80,5	4,3
	15,7			
	15,7			
AFG₂ Adicionada (µg/kg)	AFG₂ Observada (µg/kg)	AFG₂ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	4,1	4,5	90,2	8,9
	4,9			
	4,5			
20,0	20,0	17,3	86,6	5,9
	14,8			
	17,1			

Fonte: Própria autoria.

De acordo com a União Europeia (CE 401/2006), para aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ recomendam-se níveis entre 1 a 10 µg/kg com recuperação de 70 a 110% e níveis acima de 10 µg/kg, recuperações de 80 a 110% (UNIAO EUROPEIA, 2006). O coeficiente de variação (CV) para níveis menores que 1 µg/kg não deve ser superior a 30% e para níveis de 10 a 99,9 µg/kg não devem exceder 20% (BRASIL, 2011d). Os percentuais de recuperação e coeficientes obtidos apresentaram-se dentro de tais faixas recomendadas.

2.4.4.3 Método II: Determinação das aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ em silagens

2.4.4.3.1 Padrões e solventes

Os padrões e solventes foram mesmos indicados para o método II (**seção 2.4.4.2.1; pág. 53**) e utilizados do mesmo modo.

2.4.4.3.2 Curva de calibração e tempos de Retenção

As curvas de calibração e tempos de retenção foram os mesmos obtidos para o no método II (**seção 2.4.4.2.2; pág. 53 a 55**).

2.4.4.3.3 Limites de detecção do método

Os limites de detecção foram obtidos de acordo com metodologia descrita para o método II (**seção 2.4.4.2.4; pág. 55**). Os resultados estão dispostos na **Tabela 8**.

Tabela 8. Limite de detecção e Limite de quantificação de amostras de silagens (Método II).

Limites	Silagem (AF µg/kg)
LOD	0,03
LOQ	0,3

LOD: Limite de Detecção e LOQ: Limite de Quantificação.

Fonte: Própria autoria.

2.4.4.3.4 Descrição do método II:

Para a determinação de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) em silagens, adaptou-se a metodologia realizada no Toxicology Laboratory da University of

Missouri, Columbia, EUA, sob coordenação do Dr. George E. Rottinghaus, utilizando-se colunas de imunoafinidade Aflatest WB® (Vicom, Watertown, Estados Unidos da América) e sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito resumidamente a seguir (Método II) adaptado de (MICHELIN *et al.*, 2017).

A amostra analítica de silagem (12,5g) foi colocada em um frasco, juntamente com 2,5 g de NaCl e 100 mL de metanol-água (80:20, v:v). Após a agitação a 250 rpm em mesa agitadora (Lucadema, São Paulo, Brasil) por 30 minutos, procederam-se duas filtrações da mistura, a primeira utilizando papel de filtro Whatman nº1 (Inc. Clifton, New Jersey, EUA), e a segunda utilizando filtro seringa (PTFE/B 0,45 µm; 25mm; Unichro/Allcrom). O filtrado foi recolhido em outro frasco.

Em um tubo cônico de 15mL, foram adicionados 10 mL de solução de tampão fosfato 0,01M, e 0,5 µL da amostra final filtrada. A solução foi passada através da coluna de imunoafinidade Aflatest WB® (Vicom, Watertown, EUA) com fluxo de 1-2 gotas/s. Em seguida, a coluna foi lavada com 15 mL de solução de tampão fosfato 0,01 M. Realizou-se a eluição das micotoxinas com a passagem de 1,5 mL de metanol pela coluna de imunoafinidade. Recolheu-se o eluato em um vial de 2mL e em seguida realizou-se a evaporação até a secagem sob fluxo de ar comprimido. Os vials foram armazenados a -20° até o momento da derivatização e injeção no sistema CLAE (MICHELIN *et al.*, 2017).

2.4.4.3.4.1 Derivatização das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2

A derivatização foi realizada de acordo como indicado na **seção 2.4.4.2.5.1 (pág. 56)**.

2.4.4.3.5 Desempenho do método analítico II: ensaios de recuperação

Para a avaliação do desempenho do método analítico foram realizados ensaios de recuperação de acordo com o indicado na **seção 2.4.4.2.6 (Pág. 56)**, em amostras de silagens. As amostras foram preparadas em triplicata para cada concentração do composto, seguindo o método descrito na **seção 2.4.4.3.4. (pág. 59)**.

A recuperação média para os dois níveis de aflatoxinas em silagens foi de 98,30% para AFB₁, 108,23% para AFB₂, 89,62% para AFG₁ e de 98,79% para

AFG₂. Os níveis e porcentagens de recuperação obtidos podem ser observados na **Tabela 9**.

Tabela 9. Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ AFG₂ em amostras de silagem (Método II).

AFB₁ Adicionada (µg/kg)	AFB₁ Observada (µg/kg)	AFB₁ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5	4,462	5,200	104,01	12,59
	5,711			
	5,428			
15	14,747	13,887	92,58	6,7
	14,014			
	12,899			
AFB₂ Adicionada (µg/kg)	AFB₂ Observada (µg/kg)	AFB₂ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5	4,989	5,710	114,19	11,14
	6,194			
	5,946			
15	16,103	15,342	102,28	5,24
	15,422			
	14,500			
AFG₁ Adicionada (µg/kg)	AFG₁ Observada (µg/kg)	AFG₁ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5	3,828	4,571	91,41	14,58
	5,116			
	4,768			
15	13,845	13,176	87,84	4,79
	13,093			
	12,591			
AFG₂ Adicionada (µg/kg)	AFG₂ Observada (µg/kg)	AFG₂ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5	4,297	5,081	101,63	13,65
	5,614			
	5,333			
15	14,935	14,392	95,95	3,83
	14,408			
	13,834			

Fonte: Própria autoria.

Os percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos apresentaram-se dentro das faixas recomendadas, respectivamente, pela União Europeia (CE 401/2006) (UNIAO EUROPEIA, 2006) e pelo MAPA (BRASIL, 2011d).

2.4.4.4 Método III: Determinação de Aflatoxina M₁ em leite cru refrigerado

2.4.4.4.1 Padrões e solventes

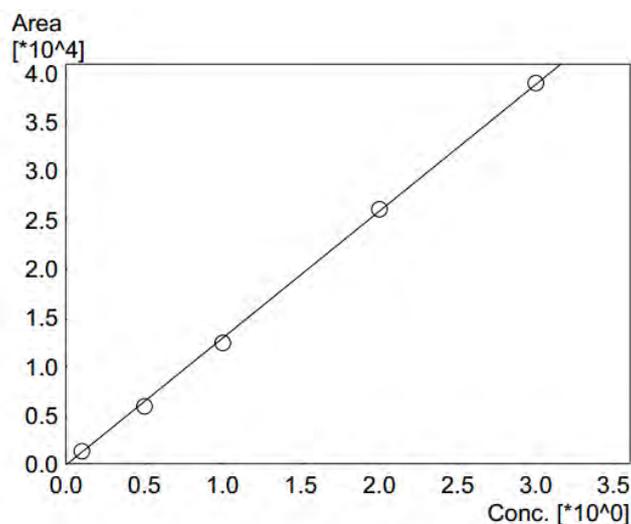
O padrão de AFM₁ (Sigma-Aldrich 0,5 µg/mL M₁ em acetonitrila) foi diluído em acetonitrila para obtenção da concentração exata da aflatoxina. Os solventes utilizados foram metanol e acetonitrila Grau HPLC.

2.4.4.4.2 Curva de calibração e tempo de retenção

Para a curva de calibração da AFM₁ foram utilizadas cinco concentrações, com 0,1, 0,5, 1, 2 e 3 ng/mL do padrão. As quantidades correspondentes a cada concentração foram colocadas em um vial e evaporadas até a secura sob fluxo de N₂. Em seguida, foram ressuspendidas com 1000 µL de acetonitrila-água (2:8, v/v) e homogeneizadas em vórtex por 1 minuto. Injetou-se 50 µL de cada solução padrão no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

O coeficiente de determinação (R²) da curva de AFM₁ foi 0,9995. A curva obtida pode ser observada na **Figura 15**.

Figura 15 - Curva de Calibração da AFM₁.



Legenda: Curva de calibração com 5 pontos obtidas da solução padrão de AFM₁ (coeficiente de correlação $r = 0,9997$).

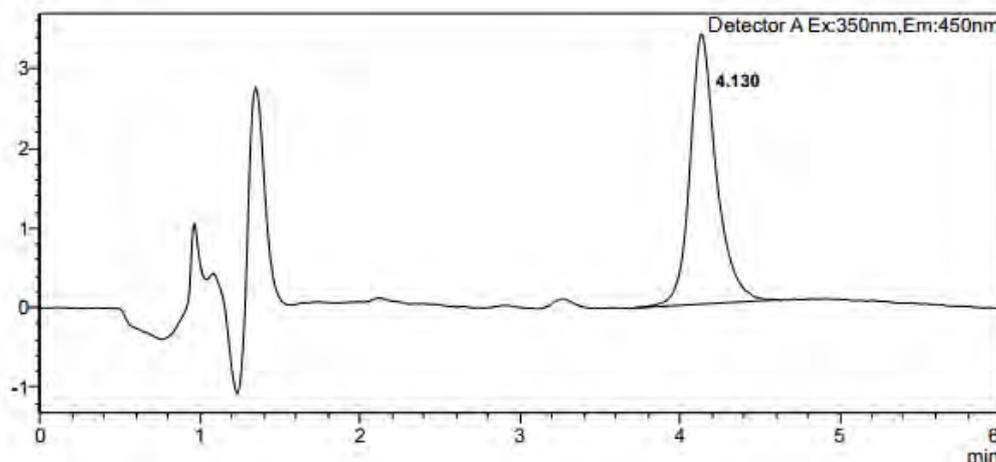
Fonte: Própria autoria.

O tempo de retenção da AFM₁ foi de 4.130 minutos (**Figura 16**).

Figura 16 - Cromatograma com o tempo de retenção da aflatoxina M₁ na concentração de 3 $\mu\text{g/L}$.

<Chromatogram>

mV



Legenda: Cromatograma com o tempo de retenção da aflatoxina M₁ de 4.130 minutos.

Fonte: Própria autoria.

2.4.4.4.3 Limites de detecção

Os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ) foram determinados a partir do preparo das soluções padrões de aflatoxinas (Sigma-Aldrich 0,5 $\mu\text{g/mL}$ M₁ em acetonitrila), até atingir a menor concentração

detectada e quantificada de aflatoxinas nas amostras de leite (CASSIANO *et al.*, 2009).

O resultado do limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) do leite estão representados na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Limite de Detecção e Limite de quantificação de amostras de leite.

Limites	AFM ₁ µg/L
LOD	0,008
LOQ	0,08

LOD: Limite de Detecção e LOQ: Limite de Quantificação.

Fonte: Própria autoria.

2.4.4.4.4 Descrição do método III:

A determinação de aflatoxina M₁ nas amostras de leite foi efetuada utilizando colunas de imunoafinidade AFM₁ HPLC® (Vicam, Watertown, EUA). A metodologia foi realizada de acordo com VICAM (2018) e Lee *et al.*, (2009), com modificações, conforme descrito resumidamente a seguir.

A amostra de leite foi previamente desnatada. Procedeu-se a centrifugação de 50mL de leite gelado a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C e retirou-se a gordura da superfície, descartando-a. A centrifugação foi realizada duas vezes. Em seguida, transferiu-se 2mL da amostra para um tubo falcon de 15mL contendo 10mL de solução de tampão fosfato 0,01M.

A solução foi passada através da coluna de imunoafinidade AFM₁ HPLC® (Vicam, Watertown, EUA) com fluxo de 1-2 gotas/s. Logo após, a coluna foi lavada com 10 mL de solução de tampão fosfato 0,01 M e mais 3mL de água ultrapura. Realizou-se a eluição da micotoxina com a passagem de 1,5 mL de metanol e 1,5mL de água ultrapura pela coluna de imunoafinidade. O eluato foi recolhido em um tubo e 1mL transferido para o vial, injetando-se 50µL no sistema CLAE.

2.4.4.4.5 Desempenho do método analítico III: ensaios de recuperação

Para a avaliação do desempenho do método analítico, realizaram-se ensaios de recuperação nas amostras de leite, que foram contaminadas artificialmente com AFM₁ nas concentrações de 0,5, 1 e 3 µg de AF/kg. As amostras foram preparadas em triplicata para cada concentração do composto, seguindo o método III descrito na **seção 2.4.4.4.4. (Pág. 63)**, e injetadas no

sistema CLAE para obtenção de percentuais de recuperação e coeficiente de variação. A AFM₁ foi incluída no conteúdo filtrado, após a etapa de extração por centrifugação, antes da passagem na coluna de imunoafinidade.

A recuperação média para os três níveis (0,5; 1,0 e 3,0 µg de AFM₁/L) de AFM₁ no leite foi de 105% para AFM₁. Os níveis e porcentagens obtidas estão dispostos na **Tabela 11**.

Tabela 11 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxina M₁ em amostras de leite.

AFM ₁ adicionada (µg/L)	AFM ₁ observada (µg/L)	AFM ₁ média (µg/L)	Recuperação média (%)	CV (%)
0,5	0,558	0,532	106,4	4,8
	0,507			
	0,531			
1	1,053	1,02	102	3,1
	1,017			
	0,99			
3	3,075	3,195	106,5	3,36
	3,228			
	3,282			

CV: coeficiente de variação

Fonte: Própria autoria.

De acordo com a União Europeia (CE 401/2006), para aflatoxina M₁ recomendam-se níveis maiores que 0,05 µg/L com recuperação de 70 a 110%. (UNIAO EUROPEIA, 2006). O coeficiente de variação (CV) para níveis menores que 1 µg/L não deve ser superior a 35% (BRASIL, 2011d). Os percentuais de recuperação e coeficientes de variação apresentaram-se dentro de tais faixas recomendadas.

2.4.4.5 Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para todas as análises foram injetados 50 µL de cada amostra no sistema CLAE, cromatógrafo modelo Prominence 20A (Shimadzu Corporation, Kyoto, JP), com injetor automático, SIL-20A HT (Shimadzu Corporation, Kyoto, JP). A quantificação das amostras de aflatoxinas foi determinada pelo software LabSolutions (Shimadzu Corporation, Kyoto, JP) através das áreas dos picos e da equação da curva analítica. A partir desses dados, foram realizados os

cálculos das concentrações das amostras, para se chegar ao resultado final em $\mu\text{g}/\text{kg}$ de cada composto.

A fase móvel utilizada para separação dos compostos na determinação das Aflatoxinas nos três métodos foi isocrática composta por: água:acetonitrila:metanol (400:100:100, v/v/v), com um fluxo de 1 mL/min. A coluna utilizada foi a Hyperclone BDS C18 (3 μm) 100 x 4,6 mm (Phenomenex®, Califórnia, EUA), cartucho de pré-coluna da Shim Pack GVP-ODS 10Lx4,6 (Shimadzu Corporation, Kyoto, JP) e detector de fluorescência RF-20A com excitação de 362 nm e emissão de 455 nm (Shimadzu Corporation, Kyoto, JP).

2.4.5 Análise estatística

Realizou-se análise estatística de componentes principais, com o objetivo de avaliar de forma conjunta as variáveis qualitativas e quantitativas, de acordo com as premissas da Análise Fatorial de Dados Mistos (FAMD) (JOLLIFE; CADIMA, 2016; LINARES PEREIRA, 2019). As análises foram realizadas utilizando o programa R (R CORE TEAM, 2019).

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1 Análises da micobiota

Nas amostras de concentrado a atividade de água (Aa) média variou de 0,5895 e 0,8687 e as contagens médias de bolores e leveduras variaram de 4,78 a 6,42 Log UFC/g. De forma geral, amostras de todos os locais apresentaram fungos do gênero *Aspergillus* spp. e *Aspergillus seção Flavi*.

Para as amostras de silagem a atividade de água (Aa) média variou de 0,5361 a 0,9959, e as contagens médias de bolores e leveduras variaram entre 3,95 e 8,95 a Log UFC/g. As amostras de silagem apresentaram expressiva contagem de leveduras, sendo que somente uma amostra da propriedade F apresentou *Aspergillus* spp. Outros gêneros de fungos filamentos foram identificados nas amostras de alimentos, como por exemplo: *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Rhizopus* spp.

Os resultados de atividade de água (Aa), contagens de bolores e leveduras, gêneros de fungos identificados e presença de *Aspergillus seção Flavi*, por propriedade, estão dispostos nas **Tabelas 12 a 18**, a seguir.

Tabela 12 - Resultados da análise da microbiota dos alimentos coletados na propriedade A.

Coleta	Estação do ano	Alimento	Aa	Contagem de Bolores e Leveduras (Log UFC/g)	Gêneros de fungos identificados (Log UFC/g)	Presença de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i>
1	Inverno	Silagem de sorgo e Lab Lab (Leguminosa)	0,9786	8,95	Somente leveduras*	Não
1	Inverno	Concentrado (farelo de milho, soja não trans e núcleo mineral)	0,5746	5,90	<i>Aspergillus spp.</i> e <i>Fusarium spp.</i>	Sim
2	Verão	Concentrado (farelo de trigo, farelo de soja e núcleo)	0,6577	4,36	<i>Aspergillus spp.</i> e <i>Fusarium spp.</i>	Sim
Média dos concentrados (n=2)			0,6162	5,13		

Aa: Atividade de água; UFC/g: Unidades formadoras de colônias por grama. n = número de amostras que compõe a média.

*As leveduras foram apenas contadas e não houve identificação a nível de gênero como nos fungos filamentosos.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 13 - Resultados da análise da microbiota dos alimentos coletados na propriedade B.

Coleta	Estação do ano	Alimento	Aa	Contagem de Bolores e Leveduras (Log UFC/g)	Gêneros de fungos identificados (Log UFC/g)	Presença de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i>
1	Inverno	Silagem de sorgo	0,9959	6,32	<i>Penicillium spp.</i>	Não
1	Inverno	Concentrado (Farelo de milho, soja, farelo de amendoim)	0,5875	6,89	<i>Aspergillus spp. e Fusarium spp.</i>	Sim
2	Verão	Concentrado (Farelo de milho, soja, farelo de amendoim)	0,6392	5,94	<i>Aspergillus spp., Fusarium spp. e Penicillium spp.</i>	Sim
Média dos concentrados (n=2)			0,6134	6,42		

Aa: Atividade de água; UFC/g: Unidades formadoras de colônias por grama. n = número de amostras que compõe a média.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 14 - Resultados da análise da microbiota dos alimentos coletados na propriedade C.

Coleta	Estação do ano	Alimento	Aa	Contagem de Bolores e Leveduras (Log UFC/g)	Gêneros de fungos identificados (Log UFC/g)	Presença de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i>
1	Inverno	Concentrado (Farelo de milho, sorgo e amendoim, e soja)	0,5333	6,68	<i>Fusarium pp. e Penicillium spp.</i>	Não
2	Verão	Concentrado (Farelo de milho, sorgo e amendoim, e soja)	0,7205	6,57	<i>Aspergillus spp.</i>	Sim
3	Verão	Concentrado (Farelo de milho, sorgo e amendoim, e polpa cítrica)	0,5270	6,18	<i>Aspergillus spp.</i>	Não
4	Verão	Concentrado (Farelo de milho, sorgo e amendoim, e polpa cítrica)	0,6515	5,81	<i>Aspergillus spp. e Fusarium spp.</i>	Sim
5	Verão	Concentrado (Farelo de milho, sorgo e amendoim, e polpa cítrica)	0,6360	4,38	<i>Aspergillus spp.</i>	Sim
6	Verão	Concentrado (Farelo de milho, sorgo e amendoim, e polpa cítrica)	0,6583	5,54	<i>Aspergillus spp. e Fusarium spp.</i>	Sim
7	Primavera	Concentrado (Farelo de milho, sorgo e amendoim, e polpa cítrica)	0,6391	7,43	<i>Aspergillus spp. e Fusarium spp.</i>	Sim
Média dos concentrados (n=7)			0,6237	6,08		

Aa: Atividade de água; UFC/g: Unidades formadoras de colônias por grama. n = número de amostras que compõe a média.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 15 - Resultados da análise da microbiota dos alimentos coletados na propriedade D.

Coleta	Estação do ano	Alimento	Aa	Contagem de Bolores e Leveduras (Log UFC/g)	Gêneros de fungos identificados (Log UFC/g)	Presença de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i>
1	Inverno	Silagem de Sorgo e Capim	0,5361	5,93	<i>Aspergillus spp.</i>	Não
1	Inverno	Concentrado (Farelo de milho e soja)	0,9778	5,79	<i>Aspergillus spp. e Fusarium spp.</i>	Sim
2	Verão	Concentrado (Farelo de milho e soja)	0,7595	6,73	<i>Aspergillus spp. e Fusarium spp.</i>	Sim
Média dos concentrados (n=2)			0,8687	6,26		

Aa: Atividade de água; UFC/g: Unidades formadoras de colônias por grama. n = número de amostras que compõe a média.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 16 - Resultados da análise da micobiota dos alimentos coletados na propriedade E.

Coleta	Estação do ano	Alimento	Aa	Contagem de Bolores e Leveduras (Log UFC/g)	Gêneros de fungos identificados (Log UFC/g)	Presença de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i>
1	Inverno	Silagem de capim (Mombaça)	0,9817	3,00	Somente leveduras*	Não
1	Inverno	Silagem de milho	0,9800	5,26	Somente leveduras*	Não
3	Verão	Silagem de capim (Mombaça)	0,9859	5,26	Somente leveduras*	Não
4	Verão	Silagem de capim (Mombaça)	0,9350	4,22	Somente leveduras*	Não
5	Verão	Silagem de milho	0,9891	5,96	Somente leveduras*	Não
6	Primavera	Silagem de milho	1,0025	0,00	-	-
Média das silagens (n=6)			0,979	3,95		
1	Inverno	Concentrado (farelo de milho)	0,6711	5,41	<i>Aspergillus spp. e Fusarium spp.</i>	Sim
1	Inverno	Concentrado (Farelo de milho e soja)	0,6646	5,70	<i>Aspergillus spp. e Penicillium spp.</i>	Sim
2	Verão	Concentrado (Farelo de milho, soja e trigo)	0,6705	5,45	<i>Aspergillus spp.</i>	Sim
3	Verão	Concentrado (Farelo de milho, soja e trigo)	0,7304	7,15	<i>Aspergillus spp. e Fusarium spp.</i>	Sim
4	Verão	Concentrado (Farelo de milho, soja e trigo)	0,6686	4,58	<i>Aspergillus spp.</i>	Sim
5	Verão	Concentrado (Farelo de milho, soja e trigo)	0,6442	4,70	<i>Aspergillus spp. e Fusarium spp.</i>	Sim
6	Primavera	Concentrado (Farelo de milho, soja e trigo)	0,6230	5,76	<i>Aspergillus spp.</i>	Sim
Média dos concentrados (n=7)			0,6675	5,54		

Aa: Atividade de água; UFC/g: Unidades formadoras de colônias por grama. n = número de amostras que compõe a média.

*As leveduras foram apenas contadas e não houve identificação a nível de gênero como nos fungos filamentosos.

Resultados representados por “-“ indicam que não houve presença de Bolores e Leveduras naquela amostra.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 17 - Resultados da análise da microbiota dos alimentos coletados na propriedade F.

Coleta	Estação do ano	Alimento	Aa	Contagem de Bolores e Leveduras (Log UFC/g)	Gêneros de fungos identificados (Log UFC/g)	Presença de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i>
1	Primavera	Silagem de sorgo	0,9690	6,03	<i>Aspergillus spp.</i>	Sim
1	Primavera	Concentrado	0,5895	4,78	<i>Aspergillus spp.</i>	Sim

Aa: Atividade de água; UFC/g: Unidades formadoras de colônias por grama. n = número de amostras que compõe a média.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 18 - Resultados da análise da microbiota dos alimentos coletados na propriedade G.

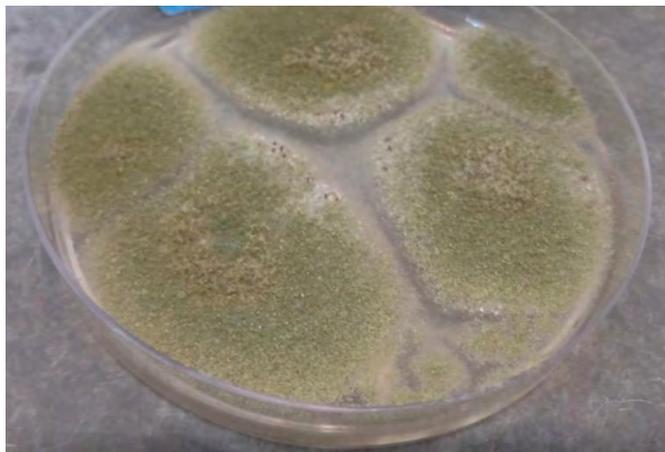
Coleta	Estação do ano	Alimento	Aa	Contagem de Bolores e Leveduras (Log UFC/g)	Gêneros de fungos identificados (Log UFC/g)	Presença de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i>
1	Verão	Concentrado (Farelo de soja, Fuba de milho e amendoim)	0,6017	6,79	<i>Aspergillus spp.</i>	Sim
2	Verão	Concentrado (Farelo de soja, Fuba de milho e amendoim)	0,6437	5,94	<i>Aspergillus spp. e Fusarium spp.</i>	Sim
3	Verão	Concentrado (Farelo de soja, Fuba de milho e amendoim)	0,6250	5,85	<i>Fusarium spp</i>	Não
4	Verão	Concentrado (Farelo de soja, Fuba de milho e amendoim)	0,5954	6,60	<i>Aspergillus spp.</i>	Sim
5	Primavera	Concentrado (Farelo de soja, Fuba de milho e amendoim)	0,6492	5,60	<i>Aspergillus spp.</i>	Sim
Média dos concentrados (n=5)			0,6230	6,16		

Aa: Atividade de água; UFC/g: Unidades formadoras de colônias por grama. n = número de amostras que compõe a média.

Fonte: Própria autoria.

A **Figura 17** ilustra colônias de *Aspergillus* spp. isoladas de uma amostra de alimentos e na **Figura 18** é possível observar colônias de *Aspergillus* seção *Flavi* confirmadas por meio de ágar seletivo e diferencial.

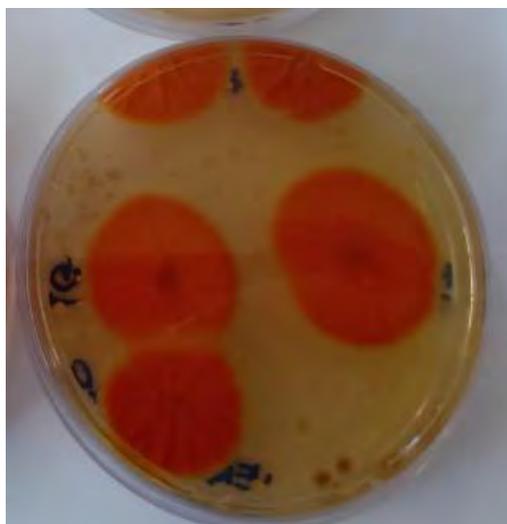
Figura 17 - Fungo do gênero *Aspergillus* em ágar dextrose batata (PDA).



Legenda: Isolado de amostra de concentrado.

Fonte: Própria autoria.

Figura 18- Fungo do gênero *Aspergillus* em “ágar AFPA”.



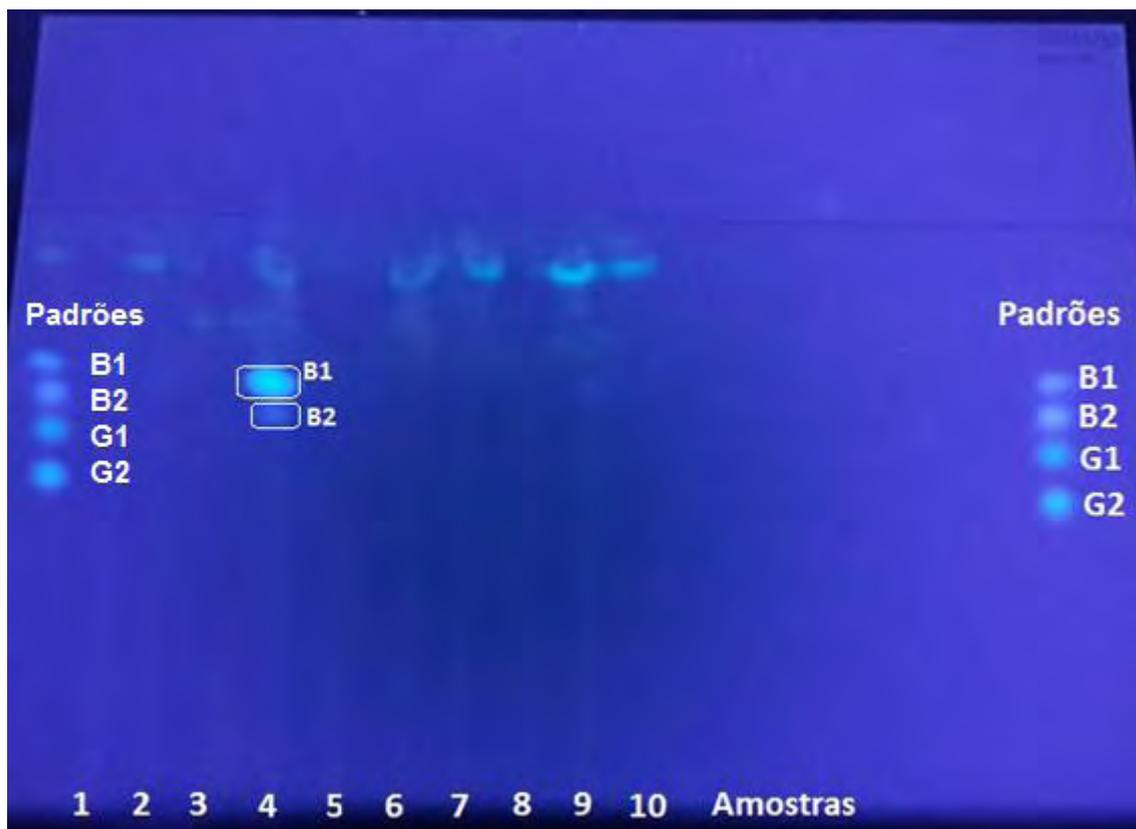
Legenda: Isolado de amostra de concentrado, apresentando cor alaranjada no verso das colônias em “ágar AFPA” seletivo e diferencial.

Fonte: Própria autoria.

2.5.2 Cromatografia em camada delgada

Somente a colônia de *Aspergillus* isolada da amostra de farelo de amendoim da propriedade B apresentou produção de aflatoxinas do tipo B₁ e B₂, visualizadas por exposição da cromatofolha de sílica à luz UV com comprimento de onda 360 λ. (**Figura 19**). A confirmação das toxinas foi realizada com base na comparação com padrões das respectivas aflatoxinas.

Figura 19 - Resultado de Cromatografia em Camada Delgada (CCD).



Legenda: Folha de sílica exposta à luz UV (360 λ), indicando produção de Aflatoxinas B₁ e B₂, por cepa de *Aspergillus* isolado de amostra de farelo de amendoim em uso na alimentação de bovinos leiteiros em sistema orgânico.

Fonte: Própria autoria.

2.5.3 Determinação das aflatoxinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

2.5.3.1 Resultados da determinação de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em amostras de alimentos (concentrados e silagens).

Nos concentrados totais, as aflatoxinas mais expressivas foram AFB₁ e AFB₂ (**Tabelas 19 e 20**). Nos locais A e F, não houve detecção de nenhuma das aflatoxinas. Na propriedade D, somente em uma amostra foram identificados

níveis quantificáveis de AFB₁ e não se detectou nenhuma das demais aflatoxinas. Na propriedade E, duas amostras apresentaram níveis quantificáveis de AFB₁ e níveis considerados traços de AFB₂. O maior número de amostras com identificação de AFB₁ puderam ser observados nos locais C e G, nos quais 100% das amostras apresentaram níveis quantificáveis de AFB₁. Os valores médios máximos quantificados de aflatoxinas, considerando todos os locais, foram de 92,9 µg/kg AFB₁, 9,26 µg/kg AFB₂ (**Tabelas 19 e 20**) e 3,14 µg/kg AFG₁, 1,37 µg/kg AFG₂ (**Tabelas 21 e 22**).

Nas silagens, a ocorrência e os níveis quantificáveis foram expressivamente inferiores aos resultados obtidos nas amostras de concentrado. Somente na propriedade E, 2 amostras (33,3%) foram detectadas com níveis traços de AFB₁ (**Tabela 23**). Nenhuma amostra de nenhum dos locais apresentou AFB₂ (**Tabela 24**). Das aflatoxinas analisadas, somente AFG₁ foi identificada em níveis quantificáveis, sendo 1 amostra da propriedade A (100%) com 10,6 µg/kg (**Tabela 25**). Foram detectados traços de AFG₁ em 1 amostra de B (100%) e 1 amostra de E (16,6%). AFG₂ foi detectada em níveis traços em 1 amostra da propriedade E (16,6%) (**Tabela 26**).

Tabela 19 - Aflatoxina B₁ em concentrados totais.

Amostras concentrado	Níveis (µg/kg AFB ₁)	Propriedade						
		A	B	C	D	E	F	G
ND (< LOD)	<0,03	100% (2)	0	0	50% (1)	33,3% (2)	100% (1)	0
Traços (entre LOD e LOQ)	0,03-0,09	0	0	0	0	33,3% (2)	0	0
Níveis quantificáveis (≥LOQ)	≥0,09	0	100% (2)	100% (7)	50% (1)	33,3% (2)	0	100% (5)
Positivos (≥ LOD)	≥0,03 - 92,9	0	100% (2)	100% (7)	50% (1)	66,6% (4)	0	100% (5)
Total de amostras		2	2	7	2	6	1	5

Fonte: Própria autoria.

Tabela 20 - Aflatoxina B₂ em concentrados totais.

Amostras concentrado	Níveis (µg/kg AFB ₂)	Propriedade						
		A	B	C	D	E	F	G
ND (< LOD)	<0,03	100% (2)	0	0	100% (2)	83,3% (5)	100% (1)	0
Traços (entre LOD e LOQ)	0,03-0,09	0	0	14,3% (1)	0	16,6% (1)	0	40% (2)
Níveis quantificáveis (≥LOQ)	≥0,09	0	100% (2)	85,7% (6)	0	0	0	60% (3)
Positivos (≥ LOD)	≥0,03 -9,26	0	100% (2)	100% (7)	0	16,6% (1)	0	100% (5)
Total de amostras		2	2	7	2	6	1	5

ND: não detectado; LOD: limite de detecção = 0.03 µg/ kg⁻¹; LOQ: Limite de Quantificação = 0.09 µg/ kg⁻¹; Traços: valores entre o LOD e LOQ.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 21 - Aflatoxina G₁ em concentrados totais.

Amostras concentrado	Níveis (µg/kg AFG ₁)	Propriedade						
		A	B	C	D	E	F	G
ND (< LOD)	<0,03	100% (2)	0	71,4 (5)	100% (2)	100% (6)	100% (1)	100% (5)
Traços (entre LOD e LOQ)	0,03-0,09	0	100% (2)	0	0	0	0	0
Níveis quantificáveis (≥LOQ)	≥0,09	0	0	28,6 (2)	0	0	0	0
Positivos (≥ LOD)	≥0,03 - 3,14	0	100% (2)	28,6 (2)	0	0	0	0
Total de amostras		2	2	7	2	6	1	5

Fonte: Própria autoria.

Tabela 22 - Aflatoxina G₂ em concentrados totais.

Amostras concentrado	Níveis (µg/kg AFG ₂)	Propriedade						
		A	B	C	D	E	F	G
ND (< LOD)	<0.03	100% (2)	100% (2)	71,4 (5)	100% (2)	100% (6)	100% (1)	100% (5)
Traços (entre LOD e LOQ)	0.03-0.09	0	0	0	0	0	0	0
Níveis quantificáveis (≥LOQ)	≥0.09	0	0	28,6 (2)	0	0	0	0
Positivos (≥ LOD)	≥0.03 - 1,37	0	0	28,6 (2)	0	0	0	0
Total de amostras		2	2	7	2	6	1	5

ND: não detectado; LOD: limite de detecção = 0.03 µg/ kg⁻¹; LOQ: Limite de Quantificação = 0.09 µg/ kg⁻¹; Traços: valores entre o LOD e LOQ.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 23 - Aflatoxina B₁ em silagens.

Amostras silagem	Níveis (µg/kg AFB ₁)	Propriedade						
		A	B	C	D	E	F	G
ND (< LOD)	<0,03	0	100% (1)	-	100% (1)	66,6% (4)	100% (1)	-
Traços (entre LOD e LOQ)	0,03-0,3	0	0	-	0	33,3% (2)	0	-
Níveis quantificáveis (≥LOQ)	≥0,3	0	0	-	0	0	0	-
Positivos (≥ LOD)	≥0,03 - 0,09	0	0	-	0	33,3% (2)	0	-
Total de amostras		1	1	-	1	6	1	-

Fonte: Própria autoria.

Tabela 24 - Aflatoxina B₂ em silagens.

Amostras silagem	Níveis (µg/kg AFB ₂)	Propriedade						
		A	B	C	D	E	F	G
ND (< LOD)	<0,03	0	100% (1)	-	100% (1)	100% (6)	100% (1)	-
Traços (entre LOD e LOQ)	0,03-0,3	0	0	-	0	0	0	-
Níveis quantificáveis (≥LOQ)	≥0,3	0	0	-	0	0	0	-
Positivos (≥ LOD)	≥0,03	0	0	-	0	0	0	-
Total de amostras		1	1	-	1	6	1	-

ND: não detectado; LOD: limite de detecção = 0.03 µg/ kg⁻¹; LOQ: Limite de Quantificação = 0.3 µg/ kg⁻¹; Traços: valores entre o LOD e LOQ. Resultados indicados com “-“ demonstram que o tipo de alimento não foi coletado na propriedade em questão.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 25 - Aflatoxina G₁ em silagens.

Amostras silagem	Níveis (µg/kg AFG ₁)	Propriedade						
		A	B	C	D	E	F	G
ND (< LOD)	<0,03	0	0	-	100% (1)	83,3% (5)	100% (1)	-
Traços (entre LOD e LOQ)	0,03-0,3	0	100% (1)	-	0	16,6% (1)	0	-
Níveis quantificáveis (≥LOQ)	≥0,3	100% (1)	0	-	0	0	0	-
Positivos (≥ LOD)	≥0,03 - 10,6	0	100% (1)	-	0	16,6% (1)	0	-
Total de amostras		1	1	-	1	6	1	-

Fonte: Própria autoria.

Tabela 26 - Aflatoxina G₂ em silagens.

Amostras silagem	Níveis (µg/kg AFG ₂)	Propriedade						
		A	B	C	D	E	F	G
ND (< LOD)	<0,03	0	100% (1)	-	100% (1)	83,3% (5)	100% (1)	-
Traços (entre LOD e LOQ)	0,03-0,3	0	0	-	0	16,6% (1)	0	-
Níveis quantificáveis (≥LOQ)	≥0,3	0	0	-	0	0	0	-
Positivos (≥ LOD)	≥0,03 - 0,09	0	0	-	0	16,6% (1)	0	-
Total de amostras		1	1	-	1	6	1	-

ND: não detectado; LOD: limite de detecção = 0,03 µg/ kg⁻¹; LOQ: Limite de Quantificação = 0,3 µg/ kg⁻¹; Traços: valores entre o LOD e LOQ. Resultados indicados com “-” demonstram que o tipo de alimento não foi coletado na propriedade em questão.

Fonte: Própria autoria.

A ocorrência de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ de forma geral foi baixa, pois na maior parte das amostras de alimentos não houve detecção. Porém, entre as amostras positivas, a AFB₁ foi a mais prevalente atingindo um nível de 92,9 µg/kg em umas das amostras de concentrado, seguida da AFB₂, com nível de 9,26 µg/kg. No Brasil, qualquer matéria prima destinada ao consumo animal deve respeitar o limite máximo de 50 µg/kg para aflatoxinas (BRASIL, 1988). Dessa forma, a amostra de concentrado em questão está muito acima da legislação brasileira. As legislações mundiais são divergentes, fato que dificulta um cenário de comparação. Os países associados a União Européia, por exemplo, consideram o limite de 10 µg/kg de AFB₁ em alimentos prontos para fornecimento aos animais de produção. Para animais monogástricos como suínos e aves, as dietas completas prontas para consumo devem respeitar o limite de 20 µg/kg (exceto animais jovens). Não há limites específicos definidos para vacas em lactação (LAMIC, 2023).

A maior prevalência de AFB₁ nas amostras de concentrado e a elevada concentração demonstrada em uma das amostras ressaltam a importância das estratégias de controle e mitigação desta aflatoxina nos alimentos fornecidos às vacas leiteiras, devido a sua relação com a excreção de AFM₁ no leite por vacas que ingeriram alimentos contaminados. De acordo com Diaz et al., vacas leiteiras que ingeriram alimentos contaminados com aflatoxina B₁, mesmo que em concentrações subtóxicas, excretarão AFM₁ no leite. Gonçalves et al. (2017) indicam que a transferência da AFB₁ quantidade de AFM₁ excretada por animais expostos a AFB₁ em relação ao nível da toxina ingerida, pode ocorrer de 0,3% a 6% em vacas alimentadas com rações experimentalmente contaminadas.

2.5.3.2 Resultados da determinação de aflatoxina M₁ em amostras de leite cru refrigerado.

Nas amostras de leite cru refrigerado, a AFM₁ foi quantificada em 6 amostras da propriedade C (85,7%) e em 3 amostras da propriedade G (60%), com nível máximo de 2.89 µg/L. Em 2 amostras (100%) da propriedade B, foram detectados níveis considerados traços. Nos demais locais não houve detecção de AFM₁ (**Tabela 27**).

Tabela 27 - Detecção e quantificação de aflatoxina M₁ em amostras de leite cru refrigerado oriundo de rebanhos de bovinos de leite em sistema orgânico de produção.

Amostras leite	Níveis (µg/L AFM ₁)	Propriedade						
		A	B	C	D	F	G	E
ND (< LOD)	<0.008	100% (2)	0	14,3% (1)	100% (2)	100% (1)	40% (2)	100% (6)
Traços (entre LOD e LOQ)	0.008-0.08	0	100% (2)	0	0	0	0	0
Níveis quantificáveis (≥LOQ)	≥0.008	0	0	85,7% (6)	0	0	60% (3)	0
Positivos (≥ LOD)	≥0.08 - 2.89	0	100% (2)	85,7% (6)	0	0	60% (3)	0
Total de amostras		2	2	7	2	1	5	6

ND: não detectado; LOD: limite de detecção = 0,008 µg/L⁻¹; LOQ: Limite de Quantificação = 0,08 µg/L⁻¹; Traços: valores entre o LOD e LOQ.

Fonte: Própria autoria.

Apesar da ocorrência de AFM₁ ser baixa nas amostras analisadas, dentre as amostras positivas, as concentrações atingiram níveis de 2,89 µg/L, sendo que três amostras estariam fora do limite máximo de 0,5 µg/kg AFM₁ para leite fluido no Brasil (BRASIL, 2021b) e nos EUA, que considera 0,5 µg/kg AFM₁ como limite máximo em produtos lácteos em geral (US FDA, 1996). Além disso, se considerado o limite mais rigoroso, indicado pela União Européia de 0,05 µg/kg AFM₁ para leite cru (CAMPAGNOLLO et al., 2016), 8 das 25 amostras de leite cru estariam fora dos padrões.

2.5.4 Resultados da análise fatorial de dados mistos (FAMD)

Os resultados obtidos foram divididos em variáveis quantitativas: ocorrência de aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, Atividade de água (Aa), contagem de bolores e leveduras (Log UFC/g) em alimentos, e ocorrência de AFM₁ em leite cru refrigerado, e variáveis qualitativas: tipo de alimento (concentrado ou silagem), presença de *Aspergillus* spp. e presença de *Aspergillus seção Flavi* nos alimentos, estação do ano durante a coleta (primavera, verão ou inverno), Tipo de sala de armazenagem dos alimentos (presença de sala fechada específica para estocagem de alimentos) e forma de acondicionamento das embalagens de alimentos dentro das salas (presença de estrados tipo *pallet*, de qualquer material).

Para análise da ocorrência de aflatoxinas como variável quantitativa, no método de componentes principais, os resultados foram considerados da seguinte forma:

- Não detectados (ND) = zero;
- Níveis traços = valores obtidos no HPLC menores do que o LOD de cada método (AF µg/kg);
- Quantificáveis = valores maior do que o limite de quantificação (AF µg/kg);

O objetivo do uso da análise de componentes principais, FAMD, foi proporcionar a análise das variáveis de forma conjunta. De acordo com os princípios desta análise, os resultados foram agrupados, sendo que após a análise, os dados obtidos para cada variável em cada uma das coletas passam a representar indivíduos formados pela associação entre eles (LINARES

PEREIRA, 2019). Um total de 36 indivíduos foram obtidos. A tabela de indivíduos consta no apêndice A.

A seguir, a representação de um dos indivíduos:

Indivíduo 31:

Local de coleta = propriedade G;

Estação do ano = verão;

Tipo de sala de armazenagem = presença de sala fechada específica para estocagem de alimentos;

Forma de acondicionamento das embalagens de alimentos (insumos) = presença de estrados tipo *pallet*, de qualquer material;

Tipo de alimento = concentrado;

AFB₁= 92,9 µg/kg; AFB₂= 9,26 µg/kg; AFG₁=0 (ND);

Atividade de água = 0,5954;

Contagem de Bolores e leveduras = 6,60;

Aspergillus spp. = presente;

Aspergillus seção *Flavi* = presente;

AFM₁= 0 (ND);

Os valores mínimos, máximos, média e desvio padrão da análise descritiva das variáveis quantitativas estão dispostos na **Tabela 28**. A média para AFB₁ nos alimentos foi de 7,224 µg/kg, 0,859 µg/kg para AFB₂ e 0,447 µg/kg para AFG₁. A atividade de água média nos alimentos foi de 0,703 e a contagem de bolores e leveduras de 5,65 Log UFC/g.

Tabela 28 – Análise estatística descritiva das variáveis quantitativas.

Variáveis quantitativas	Estatística descritiva			
	N	Mínimo	Máximo	Média ± DP
AFB ₁ (µg/kg) ^a	36	0	92,91	7,224 ± 20,71
AFB ₂ (µg/kg) ^a	36	0	9,26	0,859 ± 2,15
AFG ₁ (µg/kg) ^a	36	0	10,61	0,447 ± 1,84
Aa em alimentos	36	0	1,002	0,703 ± 0,16
Bolores e Leveduras ^b	36	0	8,95	5,65 ± 1.43
AFM ₁ (µg/L) ^c	36	0	1,36	0,00 ± 0.25

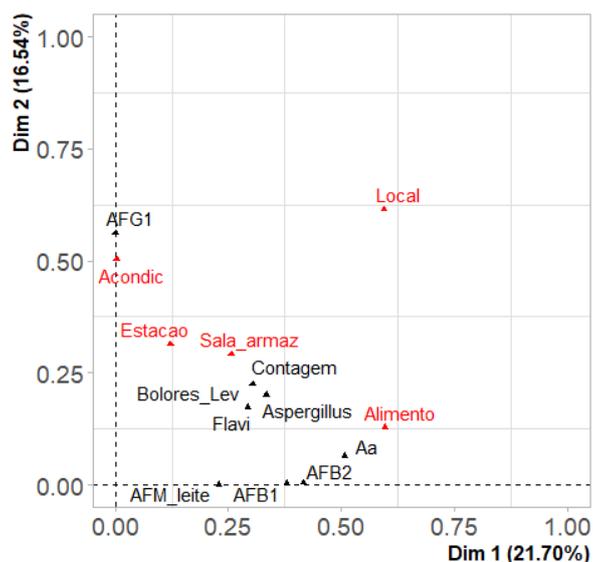
Aa: Atividade de água; N= número de indivíduos; DP= Desvio Padrão.

A: ocorrência em alimentos; **b:** contagem em alimentos (Log UFC/g); **c:** ocorrência em leite.

Fonte: Própria autoria.

Os indivíduos formados foram dispostos em um plano multidimensional de acordo com as correlações entre eles. A **Figura 20** ilustra as correlações das variáveis nas dimensões. Quanto mais próximo de 1, maior é a correlação com a dimensão; dessa forma, é possível observar que as variáveis atividade de água e o tipo de alimento estão mais correlacionadas com a dimensão 1. Já as variáveis AFG₁, “forma de acondicionamento” estão mais relacionadas a dimensão 2.

Figura 20 - Correlação entre variáveis qualitativas e quantitativas com dimensões principais.



Legenda: **Acondic** = forma de acomodação das embalagens de alimentos dentro das salas; **Sala_armaz** = tipo de sala de armazenagem dos alimentos. **Estação:** estação do ano; **Local:** propriedades; **Alimento** = tipo de alimento; **Aa** = atividade de água nos alimentos; **Bolores_Lev** e **Contagem** = contagem de bolores e leveduras; **Flavi** = presença de *Aspergillus seção Flavi*; **AFM_leite** = AFM₁ em leite; **AFB1** = aflatoxina B₁; **AFB2** = aflatoxina B₂ e **AFG1** = aflatoxina G₁.

Fonte: Própria autoria.

Os autovalores são coeficientes utilizados como critérios para extração dos fatores para explicação das fontes de variância dos dados, sendo considerados apenas aqueles maiores que 1 (KUPPUSAMY; GIRIDHAR, 2006;

ZAREI; POURREZA BILONDI, 2013). A “variância explicada” demonstra o quanto da variabilidade dos dados é explicada em cada dimensão.

A **Tabela 29** demonstra os autovalores, a variância explicada (%) e a variância cumulativa (%). A “variância cumulativa” obtida foi de 68,54%, próxima ao valor recomendado de 70%. A variância cumulativa das 5 dimensões não soma 100% pois algumas dimensões são desconsideradas por apresentarem autovalor menor do que 1.

Tabela 29 - Autovalores e porcentagens das variâncias, explicada e cumulativa, por dimensão.

Dimensões	Autovalor	Variância explicada %	Variância cumulativa %
1	4,3405	21,7026	21,7026
2	3,3088	16,5440	38,2465
3	2,8054	14,0270	52,2735
4	1,7726	8,8631	61,1366
5	1,4821	7,4104	68,5470

Legenda: Considerando os autovalores > 1.

Fonte: Própria autoria.

Na **tabela 30** estão indicadas as contribuições de cada uma das variáveis quantitativas e qualitativas em relação a cada dimensão. São consideradas como principais as dimensões 1, 2 e 3. É possível observar que a “atividade de água nos alimentos” e o “tipo de alimento” demonstram maiores contribuições na dimensão 1. AFG₁ e a “forma de acondicionamento” tiveram suas maiores contribuições na dimensão 2, 16,96175 e 15,22353, respectivamente. As maiores contribuições das variáveis “ocorrência de AFB₁ e AFB₂ em alimentos” (16,4089 e 15,61623 respectivamente), “ocorrência de AFM₁ leite” (12,82078) e “presença de *Aspergillus* spp.” e “presença de *Aspergillus* seção *Flavi*” (13,40478 e 12,55247 respectivamente), foram na dimensão 3. Nota-se que as demais variáveis contribuíram mais para dimensões que são consideradas menos expressivas na explicação da variabilidade dos dados.

Tabela 30 - Contribuições das variáveis quantitativas e qualitativas nas dimensões.

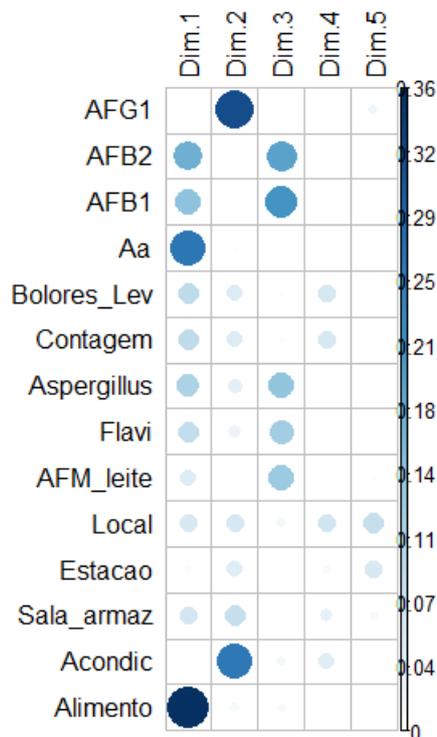
Variáveis	Dimensões				
	1	2	3	4	5
AFB1 em alimentos ^a	8,75146	0,09632	16,40898	0,41441	0,19386
AFB2 em alimentos ^a	9,56939	0,11537	15,61623	0,04384	0,55027
AFG1 em alimentos ^a	0,00132	16,96175	0,29301	0,45757	9,91827
Aa dos alimentos	11,71763	1,93012	1,90454	0,01247	0,60317
Bolores e Leveduras ^b	6,99899	6,80221	2,25980	13,99103	1,99971
<i>Aspergillus</i> spp. ^c	7,69612	6,08529	13,40478	0,72800	0,06341
<i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i> ^c	6,74938	5,22423	12,55247	1,68117	0,19444
AFM ₁ em leite ^a	5,28181	0,00383	12,82078	0,00233	4,37646
Local de coleta ^d	13,69584	18,57502	12,27552	36,09708	48,30844
Estação do ano ^e	2,81531	9,46890	1,02228	9,37963	23,42336
Sala de armazenagem ^f	5,89756	8,82405	0,24065	10,73913	7,08037
Acondicionamento do alimento ^g	0,05758	15,22353	4,92013	12,45626	0,11186
Tipo de alimento ^h	13,76862	3,88716	4,02103	0,00606	1,17668

a: ocorrência **b:** contagem nos alimentos (Log UFC/g); **c:** presença ou ausência nos alimentos; **d:** propriedade A, B, C, D, E, F ou G; **e:** primavera, verão ou inverno; **f:** presença de sala fechada específica de armazenagem de alimentos; **g:** uso ou não de estrado para acondicionamento das embalagens de alimentos; **h:** concentrado ou silagem;

Fonte: Própria autoria.

A **Figura 21** expõe outra forma de representação das contribuições de cada variável e as 5 dimensões e demonstra maiores contribuições das variáveis “atividade de água nos alimentos” e “tipo de alimento” na dimensão 1. “Ocorrência de AFG₁ em alimentos” e a “forma de acondicionamento” na dimensão 2, e “ocorrência de AFB₁ e AFB₂ em alimentos”, “ocorrência de AFM₁ leite”, “presença de *Aspergillus* spp.” e “presença de *Aspergillus* seção *Flavi*” na dimensão 3.

Figura 21 – Representação das variáveis quantitativas e qualitativas de acordo com suas associações com cada uma das 5 dimensões.



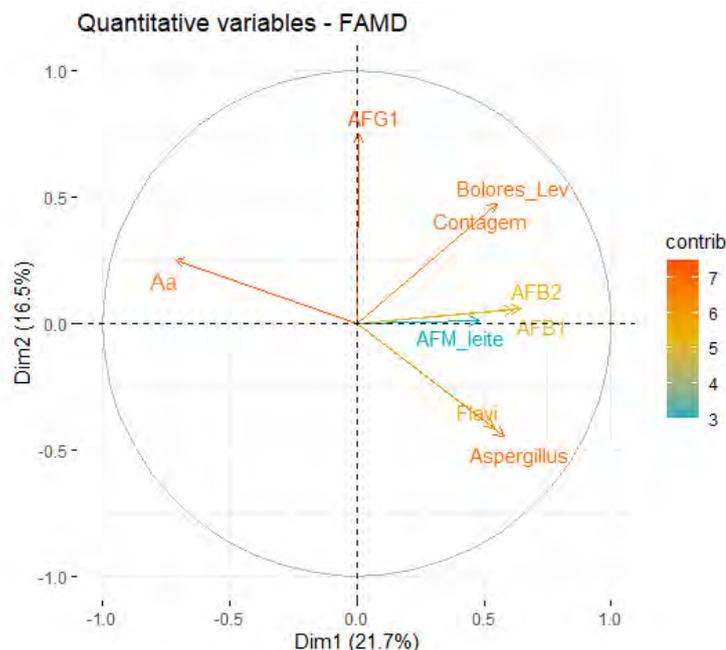
Legenda: Quanto maior o círculo e mais escuro o tom de azul, mais associada está a variável com a dimensão.

Acondic = forma de acondicionamento das embalagens de alimentos dentro das salas; **Sala_armaz** = tipo de sala de armazenagem dos alimentos. **Estação:** estação do ano; **Local:** propriedades; **Alimento** = tipo de alimento; **Aa** = atividade de água nos alimentos; **Bolores_Lev** e **Contagem** = contagem de bolores e leveduras; **Flavi** = presença de *Aspergillus* seção *Flavi*; **AFM_leite** = AFM₁ em leite; **AFB1** = aflatoxina B₁; **AFB2** = aflatoxina B₂ e **AFG1** = aflatoxina G₁.

Fonte: Própria autoria.

A **Figura 22** representa a associação entre as variáveis quantitativas nas dimensões principais. É possível observar que AFB₁ e AFB₂ estão diretamente correlacionadas entre si e também com a presença de fungos do gênero *Aspergillus* spp. e *Aspergillus* spp. seção *Flavi*. A atividade de água dos alimentos apresenta-se no quadrante oposto à presença de *Aspergillus* spp. e *Aspergillus* spp., demonstrando estarem negativamente correlacionados, indicando que quanto maior a atividade de água, menor foi a presença destes fungos. Para a ocorrência de aflatoxinas e contagem de bolores e leveduras, a mesma interpretação é válida, de acordo com o posicionamento das setas representativas destas variáveis.

Figura 22 - Representação das associações entre as variáveis quantitativas com as dimensões principais.



Legenda: Variáveis positivamente correlacionadas são agrupadas. Variáveis negativamente correlacionadas são posicionadas em lados opostos da origem do gráfico (quadrantes opostos). A distância entre as variáveis e a origem mede a qualidade das variáveis no mapa de fatores. Variáveis que estão longe da origem são bem representadas no mapa de fatores. A escala de cores está relacionada à contribuição das variáveis em cada uma das dimensões, variando de azul a vermelho, da menor para a maior contribuição.

Fonte: Própria autoria.

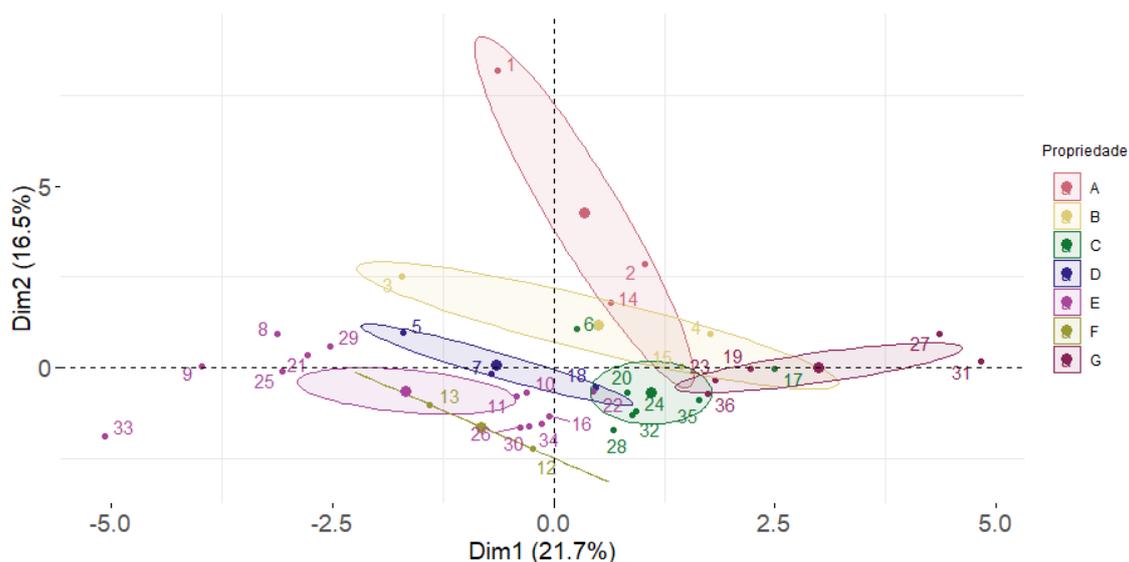
A seguir, as **Figuras 23 a 27** representam mapas de fatores obtidos a partir do agrupamento dos 36 indivíduos, influenciado individualmente por cada uma das cinco características qualitativas: local de coleta, estação do ano, tipo de alimento, tipo de sala de armazenagem e formas de acondicionamento dos alimentos.

Indivíduos com perfis semelhantes estão próximos uns dos outros no mapa de fatores, de tal forma que a elipse indica a concentração ao redor de cada grupo semelhante. Dessa forma, as elipses mostram o agrupamento de indivíduos semelhantes, considerando os resultados obtidos para os fatores quantitativos, em relação a cada um dos fatores qualitativos.

A **Figura 23** representa o efeito do local de coleta (Propriedade) em relação ao agrupamento dos indivíduos. No gráfico, há 3 elipses mais interligadas, relacionadas às propriedades A, B e G, provavelmente devido a característica de armazenagem semelhantes entre os indivíduos (ausência de

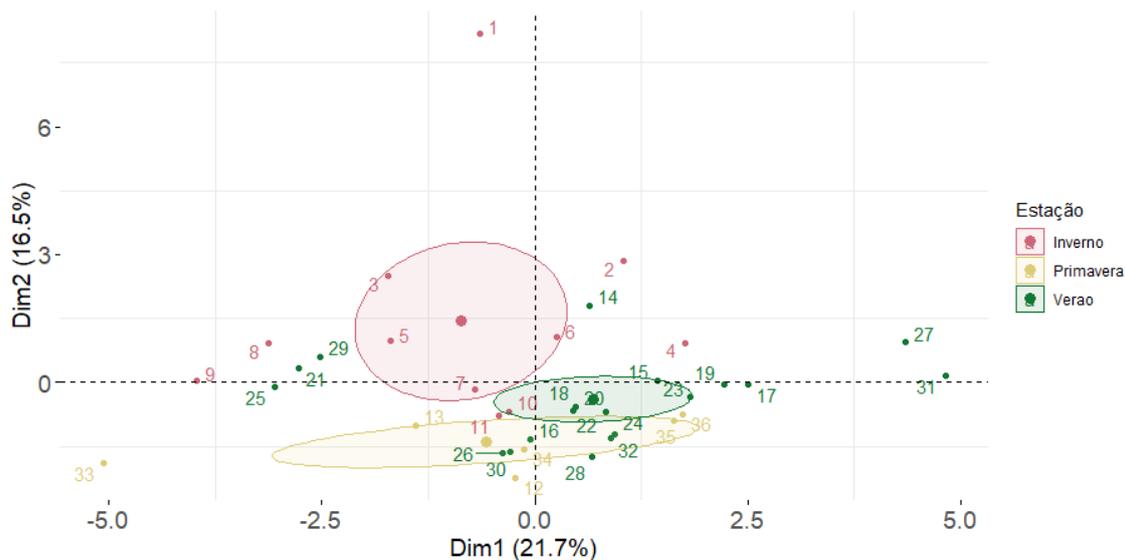
sala fechada). Entretanto, de forma geral, o local onde foi realizada a coleta não explicou efetivamente os resultados obtidos, visto que as elipses estão agrupadas, pois os locais são semelhantes entre si.

Figura 23 - Representação da influência do local de coleta (Propriedade) no agrupamento entre os indivíduos.



Na **Figura 24** está representado o mapa de feito da estação do ano. É possível observar que a estação do ano foi eficaz em explicar os resultados quantitativos obtidos, já que os indivíduos se agruparam em 3 elipses bem definidas, representando cada uma das estações. Os indivíduos relacionados ao verão e primavera demonstram semelhanças entre si, dada a proximidade no gráfico, que pode ser justificada pela maior presença de fungos do gênero *Aspergillus*, *Aspergillus seção Flavi* e prevalência de aflatoxinas nas amostras coletadas no verão e primavera, como é possível observar, comparando os resultados da figura 22.

Figura 24 - Representação da influência da estação do ano no agrupamento entre os indivíduos.



O tipo de alimento foi um fator que demonstrou explicar de forma eficaz as variações nos resultados relacionados a prevalência e concentração das aflatoxinas. As elipses apresentam-se distantes entre si, ou seja, demonstraram resultados para variáveis quantitativas distintos. Avaliando o gráfico da **Figura 25** por sobreposição ao gráfico da **Figura 22** é possível observar que os concentrados estão relacionados diretamente com a identificação de *Aspergillus* e *Aspergillus Seção Flavi*, e prevalência das aflatoxinas, ou seja, foram maiores do que para as amostras de silagens, e inversamente proporcional a atividade de água, ou seja, são representados por amostras com menor atividade de água, quando comparados às silagens.

Figura 25 - Representação da influência do tipo de alimento no agrupamento entre os indivíduos.



A forma de armazenagem (**Figura 26**) e presença de estrado para acondicionamento (**Figura 27**) são variáveis que se apresentaram mais relacionadas a contagem de bolores e leveduras, do que a identificação de *Apergillus seção Flavi* e a prevalência de micotoxinas. A elipse dos indivíduos relacionados a propriedades (**Figura 23**) que não possuíam sala específica e não utilizava pallets para acondicionamento dos alimentos está mais concentrada no quadrante superior direito do gráfico, demonstrando ser diretamente proporcional à variável qualitativa contagem de bolores e leveduras na **figura 22**. É provável que estoque dos alimentos em locais abertos, expostos às intempéries do ambiente, principalmente a umidade, tenha favorecido o desenvolvimento dos demais fungos filamentosos, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, entre outros, comuns ao ambiente e solo e leveduras, como identificado nas amostras de concentrado.

Figura 26 - Representação da influência do tipo de sala de armazenamento dos alimentos no agrupamento entre os indivíduos.

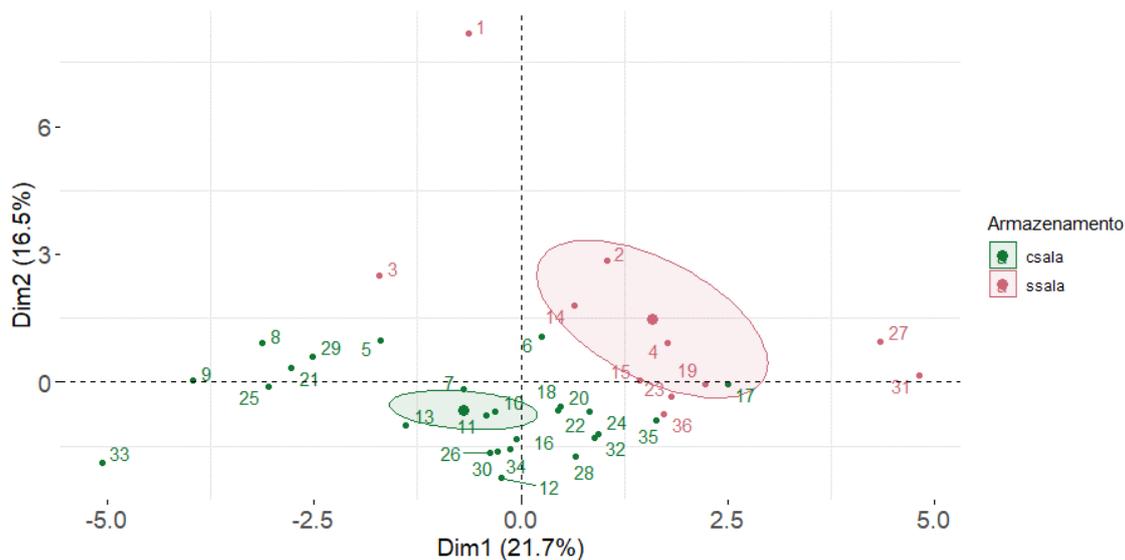
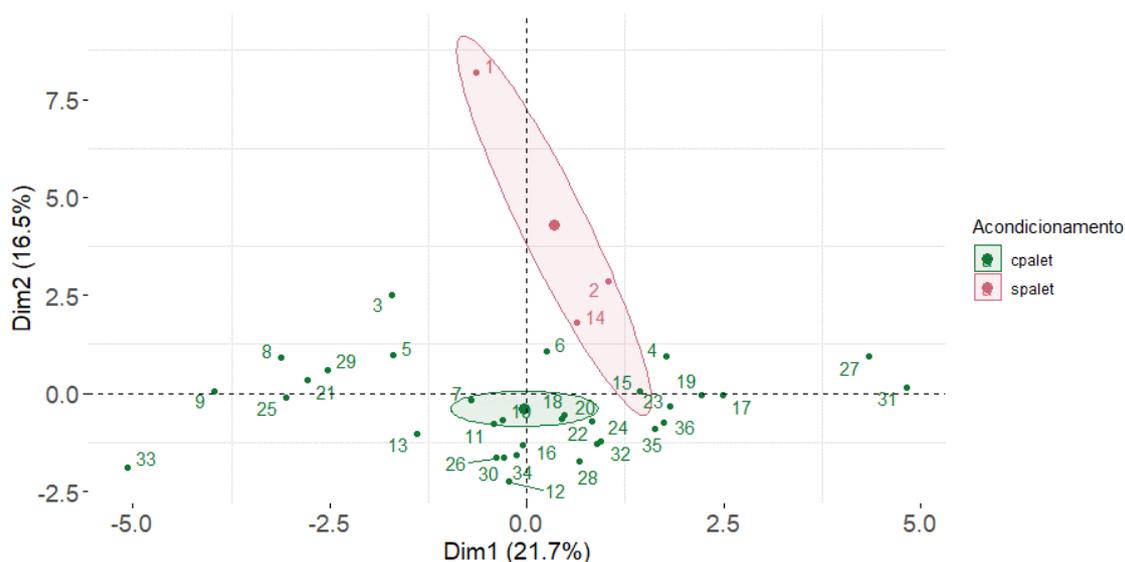


Figura 27 - Representação da influência do tipo de sala de armazenamento dos alimentos no agrupamento entre os indivíduos.



Em suma, a análise fatorial de dados mistos possibilitou concluir que houve maior prevalência de aflatoxinas nas coletas realizadas na primavera e verão e os alimentos concentrados apresentaram maior prevalência de aflatoxinas do que as silagens. Adicionalmente, nos concentrados totais

armazenados em salas fechadas, específicas para estocagem de alimentos e uso de estrados para acomodação dos insumos, houve menor contagem de bolores e leveduras.

Os resultados da análise fatorial de dados mistos indicaram que o tipo de alimento e a atividade de água influenciaram a presença de fungos do gênero *Aspergillus* e a presença de aflatoxinas, sendo que os alimentos concentrados apresentaram maior prevalência de aflatoxinas do que as silagens. Tais resultados estão de acordo com o indicado pela literatura de que alimentos como grãos são muito afetados pela presença de fungos toxigênicos.

A correlação direta demonstrada entre a ocorrência de aflatoxinas e a presença de fungos do gênero *Aspergillus* spp., *Aspergillus* seção *Flavi* nos alimentos era esperada e corrobora com a literatura, apesar de não ser obrigatória a presença dos fungos toxigênicos para que seja identificada ocorrência de micotoxinas na amostra (CAMPAGNOLLO *et al.*, 2016a; FERREIRA *et al.*, 2006).

De forma geral, a análise fatorial demonstrou que, no presente estudo, os locais de coleta não influenciaram de forma considerável os resultados obtidos. Fatores como o tipo de alimento e atividade de água, e a forma de acondicionamento influenciaram mais os resultados de presença de fungos, contagem total de bolores e leveduras e ocorrência de aflatoxinas, do que a propriedade em si. Além disso, o tipo de armazenagem dos alimentos esteve mais relacionado à contaminação de bolores e leveduras em geral do que a presença de *Aspergillus* ssp. e ocorrência de micotoxinas. Conclui-se que mesmo em boas condições de armazenagem, os alimentos podem conter fungos aflatoxigênicos e aflatoxinas. Dessa forma, ressalta-se a importância das boas práticas agrícolas, como por exemplo, o controle de insetos, uso de agentes antifúngicos e manutenção da integridade das sementes, limpeza, controle de umidade e temperatura durante a armazenagem para mitigação da contaminação por fungos aflatoxigênicos e aflatoxinas nos alimentos destinados a bovinos leiteiros (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003). No caso do sistema orgânico, não é permitido o uso de defensivos agrícolas convencionais; por isso, faz-se necessário o

desenvolvimento de práticas de controle fúngico passíveis de uso, de acordo com as premissas do sistema orgânico.

Embora a prevenção na agricultura seja a principal forma de prevenção das micotoxinas, tais mecanismos não garantem a ausência das aflatoxinas nos alimentos e conseqüentemente ausência de AFM₁ excretada no leite. Por isso, diversos autores têm estudado métodos químicos, físicos e biológicos com o intuito de eliminar, inativar ou reduzir a biodisponibilidade da AFB₁ nos alimentos (GONÇALVES *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Em razão das restrições impostas ao sistema orgânico, faz-se necessária a proposta de tais métodos que respeitem os fundamentos do sistema orgânico e possam ser utilizados no manejo nutricional das vacas de leite com o intuito de mitigar a contaminação por AFM₁ no leite e derivados orgânicos.

2.6 CONCLUSÃO

A microbiota nas amostras de alimentos das dietas destinadas à bovinos leiteiros em sistema orgânico de produção apresentou gêneros de fungos esperados como o *Aspergillus spp*, *Fusarium spp*, *Penicillium spp.*, sendo que houve alta prevalência de *Aspergillus spp* e *Aspergillus seção Flavi*, considerados potencialmente Aflatoxigênicos. A ocorrência de aflatoxinas nestes alimentos foi considerada baixa, porém a AFB₁ foi a mais prevalente com níveis acima do recomendado pela legislação brasileira em alimentos destinados ao consumo animal. A ocorrência de AFM₁ nas amostras de leite cru refrigerado também foi considerada baixa, porém também apresentando níveis acima do recomendado pela legislação brasileira para leite fluido e conseqüentemente acima das legislações internacionais. Em suma, conclui-se que há necessidade de controle e mitigação da presença de AFB₁ e AFM₁ no sistema orgânico de produção de leite.

3 CAPÍTULO II: COMPARAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE AFLATOXINA M₁ EM QUEIJOS ORIUNDOS DE SISTEMA DE PRODUÇÃO ORGÂNICO E CONVENCIONAL E ANÁLISE DE RISCO À EXPOSIÇÃO ALIMENTAR.

RESUMO

A aflatoxina M₁ (AFM₁) é um metabólito biotransformado encontrado no leite de vacas que ingeriram alimentos contaminados com Aflatoxina B₁, metabólito secundário potencialmente produzido por algumas espécies de fungos do gênero *Aspergillus*. O queijo pode ser considerado como a maior fonte de AFM₁ dentre os derivados lácteos na alimentação humana. A demanda mundial por produtos orgânicos demonstrou expressiva elevação nos últimos anos, devido à preocupação com a saúde, meio ambiente e bem estar animal. Os derivados lácteos apesar de menos expressivos nesse mercado, também estão incluídos na lista de consumo de orgânicos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de aflatoxina M₁ em diversos tipos de queijos comerciais produzidos em sistemas orgânicos e sistemas convencionais. Foram analisados 176 queijos comerciais de 17 tipos, sendo 84 produzidos em sistema de produção orgânica e 92 de produzidos em sistema convencional. A determinação de AFM₁ foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os resultados demonstram ocorrência de AFM₁ em 30,5% das 176 amostras analisadas. Os queijos de produção orgânica apresentaram 4.8% de amostras quantificáveis com valores entre 0.88 µg/ kg a 1.50 µg/ kg. Os queijos de produção convencional apresentaram 4.3% de amostras quantificáveis com valores entre 0.79 µg/ kg e 6.70 µg/ kg. Duas amostras de produção convencional apresentaram concentrações acima do limite de aflatoxina M₁ permitido para queijos na legislação brasileira. Não houve diferença estatística na ocorrência ($p=0,1780$) de AFM₁ e concentração ($p=0,1810$), entre os queijos produzidos nos sistemas orgânico e convencional, pelo teste Qui-quadrado e pela análise de variâncias pelo teste T, respectivamente. A ingestão diária provável média (IDPM) e o índice de risco (HI) de exposição dietética à AFM₁ foram 0,26 ng/kg /dia e 1,28 ng/kg /dia nas amostras de produção convencional, respectivamente, e 0,09 ng/kg/dia e 0,47 ng/kg/dia nas amostras de produção orgânica. Não houve diferença estatística no IDPM ($p=0,1729$) e no índice de risco (HI) ($p=0,1802$) de AFM₁ entre as amostras dos dois sistemas, pela análise

de variâncias pelo teste T, indicando que a probabilidade de exposição à AFM₁ pelo consumo desses produtos é semelhante. A comparação entre diversos tipos de queijos dos sistemas convencional e orgânico concluiu que a AFM₁ é um obstáculo para os sistemas de produção leiteira em geral e que o controle e a prevenção do AFM₁, bem como métodos de desintoxicação nos produtos finais são necessários. No caso dos produtos orgânicos, há necessidade de pesquisas para determinar quais métodos e produtos de desintoxicação seriam permitidos no sistema de produção.

Palavras – chaves: AFM₁, *Aspergillus spp*; Leite; HPLC

ABSTRACT

Aflatoxin M₁ (AFM₁) is a biotransformed metabolite found in the milk of cows that have ingested food contaminated with aflatoxin B₁, a secondary metabolite potentially produced by some species of fungi of the genus *Aspergillus*. Cheese is considered the largest source of AFM₁ among dairy products in the human diet. The worldwide demand for organic products has shown a significant increase in recent years, due to health, environmental and animal welfare concerns. Dairy products, although less expressive in this market, are also included in the list of organic consumption. Thus, the objective of this study was to evaluate the occurrence of aflatoxin M₁ in several types of commercial cheeses produced in organic and conventional systems. A total of 176 commercial cheeses of 17 types were analyzed, 84 of organic origin and 92 of conventional production origin. The determination of AFM₁ was performed by high performance liquid chromatography (HPLC). AFM₁ was detected in 30.5% of the samples analyzed, with 4.8% of the quantifiable AFM₁ in organic cheese samples presenting values between 0.88 µg/kg⁻¹ and 1.50 µg/kg⁻¹. On the other hand, 4.3% of quantifiable AFM₁ in conventional cheeses presented values between 0.79 µg/kg⁻¹ and 6.70 µg/kg⁻¹. Two samples of conventional production presented concentrations above the limit of aflatoxin M₁ allowed for cheeses in the Brazilian legislation. There was no statistical difference in the occurrence ($p=0.1780$) AFM₁ and concentration ($p=0.1810$), between of cheeses produced in organic and conventional systems, by Chi-square test and the average and by analysis of

variances by the T test, respectively. The estimated daily intake (EDI) and risk index (HI) of dietary exposure to AFM₁ were 0.26 ng/kg⁻¹/day and 1.28 ng/kg⁻¹/day in the conventional system samples, respectively, and 0.09 ng/kg⁻¹/day and 0.47 ng/kg⁻¹/day in organic system samples. There was no statistical difference in the EDI (p=0.1729) and hazard índice (HI) (p=0.1802) of AFM₁ between the samples of the two systems, by analysis of variances by the T test, indicating that the probability of exposure to AFM₁ by the consumption of these products is similar. The comparison between several types of cheeses from the conventional and organic systems concluded that AFM₁ is an obstacle to the dairy production systems in general and that the control and prevention of AFM₁, as well as detoxification methods in the final products are necessary. In the case of organic products, there is a need for research to determine which methods and detoxification products would be allowed in the production system.

Keywords: AFM₁, *Aspergillus spp*; Dairy; HPLC

3.1 INTRODUÇÃO

Se o leite cru estiver contaminado com AFM₁, provavelmente ela será encontrada nos produtos derivados, apesar de divergências na literatura quanto à influência das operações unitárias de processamento do leite nos níveis de AFM₁ dos derivados em relação aos níveis iniciais da matéria prima. A AFM₁ é indicada como relativamente resistente aos processos térmicos iniciais, como a pasteurização, devido às temperaturas altas de decomposição do contaminante em questão ser em torno de 237 °C a 306 °C (CAMPAGNOLLO *et al.*, 2016a; RUSTOM, 1997). A AFM₁ está associada às frações de caseína do leite, dessa forma, como no queijo esta proteína encontra-se concentrada, este derivado pode ser considerado de maior potencial contaminação por AFM₁ do que os demais derivados lácteos (ARDIC *et al.*, 2009; CAMPAGNOLLO *et al.*, 2016a). Tais evidências destacam a relevância da detecção da AFM₁ para a segurança alimentar dos consumidores de leite e seus derivados.

De acordo com Siqueira (2021), é ultrapassada a afirmação de que o consumo de leite e derivados no Brasil é inferior às recomendações, pois na verdade, não há recomendações específicas para o consumo de alimentos,

exceto frutas e vegetais, por dia para o Brasil, por parte da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da Food and Agricultural Organization (FAO). A Embrapa Gado de leite estimou que em 2018, considerando todos os derivados consumidos como “leite”, o consumo dos brasileiros foi em média, o correspondente a 455 ml por dia. Neste caso, de acordo com Siqueira (2021), o consumo brasileiro estaria superior ao recomendado pela FAO para países como a África do Sul, Argentina e Austrália.

Os hábitos de consumo alimentar vêm sofrendo modificações ao longo do tempo, gerando novos critérios de escolha dos produtos, fato demonstrado pela pesquisa realizada pelo Conselho Brasileiro da Produção Orgânica e Sustentável (Organis) em 2017, a qual afirma que, no Brasil, a saúde representa a principal motivação do consumo de produtos orgânicos. Dados por região do Brasil apontaram que a região sudeste opta pelos orgânicos pela busca de um sabor melhor. As questões ambientais são motivação para o consumo nas regiões centro oeste e sul (ORGANIS - MARKET ANALYSIS, 2017). O leite e derivados fazem parte da variedade de alimentos oriundo de sistemas orgânicos. Durante o período de pandemia do COVID-19 foi constatado aumento no consumo de produtos orgânicos em geral no país (ORGANIS, 2021).

Há poucos dados sobre a qualidade e a segurança dos alimentos orgânicos, assim como, em específico dos derivados lácteos produzidos a partir do leite oriundo do sistema de produção orgânico. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de aflatoxina M₁ em diversos tipos de queijos comerciais produzidos em sistemas orgânicos e sistemas convencionais.

3.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.2.1 Consumo de lácteos no Brasil

A Pesquisa de Orçamentos Familiares (2017-2018) (POF), conduzida pelo IBGE indicou que o consumo de laticínios no Brasil é estimado em média de 32.2 kg por ano, sendo os produtos mais consumidos o leite fluido, os queijos e os iogurtes. A muçarela é apresentada como o queijo mais preferido, seguido do queijo Minas e do requeijão. Devido à extensão territorial, o consumo varia de acordo com a região do país. A região Sul é a maior consumidora de leite e derivados, principalmente o leite fluido, e derivamos como queijo muçarela, queijo prato, creme de leite, iogurte, entre outros. A região nordeste se destaca

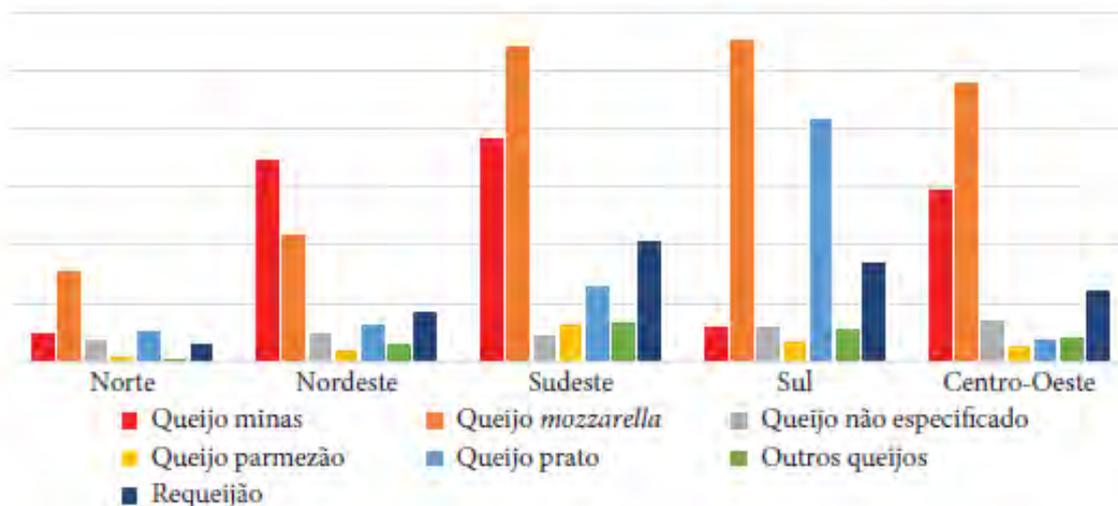
pelo consumo de leite em pó integral e a região nordeste pelo leite em pó desnatado. O Sudeste apresenta maior consumo de queijo parmesão, queijo prato e queijos finos e artesanais. A região centro-oeste se destaca pelo consumo de manteigas e queijos diversos (SIQUEIRA, 2021).

Mediante à disparidade financeira da população, a média salarial é um fator que afeta o consumo no país. Famílias com faixa de salários acima de R\$ 14.310,00 consomem, em média, aproximadamente 3 vezes mais leite e derivados do que na menor faixa, de até R\$ 1.908,00. Fatores como por exemplo, crenças, origens, culturas e ideologias também afetam o consumo, indicando que não há um perfil de consumidor e mercado de derivados único e bem definido no país (SIQUEIRA, 2021).

Os queijos são indicados como um dos lácteos mais consumidos no mundo, fato que também é verídico para o Brasil. A Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) do IBGE, afirma que o consumo de queijos no país só é ultrapassado pelo consumo do leite fluido. Os queijos mais mencionados pelos consumidores de forma geral foram o queijo muçarela, queijo minas, requeijão e queijo prato, nesta sequência. Em ordem de maior consumo de queijos em geral, está em primeiro lugar, a região sudeste, seguida da região sul, sendo a região norte a com menor consumo mencionada (SIQUEIRA; SCHETTINO, 2021).

Não há um tipo de queijo preferido no país, há no entanto preferências por região. O queijo Minas é indicado como o mais consumido, nesta ordem, nas regiões Sudeste, Nordeste e Centro oeste. A região Sul não se apresenta como apreciadora do queijo minas e se destaca por ser a maior consumidora de queijo prato do país. A região Centro oeste demonstra elevado consumo de queijo minas, muçarela e o menor consumo de queijo prato no Brasil. A **Figura 28** indica de forma mais detalhada as preferências essas preferências de consumo de queijo por região do Brasil. Em suma, (referência) conclui que há grande variedade de queijos com diversas características organolépticas que permitem a diversificação do consumo de queijos no Brasil (SIQUEIRA; SCHETTINO, 2021).

Figura 28 - Preferências essas preferências de consumo de queijo por região do Brasil de acordo com dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (2017-2018) do IBGE.



Fonte: SIQUEIRA, K. B.; SCHETTINO, J. P. J. O consumo de queijos pelos brasileiros. *Em: SIQUEIRA, K. B. Na era do consumidor: uma visão do mercado lácteo brasileiro*. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de leite, 2021. p. 53–55.

Dados sobre o consumo de lácteos de produção orgânica são escassos na literatura, inclusive, não foram mencionados dados de consumo ou aquisição específicos destes produtos pelo IBGE (2020).

3.2.2 Presença de aflatoxina M₁ em leite e queijos no Brasil

Jager et al (2013) estimou, por questionário com voluntários, um consumo no Brasil de 7313g por mês de leite fluido, 118g por mês de leite em pó e 1038g por mês de queijos em geral. Foram coletadas amostras destes lácteos nas residências dos participantes da pesquisa. As amostras apresentaram em média: 0,03 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ de AFM₁ para leite fluido 0,65 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, para leite em pó e 0,16 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ para queijos. Foi obtida uma provável ingestão diária de AFM₁ de 0,10 $\text{ng}/\text{kg}^{-1}/\text{pc}/\text{dia}^{-1}$ para leite fluido, 0,042 $\text{ng}/\text{kg}^{-1}/\text{pc}/\text{dia}^{-1}$, para leite em pó e 0,040 $\text{ng}/\text{kg}^{-1}/\text{pc}/\text{dia}^{-1}$ para queijos. O estudo concluiu que o leite fluido foi a principal fonte de AFM₁ na dieta dos avaliados e que as concentrações médias de AFM₁ encontradas estavam abaixo dos limites de tolerância brasileiros. Devido a isso, a provável ingestão diária de AFM₁ obtida no estudo foi baixa. Porém, se as concentrações obtidas fossem mais elevadas, a provável ingestão diária de AFM₁ seria superior devido ao alto consumo do leite fluido.

De acordo com Magalhães e Sola (2021), níveis de AFM₁ entre 0.06 a 6.6 ug/Kg foram quantificadas em amostras de queijos no Brasil. Trombete et al (2014) identificaram AFM₁ em 60% das amostras de queijo parmesão ralado e média de AFM₁ de 0.16 µg/Kg⁻¹. Os autores concluíram que os níveis de AFM₁ nos queijos ralados consumidos no estado do Rio de Janeiro foram relativamente altos e podem representar um risco potencial para a saúde pública. Gonçalves et al (2018) concluíram que há um elevado risco de exposição humana a AFM₁ e AFB₁ no sul do Brasil, devido à alta consumo de leite e tempo de exposição prolongado. Silva et al (2023) analisaram queijos artesanais e industriais no estado de Pernambuco e obtiveram que 100% das amostras apresentaram níveis detectáveis de AFM₁, com concentrações variando de 0,026 a 0,132 µg/kg⁻¹. Apesar de nenhuma das amostras de queijo ter excedido o limite de 2,5 µg/kg⁻¹ estabelecidos para AFM₁ em queijos no Brasil, os autores ressaltam a necessidade de medidas rigorosas de controle para prevenir esta aflatoxina no leite.

3.2.3 Aflatoxina M1 na produção de queijos

Um das principais causas da presença de AFM₁ nos queijos é o uso de leite contaminado com esta aflatoxina como matéria prima para fabricação do produto. Os níveis de AFM₁ no leite podem ser afetados nas etapas iniciais de processamento, como nos processos de pré-processamento e nos tratamentos térmicos realizados. No queijo, os níveis de AFM₁ no produto final podem ser afetados por fatores como, por exemplo, o tipo de queijo a ser fabricado, as estratégias tecnológicas adotadas neste processo. Podem influenciar durante o processamento, a quantidade de água removida, o pH da salmoura saturada, o tamanho do corte, a temperatura de coagulação, o tempo de prensagem, e por fim, o grau de contaminação e diferenças na qualidade do leite, ou seja, da matéria prima. Há grande variedade de operações unitária de processamento entre os diversos tipos de queijo, dessa forma, a literatura aborda a influência destas operações no destino da AFM₁ no produto final (CAMPAGNOLLO et al., 2016).

De acordo com Campagnollo et al (2016) a literatura relata níveis de AFM₁ mais elevados no queijo em relação ao leite inicial e este fato é relacionado pelos autores à conhecida afinidade desta toxina com as micelas de caseína do leite.

A literatura é divergente quanto a transferência de AFM₁ entre o leite da matéria prima e o queijo, produto final. Fernandes et al (2012) relatou variação de 30,6% a 42,3% na transferência de AFM₁ do leite para o queijo Minas frescal. López, et al (2001) identificaram redução de 60% do leite para o queijo e 40% do leite para o soro. Colak (2007) encontrou 57,1% de redução do leite para o queijo branco turco e 55,4% do leite para o soro. Os efeitos nos níveis de AFM₁ causados pelos processos de coagulação e drenagem do soro, salga, amadurecimento e até estocagem são estudados por diversos autores, assim como diferenças nos níveis de AFM₁ encontrados nos diferentes tipos de queijo (CAMPAGNOLLO et al., 2016).

3.3 OBJETIVOS

3.3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência de aflatoxina M₁ em diversos tipos de queijos comerciais produzidos em sistemas orgânicos e sistemas convencionais.

3.3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- a) Comparar a ocorrência de aflatoxina M₁ em diferentes tipos de queijos entre os sistemas de produção;
- b) Avaliar o risco à exposição alimentar pelo consumo dos de M₁ presente nos queijos avaliados;

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Amostragem dos queijos comerciais

As amostras de queijos foram adquiridas em estabelecimentos comerciais de diversos locais do estado de São Paulo, entre os anos de 2019 e 2022, efetuando-se o registro dos tipos de queijo, marcas, lotes e datas de fabricação. Foram analisadas 176 amostras, sendo 92 convencionais e 84 orgânicas. As amostras convencionais foram constituídas pelos queijos dos seguintes tipos: Frescal ultrafiltrados, Minas frescal, Minas padrão, Minas padrão artesanal, Muçarela, Muçarela de búfala, tipo brie, tipo prato, parmesão, provolone, gorgonzola, tipo gouda, tipo camembert, saint paulin e coalho, englobando 50 marcas diferentes. As amostras de queijos orgânicos foram constituídas pelos queijos dos seguintes tipos: Minas frescal, Minas padrão, Minas frescal de búfala,

muçarela, muçarela de búfala, provolone e meia cura, englobando 5 marcas distintas.

As amostras de queijos foram acondicionadas em caixas isotérmicas, com gelo se necessário, e transportadas para o Laboratório Multiusuário de Microbiologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP em Pirassununga/SP para as análises. As amostras foram retiradas das embalagens originais de maneira asséptica e pesou-se uma alíquota de 10 g para análise de AFM₁ (FERNANDES *et al.*, 2012b).

3.4.2 Determinação de aflatoxina M₁ em queijos

Para a determinação de AFM₁ nas amostras de queijos, padronizou-se o método IV.

3.4.2.1 Padrões e solventes

O padrão de AFM₁ e os solventes foram os mesmos indicados para o método III (**cap. I, seção 2.4.4.4.1; Pág. 61**) e utilizados da mesma forma.

3.4.2.2 Curva de calibração e tempo de retenção

A curva de calibração e o tempo de retenção foram os mesmos obtidos para o método III (**cap. I, seção 2.4.4.4.2; Pág. 61 e 62**).

3.4.2.3 Limites do método

Os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ) foram determinados a partir do preparo das soluções padrões de aflatoxinas (Sigma-Aldrich 0,5 µg/mL M₁ em acetonitrila), até atingir a menor concentração detectada e quantificada de aflatoxinas nas amostras de queijo (CASSIANO *et al.*, 2009).

O resultado para o limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) estão dispostos na **Tabela 31**.

Tabela 31 - Limite de Detecção e Limite de Quantificação de amostras de queijo.

Limites	AFM ₁ µg/kg
LOD	0,07
LOQ	0,7

LOD: Limite de Detecção e LOQ: Limite de Quantificação.

Fonte: Própria autoria.

3.4.2.4 Descrição do método analítico - Determinação de aflatoxina M1 em queijos (Método IV)

A determinação de aflatoxina M₁ nas amostras de queijo foi efetuada utilizando colunas de imunoafinidade AFM₁ HPLC® (Vicom, Watertown, EUA). A metodologia foi realizada de acordo com VICAM (2018) e Lee et al., (2009), com modificações, conforme descrito resumidamente a seguir.

Pesaram-se 10 g da amostra de queijo em um béquer e adicionou-se um volume de 50 mL de acetonitrila:água (60:40, v/v), homogeneizando com o auxílio de um *mixer* durante 3 minutos. A mistura foi transferida para um tubo de 50mL, centrifugada a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante filtrado em papel filtro. Foram adicionados 10 mL de solução de tampão fosfato 0,01 M em um tubo cônico de 15 mL e acrescidos 2 mL da amostra filtrada.

A solução foi passada através da coluna de imunoafinidade AFM₁ HPLC® (Vicom, Watertown, EUA) com fluxo de 1-2 gotas/s. Em seguida, a coluna foi lavada com 10 mL de solução de tampão fosfato 0,01 M e posteriormente com 3 mL de água ultrapura. A eluição da micotoxina foi realizada com a passagem de 750 µL de metanol-acetonitrila (2:3, v/v) e depois com 750 µL de água ultrapura pela coluna de imunoafinidade. O eluato foi recolhido em um vial de 2 mL e evaporado até a secura sob fluxo de N₂. Para análise as amostras foram ressuspensas em 1mL de ACN:H₂O (2:8, v/v) e 50µL injetados no sistema CLAE.

3.4.2.5 Desempenho do método

Para a avaliação do desempenho do método analítico realizaram-se ensaios de recuperação nas amostras de queijo, contaminadas artificialmente com AFM₁ nas concentrações de 0,5, 1 e 3 µg de AF/kg. As amostras foram preparadas em triplicata para cada concentração do composto, seguindo o

método IV (**cap. II, seção 2.4.4.4.5; pág. 63 e 64**), e injetadas no sistema CLAE para obtenção de percentuais de recuperação e coeficiente de variação. A AFM₁ foi incluída no conteúdo filtrado, após a etapa de extração com solvente e centrifugação, antes da passagem na coluna de imunoafinidade.

A recuperação média para os três níveis (0,5; 1,0 e 3,0 µg de AFM₁/kg) de AFM₁ no queijo foi de 88,93% para AFM₁. Os níveis e porcentagens obtidas estão dispostos na **Tabela 32**.

Tabela 32 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxina M₁ em amostras de queijo.

AFM ₁ adicionada (µg/kg)	AFM ₁ observada (µg/kg)	AFM ₁ média (µg/kg)	Recuperação média (%)	CV (%)
0,5	0,57	0,514	102,8	12,61
	0,529			
	0,433			
1	0,831	0,884	88,38	5,64
	0,93			
	0,89			
3	2,453	2,269	75,62	12,7
	1,938			
	2,435			

CV: coeficiente de variação.

Fonte: Própria autoria.

Os percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos apresentaram-se dentro das faixas recomendadas, respectivamente, pela União Europeia (CE 401/2006) (UNIAO EUROPEIA, 2006) e pelo MAPA (BRASIL, 2011d).

3.4.2.6 Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O sistema cromatográfico e a fase móvel foram os mesmos utilizados para os métodos I, II e III, descritos na **seção 2.4.4.5, cap. I (pág. 64 e 65)**.

3.4.3 Avaliação de risco à saúde

3.4.3.1 Cálculo da ingestão diária provável média - IDPM

A avaliação da exposição alimentar à aflatoxina M₁ foi realizada de acordo com indicações da FAO (2014) para estimativa de exposição alimentar a contaminantes, a qual é baseada em dados de consumo alimentar, concentração do contaminante no alimento e peso corporal médio da população. A equação utilizada está representada a seguir eq. (1).

$$IDPM (ng/kg/dia) = \frac{\text{média AFM}_1 (ng/g) \times \text{Consumo médio (g/dia)}}{\text{Peso médio adulto (kg)}} \quad (1)$$

A concentração de AFM₁ foi considerada como a média dos valores obtidos em HPLC nas amostras com níveis quantificáveis. Para o consumo médio de queijo utilizou-se a indicação de 5,8 g /dia, de queijos em geral, da Pesquisa de Orçamentos Familiares (2017-2018), conduzida pelo IBGE (2020). E o peso médio adulto do consumidor foi considerado como 70 Kg, de acordo com EPA (1989) e Mohammadi, et al (2022).

3.4.3.2 Estimativa do índice de risco (Hazard Index -HI)

A razão entre a IDPM e a ingestão média tolerável (TDI) resulta na estimativa do índice de risco (HI), a qual é baseado nos estudos de Kuiper-Goodman T. (1990a), que obtiveram uma ingestão média tolerável (TDI) para AFM₁ de 0,2 ng/kg peso corporal /dia. Desta forma, a equação (2) utilizada no presente estudo para estimar o índice de risco da exposição à AFM₁ está disposta a seguir.

$$HI = \frac{IDPM (ng/kg/dia)}{TDI (ng/kg)} \quad (2)$$

Sendo, o IDPM calculado com base na equação anterior e o TDI igual a 0,2ng/kg. O HI inferior a 1 é aceitável, e superior a 1 indica alto risco de desenvolvimento de câncer de fígado (HASNINIA *et al.*, 2022; KUIPER-GOODMAN T., 1990a; MOHAMMADI *et al.*, 2022; SHAHBAZI; NIKOUSEFAT; KARAMI, 2017; SKRBIC *et al.*, 2014a).

3.5 Análise estatística

Os tipos de queijo e os sistemas de produção (orgânico e convencional) foram comparados por meio de análise estatística de variáveis categóricas (frequências), por meio do teste Qui-quadrado, utilizando o procedimento FREQ da SAS (SAS 9.4, 2015), com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Para a comparação entre a concentração média de AFM₁, ingestão diária provável média (IDPM) e Índice de risco (IH) entre os queijos de ambos os sistemas de produção, os dados foram avaliados quanto aos pressupostos estatísticos de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias pelos testes de Shapiro-wilk e Levene, respectivamente. Posteriormente, a análise de variância dos dados foi realizada pelo programa SAS (2015) e a comparação das variâncias pelo Teste F. Todas as análises foram realizadas com significância de 5% ($p < 0,05$).

3.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.6.1 Determinação de aflatoxina M₁ em amostras de diversos tipos de queijos orgânicos e convencionais

Nas amostras oriundas de sistema de produção orgânico, foi possível a quantificação de AFM₁ em 4 amostras, uma em cada um dos tipos, minas frescal, minas padrão, muçarela e provolone. Houve detecção de níveis traços nos tipos: minas frescal, minas padrão, e muçarela. Nas amostras oriundas de sistema de produção convencional, três amostras foram quantificáveis em queijos do tipo minas frescal e uma no tipo Camembert. Níveis traços foram detectados nos tipos: minas frescal, minas padrão, e muçarela, parmesão, prato e gouda (**Tabela 33**).

Tabela 33 - Número de amostras por nível de Aflatoxina M1 em cada tipo queijo, oriundos de sistema de produção orgânico e convencional.

Tipos de queijos	Orgânico				Convencional			
	(n)**	ND	Traços	≥ LOQ	(n)**	ND	Traços	≥ LOQ
Minas frescal*	32	29	2	1	57	50	4	3
Minas padrão	10	8	1	1	7	6	1	0
Muçarela*	35	27	7	1	9	8	1	0
Provolone	3	2	0	1	4	4	0	0
Meia cura	4	4	0	0	1	1	0	0
Parmesão	0	-	-	-	2	1	1	0
Gorgonzola	0	-	-	-	3	3	0	0
Prato	0	-	-	-	2	1	1	0
Coalho	0	-	-	-	1	1	0	0
Ricota	0	-	-	-	1	1	0	0
Tipo Camembert	0	-	-	-	1	0	0	1
Saint paulin	0	-	-	-	1	1	0	0
Tipo Gouda	0	-	-	-	2	1	1	0
Tipo Brie	0	-	-	-	1	1	0	0
(n) Total	84	70	10	4	92	79	9	4

* Considerando leite de bovinos e bubalinos. ** n = número de amostras por tipo de queijo.

Resultados indicados com “-” demonstram que o tipo de queijo não foi analisado para o sistema em questão.

ND: não detectado; LOD: limite de detecção = 0,07 µg/ kg⁻¹; LOQ: Limite de Quantificação = 0,7 µg/ kg⁻¹; Traços: valores entre o LOD e LOQ.

≥LOQ: amostras de níveis quantificáveis.

Fonte: Própria autoria.

AFM₁ foi detectada em 11,11% das amostras de queijo fresco, sendo 4,44% com níveis quantificáveis e 6,66% com níveis traços, enquanto AFM₁ não foi detectada na maioria das amostras (88,88%). Quando avaliados os demais queijos maturados, a detecção de AFM₁ foi maior (19,77%) sendo 4,65% com níveis quantificáveis. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa (p=0,1919) quando comparados queijos *in natura* e outros tipos, o que indica que as concentrações de AFM₁ obtidas foram independentes do tipo de queijo avaliado (**Tabela 34**).

Tabela 34 - Comparação dos níveis de Aflatoxina M1 entre queijos do tipo frescal e os demais tipos analisados.

Amostras	Tipos de queijos		níveis	p
	Fresco	Demais tipos		
ND (<LOD)	88,8% (80)	80,23% (69)	<0,07	0.1919
Traços (entre LOD e LOQ)	6,66% (6)	15,12% (13)	0,07-0,7	
Níveis quantificáveis (≥LOQ)	4,44% (4)	4,65% (4)	≥0,7	
Positivos (≥LOD)	11,11% (10)	19,77% (17)	≥0,07	
Total de amostras	90	86		

ND: não detectado; LOD: limite de detecção = 0,07 µg/ kg⁻¹; LOQ: Limite de Quantificação = 0,7 µg/ kg⁻¹; Traços: valores entre o LOD e LOQ.

Fonte: Própria autoria.

Os queijos são fabricados no mundo utilizando diversas etapas distintas de processamento. Há divergência da literatura sobre a influência de cada operação de processamento, porém o efeito de etapas como a coagulação e drenagem do soro são estudados por diversos autores (CAMPAGNOLLO *et al.*, 2016a). Fernandes *et al.* (2012b) avaliou a transferência de AFM₁ do leite para o produto final (queijo minas frescal), durante o processamento, e obteve valores de 30,6% a 42,3%. Khaneghah *et al.* (2021) obtiveram que os queijos frescos apresentaram maiores níveis e maior prevalência de AFM₁ em comparação a queijos não frescos, queijos macios, semi-macios, semi-firmes e firmes. Dessa forma, a ausência de diferença estatística entre a ocorrência de AFM₁ em queijos de diferentes tipos de processamento, neste estudo, pode estar relacionada com a baixa quantidade de amostras positivas para AFM₁ em cada um dos tipos analisados. A ocorrência de aflatoxina AFM₁ nas amostras de queijos não demonstrou relação com o queijo ser do tipo frescal ou dos demais tipos, independentemente do sistema de produção (orgânico ou convencional).

Foi observada a ocorrência de AFM₁ em 30,5% das 176 amostras analisadas. Das 84 amostras produzidas em sistema orgânico, foram detectadas 16,4% de amostras positivas, sendo 11,9% com níveis considerados “traços” e 4,8% com níveis quantificáveis (**Tabela 35**), entre 0,88 µg/kg⁻¹ a 1,50 µg/ kg⁻¹ e média de 1,14 µg/ kg⁻¹ (**Tabela 36**). Das 92 amostras produzidas em sistema

convencional, foram detectadas 14,1% amostras positivas, sendo 9,8% com níveis considerados traços e 4,3% com níveis quantificáveis (**Tabela 35**), entre 0,79 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ a 6,70 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, e média de 3,10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (**Tabela 36**).

Duas amostras de queijos de produção convencional apresentaram concentrações de 2,78 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ e 6,7 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, acima do limite permitido para queijos de acordo com a IN 88/ 2021 da ANVISA ($\leq 2,5 \mu\text{g}/\text{kg}$) (BRASIL,2021b). Não houve diferença estatística ($p=0,1780$) na ocorrência de AFM₁ entre os queijos de ambos os sistemas de produção (**Tabela 35**).

Tabela 35 - Comparação dos níveis de Aflatoxina M1 entre amostras de queijos oriundas de sistema de produção orgânico e convencional.

Amostras	Sistema de produção		níveis	p
	Orgânico	Convencional		
ND (<LOD)	83,3% (70)	85,9% (79)	<0,07	
Traços (entre LOD e LOQ)	11,9 (10)	9,8% (9)	0,07-0,7	0,1780
Níveis quantificáveis (>LOQ)	4,5% (4)	4,3% (4)	$\geq 0,7$	
Positivos (\geq LOD)	16,4% (14)	14,1% (13)	$\geq 0,07$	
Total de amostras	84	92		

ND: não detectado; LOD: limite de detecção = 0,07 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$; LOQ: Limite de Quantificação = 0,7 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$; Traços: valores entre o LOD e LOQ.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 36 - Níveis de Aflatoxina M1 em cada um dos tipos de queijos oriundos de sistema de produção orgânico e convencional.

Concentração (ng/g)	Sistema de produção	
	Orgânico	Convencional
Mínimo	0,88	0,79
Máximo	1,50	6,70
Média	1,14	3,10
Total de amostras (\geq LOQ)	4 (84)	4 (92)

LOD: limite de detecção = 0,07 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$

Fonte: Própria autoria.

No Brasil, os limites de AFM₁ em alimentos são baseados na Instrução Normativa 88 de 2021 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A legislação considera 0,5 µg/kg AFM₁ para leite fluido, 2,5 µg/kg em queijos e 5 µg/kg para leite em pó. Apesar dos produtos de ambos os sistemas de produção apresentarem somente quatro amostras quantificáveis cada um, pelo menos duas amostras de queijos de produção convencional apresentaram concentrações acima do limite brasileiro permitido para queijos. Se houver foco no comércio mundial desses produtos, todas as amostras quantificáveis de ambos os sistemas de produção estariam fora dos limites permitidos para os EUA (0,5 µg/kg AFM₁ em produtos lácteos em geral) (US FDA, 1996) ou para os países da UE (0,05 µg/kg AFM₁ para leite cru, leite tratado termicamente e qualquer leite usado para produção de leite) (CAMPAGNOLLO et al., 2016; REGULAMENTO (CE) Nº 466/2001, 2001; MURPHY et al., 2006).

3.6.2 Análise de risco à saúde

A concentração obtida nas amostras produzidas em sistema convencional gerou um IDPM de 0,26 ng/kg/dia, resultando em um HI acima de 1 (HI=1,29). Para as amostras produzidas em sistema orgânico o IDPM foi de 0,09 ng/kg/dia, com índice de HI menor que 1 (**Tabela 37**).

Não houve diferença estatística entre a concentração média de AFM₁ das amostras oriundas dos dois sistemas de produção (p=0,1810). Consequentemente, também não houve diferença significativa entre o IDPM (p=0,1729) e o IH (p=0,1802) das amostras de ambos os sistemas, pela análise de variâncias pelo teste T (p<0,05). No entanto, as concentrações das amostras de queijos do sistema de produção convencional apresentaram índice de risco superior a 1 devido às concentrações mais elevadas do que as amostras de produção orgânica.

Tabela 37. Índices calculados para avaliação do risco à saúde pela exposição alimentar à aflatoxina M₁, em queijos oriundos de sistemas de produção convencionais e orgânicos.

Índices alculados	Sistema de produção		
	Orgânico	Convencional	<i>p</i>
Concentração de AFM ₁ média (ng/g)	1.14	3.10	0.1810
IDPM (µg/kg/dia)	0.09	0.26	0.1729
Índice de risco (HI)	0.47	1.29	0.1802
Total de amostras consideradas	4	4	

Fonte: Própria autoria.

Khaneghah et al. (2021) obtiveram uma média de 13 µg/ kg⁻¹ de AFM₁ em queijos diversos de leite de vaca, em meta-análise conduzida a partir de revisão bibliográfica sistêmica, utilizando dados de concentração e prevalência de AFM₁ em queijos, oriundas de 350 estudos relevantes na literatura, e um universo amostral de 15.205 amostras. Tais concentrações também apresentaram-se muito acima dos limites recomendados mundialmente e corrobora com os resultados obtidos neste estudo.

O estudo detectou um índice superior a 1 (HI=1,28) amostras convencionais, quando se assume que há um risco acentuado de câncer de fígado pela exposição alimentar à AFM₁ de acordo com (KUIPER-GOODMAN T., 1990; SKRBIC et al., 2014). Isso evidencia a necessidade de um controle mais rigoroso da segurança dos alimentos em relação aos níveis de AFM₁ no país. Shahbazi et al. (2017) relataram elevada ocorrência de AFM₁, porém obtiveram valores de IDPM inferiores ao presente estudo, e conseqüentemente um índice de risco inferior a 1, constatando um baixo risco de exposição à AFM₁ pela ingestão de queijos tradicionais iranianos. Em meta-análise conduzida a partir de 57 estudos e um total de 6.410 amostras de diversos tipos de queijos, oriundos de seis país da Ásia, Turquia, Irã, Líbano, Paquistão e Kuwait, Mohammadi et al. (2022) obtiveram que 59,02% das amostras estavam contaminadas com AFM₁ e a concentração média de AFM₁ foi 133,27 ng/kg⁻¹ (0,133 µg/kg⁻¹). Para o cálculo do índice de risco, os autores consideraram 10kg por ano, por pessoa e também obtiveram um risco de exposição inferior a 1. Tanto Shahbazi et al. (2017) quanto Mohammadi et al. (2022) consideraram um

consumo de queijos superior ao utilizado neste estudo e ainda assim obtiveram um índice de risco (HI) inferior a 1 devido aos menores níveis de AFM₁ em suas amostras. Este fato reforça a importância da mitigação dos níveis de AFM₁ em queijos para reduzir o risco à saúde dos consumidores.

Embora o HI das amostras de produção convencional seja superior a 1, o presente estudo não detectou diferenças significativas entre a ocorrência de AFM₁ nos queijos convencionais e orgânicos, indicando que, apesar das distinções no manejo base da produção do leite, a probabilidade do consumidor adquirir um destes produtos de ambos os sistemas, com presença de AFM₁, seria semelhante. Ou seja, a ocorrência de aflatoxina AFM₁ na produção de leite e derivados pode ser um entrave comum a ambos os sistemas, não garantindo que os alimentos orgânicos oferecem uma maior segurança dos alimentos em relação a esta toxina. Há necessidade de rigor no controle da alimentação dos animais, nas boas práticas de produção de leite, e processamento e estocagem dos derivados, com o intuito de minimizar a contaminação por AFM₁ nos queijos na produção de leite de forma geral.

Os estudos dos níveis de contaminação dos produtos são necessários devido ao aumento no consumo de produtos orgânicos, principalmente depois do período de pandemia do COVID-19, devido à preocupação com a saúde e a busca por produtos mais saudáveis serem os principais motivos pela escolha dos produtos orgânicos. Há expectativas de que o crescimento observado no mercado de produtos orgânicos continue pelos próximos anos. Durante a pandemia de COVID-19, os dados apontaram aumento no consumo de produtos orgânicos de forma geral no mundo. Constatou-se uma mudança de hábitos alimentares e estratégias de compras devido à pandemia. Os deslocamentos aos supermercados foram menos frequentes, ocorreu maior frequência de compras online e em mercados locais, como feiras, por exemplo. Além disso, a saúde, bem-estar e prevenção de doenças foram indicadas como as principais preocupações dos consumidores em geral, durante este período. Apesar de, em alguns países da Europa, os motivos pela escolha do consumo de orgânicos sejam as questões ambientais e o bem-estar animal, e nos EUA a escolha ocorrer principalmente para evitar alimentos transgênicos, parte significativa dos adeptos ao consumo de orgânicos associa tais produtos a alimentos mais saudáveis e relacionados à saúde e ao bem-estar (SAHOTA, 2022).

No Brasil, as pesquisas de consumo da Associação de promoção dos orgânicos – Organis, indicaram que, em 2021, 47% dos entrevistados alegaram consumir alimentos orgânicos por preocupação com a saúde, 26% acreditam ser um produto mais saudável, 13% consomem por serem produtos que não contém agrotóxicos, e 24% pela crença na melhor qualidade do produto. Sobre a frequência de consumo, em 2021, 34% dos entrevistados alegaram consumir orgânicos duas vezes na semana e 27% mais de cinco vezes na semana (ORGANIS, 2021b). De acordo com a pesquisa de 2021, 66% dos consumidores responderam manter o consumo destes alimentos durante a pandemia e 23% relataram aumentar. Desta forma, é possível constatar que o consumo de orgânicos no Brasil segue a tendência mundial e a preocupação com a qualidade dos alimentos e percepção do produto também requer atenção.

Os autores ressaltam a necessidade de mais estudos acerca dos produtos orgânicos para auxiliar na formação da identidade do produto orgânico, bem como informar à sociedade, de maneira clara e embasada cientificamente, quais são seus reais benefícios sociais, ambientais e na saúde e nutrição. Além disso, somente as boas práticas de colheita, processamento e estocagem dos alimentos destinados à bovinocultura leiteira não garantem a prevenção total de micotoxinas nestas culturas (DI GREGORIO *et al.*, 2014). Consequentemente, as boas práticas não eliminam o risco de AFM₁ no leite e derivados, dessa forma, faz-se necessário o uso de métodos de detoxificação desta toxina, tanto na alimentação dos animais, quanto no produto final.

Os métodos de detoxificação de micotoxinas atuam na destruição, remoção ou formação de compostos de toxicidade reduzida, sem prejudicar as características físicas, organolépticas e nutricionais dos alimentos. Tais métodos podem ser físicos, químicos ou biológicos (JARD *et al.*, 2011; MUHIALDIN; SAARI; MEOR HUSSIN, 2020). Devido às restrições da produção de alimentos orgânicos, mais estudos são necessários para definir quais destes métodos de detoxificação, poderão ser pesquisados e utilizados no manejo e nos produtos finais deste sistema.

3.7 CONCLUSÃO

A ocorrência de AFM₁ nos diferentes tipos de queijo foi semelhante entre os sistemas de produção, orgânico e convencional. Conclui-se que os queijos

oriundos de ambos os sistemas podem expor os consumidores aos mesmos cenários de risco pela presença de AFM₁, apesar das distintas normas de produção específicas e o estigma de que os alimentos orgânicos são mais “saudáveis”.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dois estudos realizados demonstraram que a AFM₁ é um obstáculo para o sistema de produção de leite e derivados de forma geral e há necessidade de mitigação da presença de AFM₁ em leite e derivados de forma geral. Devido às restrições inerentes ao manejo da produção de alimentos orgânicos, são necessários estudos com o intuito de investigar quais métodos de detoxificação de AFM₁ serão permitidos para uso diretamente nos alimentos destinados às vacas, e quais serão permitidos para uso no produto final. Há necessidade de estudos futuros focados em definir melhor a identidade dos alimentos orgânicos, para identificar e informar ao consumidor em quais aspectos a escolha por destes alimentos na composição de suas dietas realmente promovem diferenciais.

REFERÊNCIAS

- ARDIC, M.; KARAKAYA, Y.; ATASEVER, M.; ADIGUZEL, G. Aflatoxin M1 levels of Turkish white brined cheese. **Food Control**, v. 20, n. 3, p. 196–199, 2009.
- BIEHL, M. L.; BUCK, W. B. Chemical contaminants: Their metabolism and their residues. **J. Food Protect.**, v. 50, n. 12, p. 1058–1073, 1987.
- BRASIL, Ministério da Agricultura. Portaria MA/SNAD/SFA No. 07, de 09 de novembro de 1988. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 09 nov.1988 - Seção I, página 21.968, 1988.
- BRASIL, Lei Nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Legislativo, Brasília, DF, 24 dez. 2003. Seção 1, p. 8. 2003.
- BRASIL, Decreto Nº 6.323, de 27 de dezembro de 2007. Regulamenta a Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 dez. 2007.
- BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 46, de 6 de outubro de 2011. Estabelece o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção, bem como as listas de substâncias e práticas permitidas para uso nos Sistemas Orgânicos de Produção. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 06 out. 2011, 2011a.
- BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 37, DE 2 DE AGOSTO DE 2011. Estabelecer o Regulamento Técnico para a Produção de Cogumelos Comestíveis em Sistemas Orgânicos de Produção, na forma da presente Instrução Normativa. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Brasil, 2011b.
- BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 38, DE 2 DE AGOSTO DE 2011. Estabelecer o Regulamento Técnico para a Produção de Sementes e Mudanças em Sistemas Orgânicos de Produção, na forma da presente Instrução Normativa. Brasil, 2011c.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de Garantia da Qualidade Analítica**. 1ª ed, Brasília, DF: MAPA, 2011d.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento. Instrução normativa nº 18, de 20 de junho de 2014. Institui o selo único oficial do Sistema brasileiro de avaliação da conformidade orgânica, e estabelece os requisitos para a sua utilização. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 jun. 2014.
- BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 52, de 15 de março de 2021. Estabelece o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção e as listas de substâncias e práticas para o uso nos Sistemas Orgânicos de Produção. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo,

Brasília, DF, 15 mar de 2021. 2021a.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Instrução normativa nº88, de 26 de março de 2021. Estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2021, 2021b.

UNIÃO EUROPÉIA. Regulamento (CE) nº 401/2006 da Comissão de 23 de fevereiro de 2006. Estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controle oficial dos teores de micotoxinas nos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Européia**, Luxemburgo, p.70/12-70/34, 2006. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R0401&from=ro>

CAMPAGNOLLO, F. B. ; GANEV, K. C. ; KHANEGHAH, A. M. ; PORTELA, J. B. ; CRUZ, A. G. ; GRANATO, D. ; CORASSIN, C. H. ; OLIVEIRA, C. A. F. ; ; SANT'ANA, A. S. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: a review. **Food Control**, v. 68, p. 310–329, 2016.

CARVALHO, G. R.; ROCHA, D. T. Recuos na oferta e demanda: a trajetória do leite em 2021. *Em: RENTERO, N. Anuário leite 2022*. [s.l.] Embrapa Gado de Leite, 2022a. p. 8–9.

CARVALHO, G. R.; ROCHA, D. T. Cai a produção de leite inspecionado em 2021 e a região Sul é destaque. *Em: Anuário leite 2022*. [s.l.: s.n.]p. 10–11.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; REGINA, L.; MARTINS, R.; VINCENZI, R.; CASS, Q. B.; QUÍMICA, D. De; FEDERAL, U.; CARLOS, D. S.; SP, S. C. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Quim. Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021–1030, 2009.

COLAK, H. Determination of aflatoxin M1 levels in Turkish White and Kashar cheeses made of experimentally contaminated raw milk. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 15, n. 2, p. 163–168, jun. 2007.

COSTA, R. V. da; QUEIROZ, V. A. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D. da; LANZA, F. E.; ZAMBOLIM, L.; FIGUEIREDO, J. E. F. **Prevalência de Espécies de Fusarium Produtoras de Fumonisinhas Associadas a Grãos de Milho no Brasil**. 1. ed. Sete lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2014. 1–59 p.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems**. Ames, Iowa, USA: Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 2003. 217 p.

DI GREGORIO, M. C.; NEEFF, D. V. De; JAGER, A. V.; CORASSIN, C. H.; CARÃO, Á. C. D. P.; ALBUQUERQUE, R. De; AZEVEDO, A. C. De; OLIVEIRA, C. A. F. Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds. **Toxin Reviews**, v. 33, n. 3, p. 125–135, 2014.

DIAS, R. **A importância da atualização das normas para a produção orgânica.** [s.l: s.n.].

DIAZ, D. E.; JR, W. M. H.; BLACKWELDER, J. T.; EVE, J. A.; BRINTON, A.; ANDERSON, K. L.; JONES, F. T.; WHITLOW, L. W. Aflatoxin Binders II : Reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. **Mycopathologia**, v. 157, p. 233–241, 2004.

ECHENIQUE, J. V. Z.; ESTIMA-SILVA, P.; PEREIRA, D. B.; MARQUES, L. S.; RIBEIRO, L. S.; SCHILD, A. L. Leukoencephalomalacia in horses associated with immature corn consumption. **Ciencia Rural**, v. 49, n. 3, p. 2–5, 2019.

EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B 1 as undesirable substance in animal feed. **The EFSA Journal**, v. 39, p. 1–27, 2004.

EPA. Risk assessment guidance for superfund. *Em: Volume I: human health evaluation manual (part a)*. [s.l.] EPA/540/1-89/002, 1989.

FALASCONI, M.; GOBBI, E.; PARDO, M.; DELLA, M.; BRESCIANI, A.; SBERVEGLIERI, G. Detection of toxigenic strains of *Fusarium verticillioides* in corn by electronic olfactory system. **Sensors and Actuators B Chemical**, v. 108, p. 250–257, 2005.

FARIAS, A. X. de; FREITAS-SILVA, O.; MORAES, M. H. de; SOUZA, M. de L. M. de; MONTELLO, A. P. **Aflatoxina M1 em leite: um risco para a saúde pública.** - Portal Embrapa. 1. ed. Rio de Janeiro - RJ: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2005. 20 p.

FERNANDES, A. M.; CORRÊA, B.; ROSIM, R. E.; KOBASHIGAWA, E.; OLIVEIRA, C. A. F. Distribution and stability of aflatoxin M 1 during processing and storage of Minas Frescal cheese. v. 24, p. 104–108, 2012.

FERREIRA, H.; PITTNER, E.; SANCHES, H. F.; MONTEIRO, M. C. Aflatoxinas : Um Risco a Saúde Humana E Animal. p. 113–127, 2006.

FIBL & IFOAM – ORGANICS INTERNATIONAL. **The World of organic agriculture: STATISTICS & EMERGING TRENDS 2019.** [s.l: s.n.]351 p. (2019)

FIBL & IFOAM – ORGANICS INTERNATIONAL. **The World of organic agriculture: STATISTICS & EMERGING TRENDS 2022.** [s.l: s.n.]351 p. (2022)

FOOD AND AGRICULTURE, F. Codex Alimentarius - Guidelines for the simple evaluation of dietary exposure to food additives CAC/GL. v. Revision 2, 2014.

FREIRE, F. das C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. **Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal.** Fortaleza, CE: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 48 p.

GONÇALVES, B. L.; GONÇALVES, J. L.; ROSIM, R. E.; CAPPATO, L. P.; CRUZ, A. G.; OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H. Effects of different sources of *Saccharomyces cerevisiae* biomass on milk production, composition, and aflatoxin M1 excretion in milk from dairy cows fed aflatoxin B1. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 7, p. 5701–5708, 2017.

GONÇALVES, K. D. M.; SIBAJA, K. V. M.; FELTRIN, A. C. P.; REMEDI, R. D.; DE OLIVEIRA GARCIA, S.; GARDA-BUFFON, J. Occurrence of aflatoxins B1 and M1 in milk powder and UHT consumed in the city of Assomada (Cape Verde Islands) and southern Brazil. **Food Control**, v. 93, p. 260–264, 1 nov. 2018.

HASCHEK, W. M.; GUMPRECHT, L. A.; SMITH, G.; TUMBLESÓN, M. E.; CONSTABLE, P. D. Fumonisin Toxicosis in Swine: An Overview of Porcine Pulmonary Edema and Current Perspectives. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 251–257, 2001.

HASNINIA, D.; SALIMI, G.; BAHRAMI, G.; SHARAFI, K. Human health risk assessment of aflatoxin M1 in raw and pasteurized milk from the Kermanshah province, Iran. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 110, n. March, p. 104568, 2022.

HSIEH, D. P. H.; ATKINSON, D. N. BISFURANOID MYCOTOXINS: THEIR GENOTOXICITY AND CARCINOGENICITY. **Biological Reactive Intermediates IV**, p. 525–532, 1990.

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas Em Alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 7, n. 0, p. 138–161, 2010.

IBGE, I. B. D. G. E. P. **Pesquisa de Orçamentos Familiares (2017-2018) - Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil.** Rio de Janeiro - RJ: IBGE, 2020. págs 33-34 p. (2020).

IBGE, I. B. de G. e E. **Produção de leite no Brasil.** Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/leite/br> Acesso em: 10 out.2023.

JAGER, A. V.; RAMALHO, F. S.; ZAMBELLI, L. N.; OLIVEIRA, C. F. Biomarkers of Aflatoxin Exposure and Its Relationship with the Hepatocellular Carcinoma. **Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology**, 2011.

JAGER, A. V.; TEDESCO, M. P.; SOUTO, P. C. M. C.; OLIVEIRA, C. A. F. Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. **Food Control**, v. 33, n. 1, p. 87–92, set. 2013.

JARD, G.; LIBOZ, T.; MATHIEU, F.; GUYONVARG, A.; LEBRIHI, A. Review of mycotoxin reduction in food and feed : from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. **Food Additives & Contaminants: Part A - Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment.**, v. 0049, p. 1590–1609, 2011.

JOLLIFE, I. T.; CADIMA, J. Principal component analysis: A review and recent developments. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 374, n. 2065, 2016.

KEMBOI, D. C.; ANTONISSEN, G.; OCHIENG, P. E.; CROUBELS, S.; OKOTH, S.; KANGETHE, E. K.; FAAS, J.; LINDAHL, J. F.; GATHUMBI, J. K. A review of the impact of mycotoxins on dairy cattle health: Challenges for food safety and dairy production in sub-Saharan Africa. **Toxins**, v. 12, n. 4, p. 1–25, 2020.

KHANEGHAH, A. M.; MOOSAVI, M.; OMAR, S. S.; OLIVEIRA, C. A. F.; KARIMI-DEHKORDI, M.; FAKHRI, Y.; HUSEYN, E.; NEMATOLLAHI, A.; FARAHANI, M.; SANT'ANA, A. S. The prevalence and concentration of aflatoxin M1 among different types of cheeses: A global systematic review, meta-analysis, and meta-regression. **Food Control**, v. 125, n. January, 2021.

KHATOUNIAN, C. A. **A reconstrução ecológica da agricultura**. Botucatu, SP.: Livraria e Editora Agroecológica, 2001. 345 p.

KLICH, M. A. **Identification of Common Aspergillus Species**. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002.

KUIPER-GOODMAN T. Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxins: aflatoxin, ochratoxin, and zearalenone. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 68, p. 1017–1024, 1990.

KUPPUSAMY, M. R.; GIRIDHAR, V. V. Factor analysis of water quality characteristics including trace metal speciation in the coastal environmental system of Chennai Ennore. **Environment International**, v. 32, n. 2, p. 174–179, 2006.

LAMIC. **LEGISLAÇÃO BRASIL**. Disponível em: <<https://www.lamic.ufsm.br/site/legislacoes/legislacao-brasil>>. (2020) Acesso em: 3 out. 2020.

LAMIC. **LEGISLAÇÃO DA UNIÃO EUROPEIA**. Disponível em: <<https://www.lamic.ufsm.br/site/legislacoes/legislacao-da-uniao-europeia>>. (2023). Acesso em: 01 jun. 2023.

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**, v. 20, n. 2, p. 136–138, 2009.

LIN, M. T.; DIANESE, J. C. A Coconut-Agar Medium for Rapid Detection of Aflatoxin Productin by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, v. 66, p. 1466–69, 1976.

LINARES PEREIRA, N. Using Multiple linear regression based on principal component analysis (FMCA factor analysis of mixed data) for predict the final score of secondary students from Portugal. n. December 2019, p. 1–18, 2019.

LOPEZ, C.; RAMOS, L.; RAMADAN, S.; BULACIO, L.; PEREZ, J. Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 211–215, 2001. Disponível em: <www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro>.

MACHADO, F. S.; CASTRO, C. R. T. de; DINIZ, F. H.; JÚNIOR, W. C. P. de M.; PIRES, M. de F. Á. **Leite Orgânico: Cenário da pecuária leiteira orgânica no Brasil - Documentos 260**. 1. ed. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 2021. 38 p.

MAGALHÃES, L. S.; SOLA, M. C. Identification of aflatoxins in milk and dairy products: Literature review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, 2021.

MAPA, M. da A. P. e A. **Mapa do leite: Políticas Públicas e Privadas para o Leite**. (2023) Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite> Acesso em: 10 out. 2023.

MICHELIN, E. C.; MASSOCCO, M. M.; GODOY, S. H. S.; BALDIN, J. C.; YASUI, G. S.; LIMA, C. G.; ROTTINGHAUS, G. E.; SOUSA, R. L. M.; FERNANDES, A. M. Carryover of aflatoxins from feed to lambari fish (*Astyanax altiparanae*) tissues. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 34, n. 2, p. 265–272, 2017.

MIRANDA, S. H. G. **A economia da proteção fitossanitária e seus desafios**. (2018) Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/opiniao-cepea/a-economia-da-protecao-fitossanitaria-e-seus-desafios.aspx>>.

MOHAMMADI, S.; KESHAVARZI, M.; KAZEMI, A.; RAHMDEL, S.; NOURI, M.; RASTEGAR, A.; GHAFARIAN-BAHRAMAN, A. Aflatoxin-M1 contamination in cheese of six countries in the West Asia region : A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Dairy Technology**, v. 75, n. 3, p. 653–667, 2022.

MOSS, M. O. Recent studies of mycotoxins. **Journal of Applied Microbiology Symposium**, v. 84, n. Supplement, p. 62S-76S, 1998.

MUHIALDIN, B. J.; SAARI, N.; MEOR HUSSIN, A. S. Review on the Biological Detoxification of Mycotoxins Using Lactic Acid Bacteria to Enhance the Sustainability of Foods Supply. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 11, 2020.

MURPHY, P. A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C. M. B. Food Mycotoxins : An Update. **JOURNAL OF FOOD SCIENCE**, v. 71, n. 5, p. 54, 2006.

NEIVA, R. **Produção de leite orgânico no Brasil tem projeto de pesquisa aprovado na Embrapa**. [s.l: s.n.]. (2021).

OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H.; CORREA, B.; OSWALD, I. P. Animal Health: Mycotoxins. *Em*: VAN ALFEN, N. K. **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**. 2. ed. San Diego: Elsevier, 2014. p. 358–377.

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. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. SUPPL. 1, p. 221–225, 2010.

OLIVEIRA, C. A. F. de; GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 417–424, 1997.

OLIVEIRA, E. de; FERNANDES, F. T. ; CASELA, C. R. ; PINTO, N. F. J. A. ;; FERREIRA, A. Diagnose e controle de doenças na cultura do milho. *Em*: MIRANDA, G. V. **Tecnologias de produção do milho**. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. p. 226–267.

OMINSKI, K. H.; MARQUARDT, R. R.; SINHA, R. N.; ABRAMSON, D. Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi. *Em*: MILLER, J. D.; TRENHOLM, H. L. **Mycotoxins in Grain: Compounds Other than Aflatoxin**. [s.l: s.n.]p. 287–312.

ORGANIS - MARKET ANALYSIS. **Consumo de produtos orgânicos no Brasil: primeira pesquisa nacional sobre o consumo de orgânicos**. [s.l: s.n.]. (2017).

ORGANIS, A. D. P. D. O. **Panorama do consumo de orgânicos no Brasil 2021** Associação de Promoção dos Orgânicos; Inteligência de mercado e pesquisa estratégica - Brain; Unirorganicos, 2021. Disponível em: <www.organis.org.br>.

- OSTRY, V.; MALIR, F.; TOMAN, J.; GROSSE, Y. Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. **Mycotoxin Research**, v. 33, n. 1, p. 65–73, 2017.
- PINTO, N. F. J. A.; OLIVEIRA, E.; FERNANDES, F. T. **Manejo das Principais Doenças do Milho - Circular técnica 92**. Sete lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2007.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Mycotoxins in foods: implications for human health. *Em*: WAHLQVIST, M. L.; TRUSWELL, A. S. **Recent advances in clinical nutrition**. London, UK: John Libby, 1986. p. 161–168.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. [s.l.: s.n.]519 p. (2009).
- PITT, J. I.; HOCKING, A. ;; GLENN, D. R. Na improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 54, p. 109–114, 1983.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing. R Foundat ionfor Statistical Computing**.Vienna, Austria. 2019.
- RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture.e. **Mycologia**, v. 42, p. 265–270, 1950.
- RUSTOM, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 57–67, 1997.
- SABBIONI, G. Chemical and physical properties of the major serum albumin adduct of aflatoxin B1 and their implications for the quantification in biological samples. **Chemico-Biological Interactions**, v. 75, n. 1, p. 1–15, 1990.
- SAHOTA, A. The Global Market for Organic Food & Drink. *Em*: WILLER, H.; TRÁVNÍČEK, J.; MEIER, C.; SCHLATTER, B. **The World of Organic Agriculture Statistics and Emerging Trends 2022**. [s.l.] Research Institute of Organic Agriculture FiBL and IFOAM – Organics International, 2022. p. 140–145.
- SAS 9.4. **SAS Analytics Software**https://documentation.sas.com/doc/en/pgmsascdc/9.4_3.5/whatsnew/p0lwlxng09cxnn1xy6imqn5qi0j.htm, 2015.
- SCOTT, P. M. Possibilities of reduction or elimination of mycotoxins in cereal grains. *Em*: CHELKOWSKI, J. **Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 529–572.
- SHAHBAZI, Y.; NIKOUSEFAT, Z.; KARAMI, N. Occurrence , seasonal variation and risk assessment of exposure to a fl atoxin M 1 in Iranian traditional cheeses. **Food Control**, v. 79, p. 356–362, 2017.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. de A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. [s.l: s.n.]624 p. (2010).

SILVA, I. M. de M.; DA CRUZ, A. G.; ALI, S.; FREIRE, L. G. D.; FONSECA, L. M.; ROSIM, R. E.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, R. B. A. de; OLIVEIRA, C. A. F. de. Incidence and Levels of Aflatoxin M1 in Artisanal and Manufactured Cheese in Pernambuco State, Brazil. **Toxins**, v. 15, n. 3, 1 mar. 2023.

SIQUEIRA, K. B. Um panorama do consumo de lácteos no Brasil. *Em*: SIQUEIRA, K. B. **Na era do consumidor: Uma visão do mercado lácteo brasileiro**. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 2021. p. 17–22.

SIQUEIRA, K. B.; ARCURI, P. B. Leites especiais: oportunidade de mercado. *Em*: RENTERO, N. **Anuário Leite 2019 - Embrapa Gado de Leite**. [s.l: s.n.]p. 76. (2019).

SIQUEIRA, K. B.; SCHETTINO, J. P. J. O consumo de queijos pelos brasileiros. *Em*: SIQUEIRA, K. B. **Na era do consumidor: uma visão do mercado lácteo brasileiro**. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de leite , 2021. p. 53–55. (2021)

SKRBIC, B.; ZIVANCEV, J.; ANTIC, I.; GODULA, M. Levels of aflatoxin M1 in different types of milk collected in Serbia : Assessment of human and animal exposure. **Food Control**, v. 40, p. 113–119, 2014.

SNA/SP, S. N. de Agricultura. **Demanda aquecida de leite orgânico mobiliza produtores**. Disponível em: <<https://www.sna.agr.br/demanda-aquecida-de-leite-organico-mobiliza-produtores/>>.

SNA/SP SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA. **Demanda aquecida de leite orgânico mobiliza produtores**. (2018) Disponível em: <<https://www.sna.agr.br/demanda-aquecida-de-leite-organico-mobiliza-produtores/>>. Acesso em: ago. 2020.

SOUTO, P. C. M. de C.; AUGUSTO, L.; GREGORIO, M. C. Di; OLIVEIRA, C. A. F. de. Principais micotoxicoses em suínos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 24, n. 3, p. 480–494, 2017.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia, conceitos e aplicações. *Em*: **Microbiologia**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2012. p. 228–335.

TROMBETE, F. M.; CASTRO, I. M.; TEIXEIRA, A. da S.; SALDANHA, T.; FRAGA, M. E. BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY Aflatoxin M 1 Contamination in Grated Parmesan Cheese Marketed in Rio de Janeiro-Brazil. **Arch. Biol. Technol.** , v. 57, n. 2, p. 269–273, 2014.

UNIAO EUROPEIA, U. **Regulamento (CE) nº 401/2006 da Comissão de 23 de fevereiro de 2006. Estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controle oficial dos teores de micotoxinas nos gêneros alimentícios.**Luxembourg. Jornal Oficial da União Européia, 2006.

US FDA, F. A. D. A. CPG Sec 527.400 Leite Integral, Leite Desnatado, Leite Desnatado - Aflatoxina M1. *Em: FDA compliance policy guides.* washington: Regulatory Affairs Office Center for Food Safety and Applied Nutrition, 1996. p. 219. (1996).

VICAM, W. B. **Afla M1: Instruction Manual.** Watertown, MA,USA. (p.10), Vicam, 2018.

VILELA, G. F.; MANGABEIRA, J. A. de C.; MAGALHÃES, L. A.; TÔSTO, S. G. **Agricultura orgânica no Brasil: um estudo sobre o Cadastro Nacional de Produtores Orgânicos.** Campinas,SP.: Embrapa Territorial, 2019. 20 p.

WHITLOW, L. W.; HAGLER JR., W. M. Mold and Mycotoxin Issues in Dairy Cattle: Effects, Prevention and Treatment. **NC Cooperative extension**, 2008.

WILSON, T. M.; NELSON, H. A.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; SHEPHARD, G. S.; SYDENHAM, E. W. A mycological evaluation and in vivo toxicity evaluation of feed from 41 farms with equine leukoencephalomalacia. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, n. 4, p. 352–354, 1990.

XIONG, J. L.; Y.M.WANG; NENNICH, T. D.; LI, Y.; LIU, J. X. Transfer of dietary aflatoxin B 1 to milk aflatoxin M 1 and effect of inclusion of adsorbent in the diet of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 4, p. 2545–2554, 2015.

ZAREI, H.; POURREZA BILONDI, M. Factor analysis of chemical composition in the Karoon River basin, southwest of Iran. **Applied Water Science**, v. 3, n. 4, p. 753–761, 2013.

APÊNDICE A – Indivíduos gerados pela análise fatorial de dados mistos (FAMD).

Indivíduo	Local	Estacao	Sala_armaz	Acondic	Alimento	AFG1	AFB2	AFB1	Aa	Contagem	Aspergillus	Flavi	AFM_leite
1	A	Inverno	ssala	spalet	Silagem	10,608	0	0	0,9786	8,9542	0	0	0
2	A	Inverno	ssala	spalet	Concentrado	0	0	0	0,5746	5,9031	1	1	0
3	B	Inverno	ssala	cpalet	Silagem	0,112	0	0	0,9959	6,3222	0	0	0,0155
4	B	Inverno	ssala	cpalet	Concentrado	0,047	1,792	11,464	0,5875	6,8921	1	1	0,0155
5	D	Inverno	csala	cpalet	Silagem	0	0	0	0,5361	5,9294	0	0	0
6	C	Inverno	csala	cpalet	Concentrado	1,98	1,944	8,692	0,5333	6,6812	0	0	0,0255
7	D	Inverno	csala	cpalet	Concentrado	0	0	0	0,9778	5,7924	1	1	0
8	E	Inverno	csala	cpalet	Silagem	0,164	0	0	0,98	5,2553	0	0	0
9	E	Inverno	csala	cpalet	Silagem	0	0	0	0,9817	3	0	0	0
10	E	Inverno	csala	cpalet	Concentrado	0	0	0	0,6646	5,699	1	1	0
11	E	Inverno	csala	cpalet	Concentrado	0	0,012	0,432	0,6711	5,415	1	1	0
12	F	Primavera	csala	cpalet	Concentrado	0	0	0	0,5895	4,7782	1	1	0
13	F	Primavera	csala	cpalet	Silagem	0	0	0	0,969	6,0294	1	1	0
14	A	Verao	ssala	spalet	Concentrado	0	0	0	0,6577	4,3617	1	1	0
15	B	Verao	ssala	cpalet	Concentrado	0,046	0,952	4,32	0,6392	5,9395	1	1	0,0245
16	E	Verao	csala	cpalet	Concentrado	0	0	0,576	0,6705	5,4548	1	1	0
17	C	Verao	csala	cpalet	Concentrado	3,144	4,524	23,38	0,7205	6,5682	1	1	0,6563
18	D	Verao	csala	cpalet	Concentrado	0	0	0,336	0,7595	6,7284	1	1	0
19	G	Verao	ssala	cpalet	Concentrado	0	0,074	1,828	0,6017	6,7889	1	1	0
20	C	Verao	csala	cpalet	Concentrado	0	0,404	1,856	0,527	6,1761	1	0	0,1553

Legenda: **Acondic** = forma de acomodação das embalagens de alimentos dentro das salas; **Sala_armaz** = tipo de sala de armazenagem dos alimentos. **Estacao**: estação do ano; **Local**: propriedades; Alimento = tipo de alimento; Aa = atividade de água nos alimentos; **Bolores_Lev** e **Contagem** = contagem de bolores e leveduras; **Flavi** = presença de *Aspergillus seção Flavi*; **AFM_leite** = AFM₁ em leite; **AFB1** = aflatoxina B₁; **AFB2** = aflatoxina B₂ e **AFG1** = aflatoxina G₁. **Fonte:** Própria autoria.

APÊNDICE A – Indivíduos gerados pela análise fatorial de dados mistos (FAMD) - Continuação.

Indivíduo	Local	Estacao	Sala_armaz	Acondic	Alimento	AFG1	AFB2	AFB1	Aa	Contagem	Aspergillus	Flavi	AFM_leite
21	E	Verao	csala	cpalet	Silagem	0	0	0,094	0,9859	5,2553	0	0	0
22	E	Verao	csala	cpalet	Concentrado	0	0	0,035	0,7304	7,1461	1	1	0
23	G	Verao	ssala	cpalet	Concentrado	0	0,075	1,804	0,6437	5,9395	1	1	0
24	C	Verao	csala	cpalet	Concentrado	0	0,059	1,504	0,6515	5,8129	1	1	0,162
25	E	Verao	csala	cpalet	Silagem	0	0	0,07	0,935	4,2175	0	0	0
26	E	Verao	csala	cpalet	Concentrado	0	0	0,058	0,6686	4,5798	1	1	0
27	G	Verao	ssala	cpalet	Concentrado	0	8,472	85,302	0,625	5,8482	0	0	1,3613
28	C	Verao	csala	cpalet	Concentrado	0	0,788	7,914	0,636	4,3802	1	1	0,2033
29	E	Verao	csala	cpalet	Silagem	0	0	0	0,9891	5,959	0	0	0
30	E	Verao	csala	cpalet	Concentrado	0	0	0	0,6442	4,699	1	1	0
31	G	Verao	ssala	cpalet	Concentrado	0	9,26	92,908	0,5954	6,6021	1	1	0
32	C	Verao	csala	cpalet	Concentrado	0	0,862	8,412	0,6583	5,5441	1	1	0
33	E	Primavera	csala	cpalet	Silagem	0	0	0	1,0025	0	0	0	0
34	E	Primavera	csala	cpalet	Concentrado	0	0	0	0,623	5,7634	1	1	0
35	C	Primavera	csala	cpalet	Concentrado	0	1,172	8,144	0,6391	7,4314	1	1	0,27
36	G	Primavera	ssala	cpalet	Concentrado	0	0,536	0,946	0,6492	5,6021	1	1	0,3135

Legenda: **Acondic** = forma de acomodação das embalagens de alimentos dentro das salas; **Sala_armaz** = tipo de sala de armazenagem dos alimentos. **Estacao**: estação do ano; **Local**: propriedades; **Alimento** = tipo de alimento; **Aa** = atividade de água nos alimentos; **Bolores_Lev** e **Contagem** = contagem de bolores e leveduras; **Flavi** = presença de *Aspergillus seção Flavi*; **AFM_leite** = AFM₁ em leite; **AFB1** = aflatoxina B₁; **AFB2** = aflatoxina B₂ e **AFG1** = aflatoxina G₁.

Fonte: Própria autoria.