



**ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM EXPLORAÇÕES BOVINAS DE LEITE NOS AÇORES E A  
SUA POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO A FATORES PRODUTIVOS**

**Inês Fernandes Garcia**

Coimbra, julho de 2022



**ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM EXPLORAÇÕES BOVINAS DE LEITE NOS AÇORES E  
A SUA POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO A FATORES PRODUTIVOS**

**Coimbra, julho 2022**

**Inês Fernandes Garcia**

**Aluna do Mestrado integrado em Medicina Veterinária**

**Constituição do Júri**

*Presidente do Júri: Professora Doutora Anabela Maduro  
de Almeida Francisco*

*Arguente: Professor Doutor Gonçalo Daniel dos Santos  
Frouco*

*Orientador: Professora Doutora Sofia Alexandra Giestas  
Cancela Duarte*

**Orientador Interno**

Sofia Cancela Duarte

**Coorientador Interno**

Diana da Silva Valente

**Orientadores Externos**

João Vidal

Associação Agrícola de São Miguel

Nuno Prates

Hospital Veterinário da Muralha de Évora

Dissertação do Estágio Curricular do Ciclo de Estudos Conducente  
ao Grau de Mestre em Medicina Veterinária da EUVG

## **Agradecimentos**

Esta dissertação não ficaria completa sem o agradecimento a todos os que de uma forma direta e indireta, contribuíram para a sua concretização. A todos vós, sem exceção, que encontrem nestas palavras a expressão do meu mais sincero reconhecimento.

Aos meus orientadores internos, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sofia Duarte e Prof.<sup>a</sup> Diana Valente, por toda a disponibilidade, apoio, acompanhamento e compreensão durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Nuno Carolino pela sua disponibilidade e ajuda prestada na análise estatística.

Ao Dr. Bruno Moreira pela sua disponibilidade para executar o Método de Separação de partículas de Penn State e avaliação dos dados obtidos.

Aos meus orientadores externos e membros da equipa, tanto do Hospital da Muralha de Évora como da Associação Agrícola de São Miguel, a quem dirijo um agradecimento muito especial, por todos os conhecimentos partilhados e por todo o carinho com que me acolheram sobre a sua alçada.

A todos os produtores que me receberam nas suas explorações de portas abertas e me apoiaram na recolha dos dados para análise.

Aos meus pais, tia, irmã e sobrinhos por todo o amor, apoio incondicional e por nunca desistirem de mim.

Ao meu namorado por toda a matéria que estudou comigo e por me apoiar e estar sempre presente em todos os momentos.

Aos meus amigos de curso, pelo apoio mútuo e parceria em todos os momentos deste percurso.

## Índice Geral

Agradecimentos.....	iii
Índice de Tabelas .....	v
Lista de Siglas e Abreviaturas .....	vi
Página de título.....	1
Resumo .....	2
Palavras-chave .....	2
<i>Abstract</i> .....	3
<i>Keywords</i> .....	3
1. Introdução.....	4
2. Materiais e Métodos .....	6
3. Resultados e Discussão .....	13
4. Conclusões .....	18
Referências Bibliográficas .....	20

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Valores recomendados pela União Europeia para matérias com destino à alimentação animal. ....	5
Tabela 2- Características e Indicadores produtivos e reprodutivos das quatro explorações em estudo. ....	7
Tabela 3 - Quantidade dos principais constituintes da TMR utilizados nas diferentes explorações em estudo. ....	8
Tabela 4 - Micotoxinas avaliadas no estudo pelo método HPLC-MS/MS e seus LOD e LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). .	9
Tabela 5 - Descrição da granulometria dos vários crivos do PSPS, com os respectivos valores padrão. ....	11
Tabela 6 - Micotoxinas com valores detetáveis avaliadas no estudo pelo método HPLC-MS/MS e seus LOD e LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). ....	15
Tabela 7 - Resultados do PSPS da TMR nas diferentes explorações e os respectivos valores de referência.....	16
Tabela 8- Níveis de Zearalenona nas amostras de leite das explorações em estudo. ....	16
Tabela 9 - Níveis de Ingestão Diária Estimada ( $\mu\text{g} /\text{kg}$ peso corporal/dia) de ZEA a partir do leite em estudo no caso dos consumidores.....	18

## Lista de Siglas e Abreviaturas

AASM-CUA	Associação Agrícola de São Miguel- Cooperativa União Agrícola
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CCS	Contagem de Células Somáticas
DAS	Diacetoxiscirpenol
DON	Desoxinivalenol
EDI	Ingestão Diária Estimada (do Inglês <i>Estimated Daily Intake</i> )
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do Inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (do Inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> )
FUM	Fumonisin
HQ	HQ - Quociente de Perigo (do Inglês <i>Hazard Quotient</i> )
HPLC-MS/MS	Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência (do Inglês <i>High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometer</i> )
JECFA	Comité Internacional de Especialistas, administrado em conjunto pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (do Inglês <i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i> )
LM	Limites Máximos
LR	Limites Recomendados
LOD	Limite de Detecção (do Inglês <i>Limit of detection</i> )
LOQ	Limite de Quantificação (do Inglês <i>Limit of quantification</i> )
MS	Matéria Seca
NIV	Nivalenol
NOEL	Nível de Efeito Não Observável (do Inglês <i>No Observable Effect Level</i> )
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
PL	Produção Leiteira
PSPS	Separador de Partículas Penn State (do Inglês <i>Penn State Particle Separator</i> )
RASFF	Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações (do Inglês <i>Rapid Alert System for Food and Feed</i> )
TB	Teor Butiroso

TDI	Ingestão Diária Tolerável (do Inglês <i>Tolerable Daily Intake</i> )
TMR	Mistura Alimentar Completa (do Inglês <i>Total mixed ration</i> )
TP	Teor Proteico
UE	União Europeia
ZEA	Zearalenona

## **OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM EXPLORAÇÕES BOVINAS DE LEITE NOS AÇORES E A SUA ASSOCIAÇÃO A FATORES PRODUTIVOS**

Inês Garcia <sup>a</sup>, Diana Valente <sup>a</sup>, Hélder Dinis <sup>b</sup>, Nuno Carolino <sup>a</sup>, Rui Sousa <sup>b</sup>, Sofia Duarte <sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ciências Veterinárias/ Centro de Investigação Vasco da Gama (CIVG), Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG), Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário- Bloco E, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal;

([lunalorde@hotmail.com](mailto:lunalorde@hotmail.com); [diana.valente@euvq.pt](mailto:diana.valente@euvq.pt); [helderdinis@cua.pt](mailto:helderdinis@cua.pt); [carolinonuno@hotmail.com](mailto:carolinonuno@hotmail.com) [ruifilipe.msousa@gmail.com](mailto:ruifilipe.msousa@gmail.com); [sofia.duarte@euvq.pt](mailto:sofia.duarte@euvq.pt))

<sup>b</sup> Departamento de Nutrição Animal, Associação Agrícola de São Miguel – Cooperativa União Agrícola (AASM-CUA), Recinto da Feira – Campo de Santana, 9600-096 – Vila de Rabo de Peixe – Ribeira Grande, São Miguel, Açores, Portugal;

<sup>c</sup> LAQV, REQUIMTE, Laboratório de Bromatologia e Farmacognosia, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Polo III, Azinhaga de Santa Comba, 3000-548 Coimbra, Portugal;

## Resumo

Os Açores são caracterizados por ter um setor leiteiro, em modelo semi-intensivo, com vacas leiteiras em pastoreio todo o ano. A pastagem espontânea é complementada com uma mistura alimentar completa (TMR, do Inglês *total mixed ration*) com alimentos grosseiros e concentrados, minerais e vitaminas em quantidades definidas que são misturados para formar um alimento balanceado. Devido às poucas estruturas para armazenamento e às grandes oscilações climáticas que caracterizam os Açores, esta mistura alimentar completa é suscetível à proliferação de uma variedade de fungos e micotoxinas provenientes de diferentes matérias-primas. Assim, a ingestão crônica destes xenobióticos poderá conduzir ao aumento da suscetibilidade a doenças, perdas de desempenho reprodutivo e, no caso dos bovinos de leite, diminuição da produtividade e da qualidade do leite produzido. Sendo impossível a eliminação total das micotoxinas, torna-se essencial garantir a implementação de estratégias que reduzam a sua concentração em produtos que se destinam à alimentação humana e animal, bem como, monitorizar e controlar os teores presentes nos alimentos.

Este trabalho pretendeu avaliar a ocorrência de micotoxinas no alimento (TMR) em quatro explorações de bovinos leiteiros na ilha açoriana de São Miguel e relacionar com a ocorrência destas micotoxinas no leite produzido, associando diversos indicadores produtivos e sanitários. Para tal, recorreu-se aos dados mensais do contraste leiteiro, à determinação de ocorrência de micotoxinas no alimento ingerido e à análise de Zearalenona (ZEA), em amostras de leite (individuais), provenientes das quatro explorações incluídas no estudo. Considerando as amostras de alimento analisadas, verificou-se a coexistência de micotoxinas em todas as explorações. Em duas explorações determinou-se ZEA, Fumonisin (FUM) e Nivalenol (NIV). Foram encontradas micotoxinas do tipo Eniatina em três das explorações em estudo. Oitenta e três (98,8 %) das amostras de leite analisadas apresentaram teores detetáveis de ZEA ( $1,56 \pm 1,36 \mu\text{g/L}$ ), superiores ao reportado em estudos similares anteriores. Apesar da concentração de ZEA não estar significativamente associada a qualquer indicador de produção analisado (dias em leite, idade ao parto, produção leiteira, teor proteico, teor butiroso, concentração de células somáticas e ureia), verificou-se que o regime de produção e tipo de manejo do alimento constituem fatores de grande importância na exposição dos animais a teores elevados de micotoxinas. Na avaliação de risco, verificou-se que o quociente de perigo (HQ) foi aceitável ( $<1$ ) em todos os cenários considerados, com exceção do consumo, por parte de uma criança de 4 anos, do leite com o teor mais elevado de ZEA ( $4,46 \mu\text{g/L}$ ).

É recomendada a realização de estudos adicionais, para garantir a monitorização contínua e diminuição do risco associado à exposição dos animais e humanos às micotoxinas, em particular à ZEA.

### Palavras-chave

Açores, Bovinos Leiteiros, Indicadores produtivos, Leite, Micotoxinas, *Total Mixed Ration*, Zearalenona.

## **Abstract**

The Azores is characterized by having a dairy industry, on a semi-intensive model, with dairy cows grazing all year round. The spontaneous grazing is supplemented with a total mixed ration (TMR) with roughage and concentrates, minerals and vitamins in defined quantities that are mixed to form a balanced feed. Due to the few storage facilities and the large climatic fluctuations that characterize the Azores, this complete feed mixture is susceptible to the proliferation of a variety of fungi and mycotoxins from different raw materials. Thus, chronic ingestion of these xenobiotics may lead to increased susceptibility to disease, loss of reproductive performance and, in the case of dairy cattle, decreased productivity and quality of milk produced. Since it is impossible to totally eliminate the presence of mycotoxins, it is essential to ensure the implementation of strategies to reduce their concentration in products intended for food and feed, as well as to monitor and control the levels present in food.

This study aimed to evaluate the occurrence of mycotoxins in food (TMR) in four dairy cattle farms on the Azores island of São Miguel and relate it to the occurrence of these mycotoxins in the milk produced, by associating several production and health indicators translated by the monthly milk contrast. To this end, the monthly milk contrast data, the determination of the occurrence of mycotoxins in the ingested food and the analysis of zearalenone (ZEA) in milk samples (individual) from the four farms included in the study were used. Considering the food samples analyzed, mycotoxins were found to coexist on all farms. In two farms ZEA, Fumonisin (FUM) and Nivalenol (NIV) were determined. Enniatin-type mycotoxins were found in three of the farms under study. Eighty-three (98.8 %) of the milk samples under study had detectable ZEA levels ( $1.56 \pm 1.36 \mu\text{g/L}$ ), Higher than reported in previous similar studies. Although ZEA concentration was not significantly associated with any production indicator analyzed (days in milk, age at calving, milk yield, protein content, butyrate content, somatic cell concentration and urea), it was concluded that the production regime and type of feed management is a major factor in the exposure of animals to high mycotoxin contents.

Further studies are recommended to ensure continued monitoring and reduction of the risk associated with exposure of animals and humans to mycotoxins, in particular ZEA.

### **Keywords**

Azores, Dairy cattle, Milk, Mycotoxins, Productive indicators, Total Mixed Ration, Zearalenone.

## 1. Introdução

A agricultura é um setor de extrema importância para o equilíbrio sustentável das ilhas Açorianas. A produção de leite representa cerca de 70 % do rendimento do setor agrícola, constituindo o principal pilar da agricultura açoriana (Lourenço, 2016). Em 2020, a produção leiteira nos Açores, com destaque para a ilha de S. Miguel, correspondeu a aproximadamente a um terço (650 452 toneladas) da produção nacional (INE, 2021). Um dos perigos inerentes à alimentação de bovinos de aptidão leiteira com forragem e à diminuição de produção de leite é a presença de compostos xenobióticos como as micotoxinas (Buszewska-Forajta, 2020).

As micotoxinas são metabolitos secundários de baixo peso molecular, sintetizados por fungos filamentosos. Estes metabolitos são contaminantes naturais dos alimentos. As principais são as Aflatoxinas produzidas por *Aspergillus* sp., Fusariotoxinas como a Zearalenona (ZEA), produzidas por *Fusarium* sp. e as Ocratoxinas, produzidas por *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. (Buszewska-Forajta, 2020). As micotoxinas do tipo Fusariotoxinas têm diversos efeitos toxicológicos no homem. Nos animais, as micotoxinas como a ZEA são caracterizadas pelos seus efeitos estrogénicos que, com uma exposição a longo prazo, causam distúrbios reprodutivos. Em humanos é possível que os fetos e neonatos sejam mais suscetíveis que os adultos aos seus efeitos, com base em maiores exposições internas devido à imaturidade metabólica e fisiológica. Nas mulheres foram relatados efeitos adversos da ZEA no trato reprodutivo, na fertilidade e sobrevivência do embrião. As evidências ao nível dos seus efeitos carcinogénicos ainda são limitadas, mas em dois bioensaios de carcinogenicidade em murganhos foram observados aumentos significativos de adenomas hipofisários e hepáticos (EFSA, 2011). No entanto, de acordo com a IARC, a ZEA não é classificável quanto à sua carcinogenicidade em humanos (Grupo 3; IARC, 1993) sendo ainda necessários mais estudos para uma completa avaliação dos efeitos desta micotoxina na saúde humana (IARC, 1993). Adicionalmente, a ZEA é reconhecida como hepatotóxica, hematotóxica, imunotóxica e genotóxica (EFSA, 2011). A resposta biológica é considerada específica da espécie. Em bovinos, a aplicação de 250 mg de ZEA purificada (99 %) promoveu o desenvolvimento de distúrbios reprodutivos, como infertilidade, e a redução da produção de leite (Weaver *et al.*, 1986). Num estudo posterior, verificou-se que novilhas alimentadas com forragem enriquecida com 750 µg de ZEA/kg demonstraram distúrbios nos ciclos ovários bem como um crescimento anormal da glândula mamária (Coppock *et al.*, 1990).

À semelhança da ZEA, os Tricotecenos não são classificáveis relativamente à sua carcinogenicidade (IARC, 1993). A sua atividade biológica está associada à ligação aos ribossomas, originando inibição da síntese de proteínas, ácido desoxirribonucleico (ADN) e ácido ribonucleico (ARN). Além disso, de acordo com a literatura, foram comprovados efeitos tóxicos nas membranas celulares, e a exposição crónica a estes metabolitos pode originar imunossupressão (Buszewska-Forajta, 2020). Com base na sua estrutura, estes podem ser divididos em quatro grupos: tipo A, B, C e D, sendo os dois primeiros os mais frequentes. No tipo A estão incluídas micotoxinas como a toxina T-2, HT-2 e o diacetoxiscirpenol, e no tipo B o nivalenol (NIV), desoxinivalenol (DON), diacetilnivalenol e o monoacetilnivalenol (Comissão Europeia, 2006; Moss & Thrane, 2004).

As fumonisinas (FUM) são metabolitos secundários produzidos por *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*. Do ponto de vista toxicológico estes metabolitos são neurotóxicos, possivelmente carcinogénicos (Grupo 2B da IARC), hepatotóxicos e teratogénicos (Buszewska-Forajta, 2020).

Existem fatores intrínsecos e extrínsecos que afetam o crescimento de fungos e a produção de micotoxinas, entre os quais o tipo de alimento, a presença de nutrientes, tais como lípidos e hidratos de carbono, o pH, a humidade do grão e a atividade da água. O crescimento fúngico é influenciado por fatores extrínsecos como a humidade relativa do ambiente, área de superfície do grão, temperatura ambiente e a proporção de oxigénio e dióxido de carbono no armazenamento (Alonso *et al.*, 2013; Scudamore & Livesey, 1998; Streit *et al.*, 2013). O crescimento do fungo leva à perda de nutrientes e matéria seca (MS), redução da palatabilidade e, conseqüentemente, redução do consumo e da performance animal. Prevê-se que as alterações climáticas possam vir a ter um impacto, cada vez maior, sobre a presença de diversas micotoxinas nos cereais na Europa (Schrenk *et al.*, 2020).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), 25 % das colheitas cerealíferas mundiais estão contaminadas com micotoxinas. A presença destes xenobióticos causa, anualmente, elevadas perdas, diretas e indiretas, que acrescem às preocupações associadas à sua toxicidade e, em particular, à sua carcinogenicidade. Por esse motivo, foram estabelecidos, para diferentes micotoxinas, valores de Ingestão Diária Tolerável (TDI, do Inglês *Tolerable Daily Intake*), bem como limites máximos aplicáveis aos géneros alimentícios que mais contribuem para a exposição humana. No caso das matérias-primas e alimentos compostos destinados à alimentação animal, foram estabelecidos limites máximos apenas no caso da Aflatoxina B1, sendo que, para as restantes micotoxinas, existem apenas valores recomendados (Tabela 1).

Tabela 1 - Limites máximos (LM) e recomendados (LR) de micotoxinas na União Europeia para matérias com destino à alimentação animal (Comissão Europeia, 2016; Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia, 2002).

Limites	Micotoxinas	Alimentos para Ruminantes (µg/kg)	
		Matérias-primas <sup>a</sup>	Alimentos compostos
LM	Aflatoxina B1 <sup>b</sup>	20	5
LR	Ocratoxina A	250	100
	Zearalenona	2000 a 3000	500
	Fumonisinias B1 + B2	60000	50000
	Desoxinivalenol	8000 a 12000	5000
	Alcalóides da cravagem do centeio	1000000	1000000

<sup>a</sup> Em função da natureza da matéria-prima.

<sup>b</sup> Limite máximo Diretiva 2002/32/EC (Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia, 2002).

Em comparação com as espécies monogástricas, os ruminantes são geralmente considerados menos suscetíveis aos efeitos adversos causados pela contaminação dos alimentos com micotoxinas. Tais considerações baseiam-se no pressuposto de que a microbiota ruminal degrada e inativa estes

xenobióticos, protegendo assim o animal dos seus efeitos adversos. (Kiesling *et al.*, 1984). No entanto investigações mais recentes (Fink-Gremmels, 2008) indicam que algumas micotoxinas resistem à degradação ruminal e que devido à composição heterogénea da sua dieta, os bovinos leiteiros podem ser expostos a uma ampla variedade de micotoxinas provenientes de diferentes matérias-primas com efeitos sinérgicos entre si.

Na produção animal, é comum recorrer-se a uma mistura alimentar completa (em Inglês *total mixed ration* - TMR) formulada com alimentos grosseiros e concentrados, minerais e vitaminas em quantidades definidas que são misturados por um Unifeed, com o intuito de formar um alimento equilibrado. As matérias-primas utilizadas na formulação da TMR podem ser uma importante fonte de micotoxinas para os animais (Rodríguez-Blanco *et al.*, 2020). Quando há falta de homogeneidade dos constituintes alimentares ou quando existe uma percentagem superior a 8 % de partículas de maior diâmetro, ocorre uma seleção, pelos bovinos, de partículas menores que passam rapidamente pelo rúmen, diminuindo o tempo de permanência do alimento no trato gastrointestinal e reduzindo a degradação das micotoxinas pela microbiota (Moreira, 2015).

O objetivo do presente trabalho foi determinar a ocorrência de micotoxinas no alimento, ingerido pelos bovinos leiteiros. Adicionalmente, pretendeu-se determinar o teor, no leite produzido, da micotoxina presente em maior concentração no alimento. O estudo teve ainda como objetivo a avaliação de exposição e de risco dos animais e dos consumidores. A identificação dos potenciais fatores determinantes da exposição foi estabelecida pela avaliação de indicadores produtivos e reprodutivos (fase e nível de produção, teor butírico, teor proteico, Intervalo entre partos, número de inseminações e número de lactações), indicadores sanitários (contagem de células somáticas e ocorrência de mamites) e dos indicadores alimentares (composição da TMR e percentagem dos constituintes alimentares).

## **2. Materiais e Métodos**

Este estudo obteve a aprovação da Comissão de Ética da Escola Universitária Vasco da Gama - EUVG (Parecer nº 06/2022) e da Associação Agrícola de São Miguel (AASM-CUA).

### **2.1 Seleção das explorações**

Após avaliação de 26 explorações de bovinos leiteiros na ilha de São Miguel, nos Açores, foram selecionadas quatro explorações devido às suas características intrínsecas que cumprem os critérios de inclusão do presente estudo, designadamente a utilização de uma única formulação da TMR para um único lote de animais em produção, alimentação dos animais com silagem de milho e silagem de erva, execução de contraste leiteiro mensal, autorização de execução do trabalho de investigação por parte dos produtores e registos clínicos e nutricionais atualizados e retrospectivos (até aos três anos anteriores) face a indicadores produtivos, reprodutivos e sanitários de cada um dos animais selecionados (Tabela 2). Foram ainda avaliadas as práticas de conservação do alimento, em particular das silagens.

Tabela 2- Características e indicadores produtivos e reprodutivos das quatro explorações em estudo.

Indicadores Produtivos e Características da Exploração		Identificação da Exploração			
		#1	#2	#3	#4
Data de Recolha das Amostras		28/02/2022	02/03/2022	08/02/2022	26/02/2022
Número de Animais em consumo da TMR		92	39	116	148
Número de Animais em Produção		75	39	107	125
Tipo de Exploração		Intensiva	Semi-intensiva	Semi-intensiva	Semi-intensiva
Produção	Mínimo	21,5	20,8	17,0	15,4
	Máximo	54,6	37,0	49,6	35,4
Leiteira Diária (kg)	Média±DP	35,9±8,2	29,8±4,3	34,0±8,1	25,3±5,3
	Mínimo	34	77	82	59
Dias em Leite <sup>a</sup>	Máximo	326	256	264	218
	Média±DP	210±84,6	161±78,5	160±116,5	121±108,2
	Mínimo	7	17	10	12
Número de Células Somáticas x1000	Máximo	5331	819	2276	1185
	Média±DP	421±1118,3	210±283,9	307±412,2	295±333,8
	Mínimo	2,8	3,4	2,3	1,9
Teor Butiroso (%)	Máximo	5,3	4,7	6,2	4,9
	Média±DP	4,1±0,7	4,1±0,4	3,3±0,8	3,9±0,7
	Mínimo	2,5	2,9	2,6	2,7
Teor Proteico (%)	Máximo	3,9	3,6	3,9	3,9
	Média±DP	3,3±0,3	3,4±0,2	3,3±0,3	3,3±0,3
	Mínimo	224	193	176	143
Ureia (mg/kg)	Máximo	414	413	452	303
	Média±DP	318±43,9	277±66,3	307±68,9	213±41,3
	Número de Animais positivos ao TCM	5	2	5	5
Avaliação da Silagem de Milho e Silagem de Erva **		Algumas zonas com fungos visíveis	Várias zonas com fungos visíveis	Nenhuma zona com fungos visíveis	Várias zonas com fungos visíveis
Data de Abertura da Silagem de Milho		25/02/2022	09/11/2021	15/11/2021	13/11/2021

DP, Desvio Padrão; TCM, Teste Californiano de Mastites, <sup>a</sup> Dias em produção de leite até à data do contraste leiteiro da exploração.

Tabela 2 - Características e Indicadores produtivos e reprodutivos das quatro explorações em estudo (Continuação).

Indicadores Produtivos e Características da Exploração		Identificação da Exploração			
		#1	#2	#3	#4
Intervalo Parto-Inseminação Artificial	Mínimo	51	77	82	59
	Máximo	273	256	243	318
	Média±DP	136±61,1	161±58,8	156±50,1	121±56,3
Número de Inseminações	Mínimo	1	1	1	1
	Máximo	4	3	6	3
	Média±DP	1,95±0,9	1,88±1,1	2,42±1,4	1,81±0,8
Número de Lactações	Mínimo	1	1	1	1
	Máximo	7	7	8	10
	Média±DP	3,4±1,7	3,3±1,9	3,93±2	3,52±2

DP, Desvio Padrão.

Conforme ilustrado na Tabela 3, nas quatro explorações selecionadas, a silagem de milho foi o principal componente das dietas com um consumo mínimo e máximo diário de alimento por animal de cerca de 13 kg e 40 kg respetivamente. Numa das explorações além de todos os alimentos referidos é adicionado, por rotina, 0,9 kg de feno de luzerna por animal. Em média, a cada animal das quatro explorações foi distribuído um total de 43 kg de TMR. A exploração #2 (com menor número de animais) destacou-se por um consumo inferior, com ingestão de apenas 28 kg de alimento por animal.

Tabela 3 - Quantidade dos principais constituintes da TMR utilizados nas diferentes explorações em estudo.

Identificação da Exploração	Número de Animais em TMR	Silagem de Erva <sup>a</sup>	Silagem de Milho <sup>a</sup>	Alimento	Outros	Total Distribuído <sup>a</sup>
				composto complementar <sup>a</sup>	Constituintes Adicionados <sup>a</sup>	
#1	92	13,4	31,5	3,5	-	48
#2	39	10,3	12,8	4,9	-	28
#3	116	7,8	39,7	1,7	Luzerna 0,9	50
#4	148	13,2	27	1,4	-	42

<sup>a</sup> (kg/vaca/dia)

## 2.2 Seleção dos animais

A recolha de leite foi realizada aquando do contraste leiteiro, através de um medidor volumétrico de leite, a uma amostragem (de conveniência) de 25 % do efetivo em sala de ordenha. Aos animais pertencentes à amostra foi previamente realizado teste californiano de mamites (TCM) e efetuada a colheita de amostra de leite para contentor estéril. Esta amostra foi acondicionada e congelada de imediato, a -20°C, temperatura na qual foi mantida até à determinação laboratorial.

### 2.3 Análise do alimento dos animais

Foram recolhidas duas amostras de 1 kg de TMR a ser administrada às vacas em produção, em cada exploração, segundo o método previsto para micotoxinas na legislação em vigor (Regulamento CE n.º 152/2009) para posterior pesquisa de presença de micotoxinas e execução do Método de Separação de partículas Penn State® (PSPS).

As quatro amostras de alimento representativas da TMR, correspondente ao dia do contraste leiteiro, de cada exploração, foram enviadas para o laboratório ROMER®, sediado na Áustria, conforme as condições de transporte definidas pelo laboratório avaliador. Foram submetidas a um método para multimicotoxinas, por cromatografia líquida de elevada eficiência associada a espectrometria de massa (HPLC-MS/MS) e padrão interno com marcação isotópica, com os limites de deteção e quantificação representados na Tabela 4.

Tabela 4 - Micotoxinas avaliadas no estudo pelo método HPLC-MS/MS e seus LOD e LOQ (µg/kg) (RomerLabs, 2022).

Classe/Grupo	Micotoxinas	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
Aflatoxinas	Aflatoxina B1	1,5	5,0
	Aflatoxina B2	1,5	5,0
	Aflatoxina G1	1,5	5,0
	Aflatoxina G2	3,0	10,0
Metabólitos de <i>Alternaria</i>	Alternariol	5,0	15,0
Metabólitos de <i>Aspergillus</i>	Glicotoxina	20,0	60,0
	Esterigmatocistina	0,3	1,0
Tricotecenos tipo A	Diacetoxiscirpenol	3,0	10,0
	HT-2 Toxina	15,0	50,0
	Neosolaniol	3,0	10,0
	T-2 Toxina	10,0	30,0
	T-2 Triol	25,0	75,0
	T-2-Tetraol	100,0	300,0
Tricotecenos tipo B	15 Acetoxiscirpenol	10,0	30,0
	15 Acetil Desoxinivalenol	50,0	150,0
	3 Acetil Desoxinivalenol	50,0	150,0
	Desoxinivalenol	75,0	250,0
	Desoxinivalenol-3-Glicosídeo	15,0	50,0
	Nivalenol	100,0	300,0
Eniatinas e Beauvericina	Beauvericina	0,15	0,5
	Eniatina A	0,5	2,0
	Eniatina A1	0,5	2,0
	Eniatina B	1,0	3,0
	Eniatina B1	0,5	2,0

LOD, limite de deteção; LOQ, limite de quantificação.

Tabela 4 - Micotoxinas avaliadas no estudo pelo método HPLC-MS/MS e seus LOD e LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (RomerLabs, 2022) (Continuação).

Classe/Grupo	Micotoxinas	LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Alcalóides do Ergot	Agroclavina	0,3	1,0
	Alpha-Ergocristina	1,0	3,0
	Alpha-Ergocriptina	1,0	3,0
	Dihidrolisergol	5,0	15,0
	Elimoclavina	1,0	3,0
	Ergina	1,5	5,0
	Ergocornina	1,0	3,0
	Ergocorninina	1,0	3,0
	Ergocristina	1,5	5,0
	Ergocristinina	1,0	3,0
	Ergometrina	1,0	3,0
	Ergometrinina	1,0	3,0
	Ergosina	1,0	3,0
	Ergotamina	2,0	6,0
Fumonisinias	Fumonisina B1	10,0	30,0
	Fumonisina B2	10,0	30,0
	Fumonisina B3	10,0	30,0
Outros metabolitos de <i>Fusarium</i>	Fusarenona X	30,0	100,0
	Moniliformina	10,0	30,0
Ocratoxinas	Ocratoxina A	1,5	5,0
	Ocratoxina B	0,5	2,0
Metabolitos de <i>Penicillium</i>	Ácido Micofenólico	40,0	120,0
	Patulina	100,0	300,0
	Ácido Penicílico	7,5	25,0
	Roquefortine C	2,0	6,0
Zearalenona e Metabolitos	Alpha-Zearalenol	3,0	10,0
	Beta-Zearalenol	6,0	20,0
	Zearalanona	0,5	2,0
	Zearalenona	5,0	25,0

LOD, limite de detecção; LOQ, limite de quantificação.

Para avaliação do tamanho das partículas da TMR foi utilizado um PSPS caracterizado por ser um sistema de caixas perfuradas com orifícios de diferentes diâmetros que separam percentualmente o alimento estratificado após a movimentação do conjunto. Cada bandeja possui perfurações com um diâmetro diferente (Tabela 5): a primeira bandeja retém partículas com diâmetro superior a 19 mm, a segunda bandeja retém partículas com diâmetro entre 19 e 8 mm, a terceira bandeja retém partículas de 8 a 1,18 mm e a última bandeja com fundo fechado, retém partículas com diâmetro inferior a 1,18 mm. Depois de separadas, as quantidades foram registradas e foi calculado o tamanho médio das partículas da TMR.

Tabela 5 - Descrição da granulometria dos vários crivos do PSPS, com os respectivos valores padrão. Adaptado de Heinrichs, (2013).

Caixa	Granulometria	TMR
Caixa superior	≥ 19 mm	2 a 8 %
Segunda caixa	≥ 8 e < 19 mm	30 a 50 %
Terceira caixa	≥ 1,18 e < 8 mm	10 a 20 %
Caixa inferior	< 1,18 mm	30 a 40 %

## 2.4 Análise dos Fatores Reprodutivos dos animais em Amostra

Os Fatores Reprodutivos dos bovinos leiteiros em amostragem foram recolhidos com recurso ao programa Boviform<sup>®</sup> que compila os dados avaliados pelos técnicos da área de reprodução da AASM em campo, tendo em conta o número de lactações, intervalo entre parto inseminação artificial/ cobrição natural, data e número de inseminações artificiais até concepção.

## 2.5 Determinação das micotoxinas em leite

Após a análise do alimento, foi escolhida a determinação de ZEA no leite por se tratar da micotoxina com maior frequência e níveis de contaminação na TMR analisada. Foram analisadas um total de 84 amostras de leite. Foi utilizado um imunoensaio enzimático (ELISA; RIDASCREEN<sup>®</sup> Zearalenone R1401 R-Biopharm AG<sup>®</sup>, Alemanha) com limite de deteção (LOD) de 0,06 µg/L. A preparação da amostra e o procedimento do teste foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, em particular da nota de aplicação na matriz leite. De forma breve, 12,0 ml de cada amostra foi centrifugada durante 15 minutos, o que possibilitou a remoção da nata criada na camada superior. Para a total remoção da nata ser assegurada foi realizada uma segunda centrifugação de 6,0 ml da amostra durante mais 15 minutos. Após esta separação foram adicionados 20 µl de glucuronidase / arilsulphatase *Helix pomatia* (Merck, Art. No.: 4114) a 1,0 ml de amostra. Esta solução foi posteriormente incubada durante 3 h a 37 °C. Após a incubação, foi adicionado 0,1 ml de metanol a 0,9 ml do leite hidrolisado e desnatado. Em cada poço de ensaio foram colocados 50 µl da mistura. Também a solução padrão foi preparada de acordo com as instruções do fabricante.

## 2.6 Análise de contraste leiteiro

Os parâmetros físico-químicos e de qualidade sanitária do leite foram avaliados tendo por base o contraste leiteiro. A determinação da produção de leite de cada vaca foi efetuada através de medidores volumétricos na sala de ordenha. No laboratório da AASM foi efetuada a contagem das células somáticas (CCS), pelo método fluoro-opto-eletrónico, com o equipamento Fossomatic FC<sup>®</sup>, que também utiliza a tecnologia da citometria de fluxo.

Tal como os parâmetros anteriores, a composição do leite das amostras sujeitas a contraste leiteiro foram analisadas num equipamento automático, Milkoscan FT 6000. Além da gordura, proteína, lactose e extrato seco desengordurado, foi ainda determinada a ureia e o ponto de congelação. A calibração para cada um dos parâmetros foi efetuada pelos métodos oficiais de referência (ALIP, 2ex008).

## 2.7 Avaliação de risco

Nos bovinos, a ingestão diária estimada de micotoxinas (EDI, do Inglês *Estimated Daily Intake*) foi calculada através da seguinte fórmula:  $EDI = (ZEA \times C) / K$ , na qual ZEA corresponde à concentração de ZEA nas amostras de alimento analisadas ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ), C corresponde à ingestão média diária estimada por bovino leiteiro e K ao peso médio por vaca (Driehuis *et al.*, 2008). A ingestão diária estimada de micotoxinas foi avaliada de acordo com três cenários distintos, cenário médio (considerando o teor médio determinado), o pior cenário (considerando o teor mais elevado) e o melhor cenário (considerando o teor mais baixo).

Em humanos o Painel Científico dos Contaminantes na Cadeia Alimentar da EFSA estabeleceu uma TDI para ZEA de  $0,250 \mu\text{g}/\text{kg}$  peso corporal/dia (EFSA, 2011). A EDI resultante do consumo do leite analisado por humanos foi avaliada de acordo com a fórmula indicada anteriormente. Consideraram-se duas faixas etárias distintas: de uma criança de 4 anos (percentil 50; 16 kg-Ministério da Saúde; Direção geral de Saúde, 2006), com a ingestão de um litro de leite diário e de um adulto (69 kg; Arezes *et al.*, 2006) de acordo com a ingestão diária média estipulada pelo INE (0,32 litros de leite diário (INE, 2021). Para ambas as faixas etárias, foram considerados três cenários (médio, melhor e pior), conforme descrito anteriormente.

Para a caracterização do risco resultante da exposição estimada, foi determinado o Quociente de Perigo (HQ, do Inglês *Hazard Quotient*), definido como o rácio da potencial exposição a um contaminante e o nível no qual são esperados efeitos adversos (Goumenou & Tsatsakis, 2019) pela fórmula:  $HQ = EDI / TDI$ . Se o valor obtido for superior a 1, considera-se que a exposição representa uma preocupação em Saúde Pública.

## 2.8 Análise estatística

Para a análise estatística, os dados de amostragem foram codificados, transferidos para Excel (Microsoft Excel 2013) e analisados através do programa SAS® 9.1 (SAS® Institute Inc., Cary, NC, USA) (Copyright® 2019 SAS Institute Inc, 2019). Através do PROC MEANS e do PROC FREQ do programa SAS®, procedeu-se à determinação de algumas estatísticas descritivas dos parâmetros de dias em lactação (DEL), idade ao parto, produção leiteira (PL), teor butiroso (TB), teor proteico (TP), CCS e ureia para caracterizar os dados disponíveis. Posteriormente, através do PROC CORR do programa SAS®, procedeu-se à estimativa dos coeficientes de correlação entre os parâmetros estudados. De seguida a PL, TB, TP, CCS e Ureia foram analisados individualmente com um modelo linear, através do PROC GLM do programa SAS®, que incluiu inicialmente os efeitos do produtor, ano e época de parto, o efeito linear e quadrático da idade ao parto e o efeito linear e quadrático do DEL. Na análise referente ao ano de 2022 foi utilizada como variável em estudo os valores de ZEA no leite das amostras. Todas as variáveis, com exceção da CCS, cujo modelo não era significativo ( $P > 0,05$ ), foram novamente analisadas individualmente com um modelo linear, através do PROC GLM do programa SAS®, que incluiu apenas os efeitos significativos ( $P < 0,05$ ). Por último, estimaram-se as médias dos quadrados mínimos dos parâmetros segundo os fatores que as influenciaram significativamente.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Análise do Alimento dos animais

O resultado da análise para a presença de micotoxinas nas amostras de TMR é apresentado na Tabela 6. Em todas as explorações, o alimento apresentava contaminação por mais que uma micotoxina, com níveis detetáveis de ZEA e FUM. A micotoxina NIV foi detetada em duas das explorações e micotoxinas do tipo Eniatina foram encontradas em três das explorações em estudo. No caso da exploração #3, a ZEA foi detetada, contudo num teor inferior ao limite de quantificação (LOQ), pelo que o valor apresentado corresponde a metade do LOQ. A deteção de ZEA e FUM no alimento em estudo vai de encontro aos dados reportados em estudos recentes efetuados na Europa. Segundo o relatório da empresa BIOMIN®, relativamente à contaminação de alimento destinado ao consumo animal, na Europa, no segundo trimestre de 2021, a micotoxina com maior prevalência foi o DON (53 %), seguido pela ZEA (50 %) e as FUM (42 %) (BIOMIN, 2021). Na Polónia, o DON e ZEA foram as micotoxinas mais comuns em amostras de silagem de milho (97,3 % e 98,4 % respetivamente) (Twarużek *et al.*, 2021). Num estudo realizado em Espanha (Rodríguez-Blanco *et al.*, 2020), num total de 193 amostras de TMR, 112 amostras (58 %) estavam contaminadas com pelo menos uma micotoxina e 38 amostras (20 %) apresentavam mais de uma micotoxina. O DON foi detetado em 17 % das amostras e a ZEA foi detetada em 16 % das amostras. Segundo o RASFF, as micotoxinas do tipo *Fusarium sp.* não têm sido identificadas na Europa como micotoxinas com elevada frequência, contrariamente às Aflatoxinas (RASFF, 2020).

A presença de micotoxinas produzidas por *Fusarium sp.*, indica a existência deste fungo nas explorações incluídas no presente estudo. A contaminação por micotoxinas produzidas por este género fúngico ocorre geralmente antes da colheita e pode ser justificada pelas condições climáticas do ano de estudo. O grupo oriental dos Açores, ao qual pertence a ilha de S. Miguel, caracteriza-se por ter um clima do tipo Csb (clima temperado com verão seco e suave), uma elevada humidade e elevada precipitação, para além de uma temperatura estável, que varia entre os 15 e 25 °C e que favorece a proliferação fúngica (Carvalho *et al.*, 2020).

O teor de humidade no alimento não variou muito entre explorações (Tabela 6), com a exploração #2 a alcançar o valor mais elevado de humidade (68,7 %) e a exploração #4 com o menor valor (63,5 %). Em relação às práticas de conservação do alimento em cada exploração, a exploração #3, na qual se verificaram os teores mais baixos de micotoxinas produzidas por *Fusarium sp.*, destaca-se de forma positiva. Nesta exploração a TMR é preparada para que as pás de carregamento efetuem uma única incisão diária no silo de milho, não deixando partículas de alimento separadas no fundo do silo de um dia para o outro. Tal poderia contribuir para o aumento da temperatura do silo, devido ao processo de fermentação das partículas separadas. Por outro lado, nesta exploração #3 a silagem de milho encontra-se permanentemente coberta, à exceção do momento diário de recolha do alimento. Verificou-se ainda que o tempo entre a formulação e a distribuição aos animais foi sempre o menor e, adicionalmente, o silo de milho o silo de erva não apresentavam nenhuma zona visível de proliferação de fungos. Contrariamente, as restantes explorações (#1, #2, #4) não mantinham a silagem coberta durante o dia e procediam a uma remoção das áreas com fungos visíveis antes da administração do alimento aos animais. É de realçar que a exploração #1 se distingue das restantes, por apresentar um

regime de produção intensiva. É a única exploração em estudo na qual os animais não têm acesso ao pasto, o que pode resultar num maior risco de exposição a micotoxinas na TMR.

No que diz respeito aos valores de orientação recomendados pela Comissão Europeia (Comissão Europeia, 2006) apenas a exploração #1 excedeu os limites de orientação (500 µg/kg) relativamente à ZEA, uma vez que foi determinada a concentração de  $3020 \pm 1200$  µg/kg. O valor indicado, segundo a mesma recomendação (Comissão Europeia, 2006) para fumonisina B1+B2 (50000 µg/kg) não foi ultrapassado. A alimentação dos bovinos leiteiros contém uma elevada proporção de silagem, pelo que embora as explorações dos Açores possam ter acesso diário às pastagens, verifica-se que existe uma exposição a valores detetáveis de micotoxinas pela ingestão de TMR.

Tabela 6 - Micotoxinas com teores detetáveis ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) no TMR, avaliadas pelo método HPLC-MS/MS, com indicação dos respectivos LOD, LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e teor de humidade (%) presente na TMR; (RomerLabs, 2022).

Identificação da Exploração	Micotoxinas detetáveis	Teor de micotoxinas $\mu\text{g}/\text{kg}$	LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Teor de Humidade (%)
1	Esterigmatocistina	$2,1 \pm 0,4$	0,3	1	$65,9 \pm 13$
	Nivalenol	$1210 \pm 240$	100	300	
	Enniatina B	$7,4 \pm 1,5$	1	3	
	Fumonisina B1	$355 \pm 71$	10	30	
	Fumonisina B2	$125 \pm 25$	10	30	
	Fumonisina B3	$31,1 \pm 6,2$	10	30	
	Alfa-Zearalenol	$52,2 \pm 10$	3	10	
	Zearalanona	$53,4 \pm 21$	0,5	2	
	Zearalenona	$3020 \pm 1200$	5	25	
2	Nivalenol	$417 \pm 83$	100	200	$68,7 \pm 14$
	Eniatina A1	$7,9 \pm 3,2$	0,5	2	
	Eniatina B	$312 \pm 62$	1	3	
	Eniatina B1	$44,3 \pm 18$	0,5	2	
	Fumonisina B1	$246 \pm 49$	10	30	
	Fumonisina B2	$79,0 \pm 16$	10	30	
	Zearalenona	$205 \pm 82$	5	25	
3	Eniatina A1	$2,0 \pm 0,8$	0,5	2	$63,8 \pm 13$
	Eniatina B	$9,3 \pm 1,9$	1	3	
	Eniatina B1	$2,7 \pm 1,1$	0,5	2	
	Fumonisina B1	$39,8 \pm 8$	10	30	
	Zearalenona	$12,5^*$	5	25	
4	Alternariol	$15,0 \pm 3$	5	15	$63,5 \pm 13$
	Fumonisina B1	$205 \pm 41$	10	30	
	Fumonisina B2	$77,6 \pm 16$	10	30	
	Zearalenona	$126 \pm 51$	5	25	

\*1/2 LOQ

### 3.1.1 Avaliação com o Crivo de Penn State

Os valores obtidos para o tamanho de partícula foram bastante variáveis entre as explorações e não correspondem aos valores recomendados, conforme se pode verificar na Tabela 7.

A TMR em estudo poderá não estar a influenciar a saúde do rúmen devido ao tamanho das partículas, mas sim pela falta de uniformidade existente. Relativamente ao crivo superior de Penn State, nenhuma das explorações apresenta os valores recomendados, possuindo partículas  $\geq 19\text{mm}$  em percentagens até seis vezes superiores. Estas partículas de maior dimensão formam uma estratificação ruminal, ao flutuarem no rúmen, e fornecem material que exige uma digestão mecânica adicional substancial, levando ao aumento da produção de saliva e à criação de um tampão ruminal que mantém o pH em níveis saudáveis para o animal. Por outro lado, quando as partículas de alimento são muito longas, os animais são mais propensos a selecioná-las, o que pode conduzir à ingestão de uma mistura alimentar muito diferente da originalmente formulada. Assim, a seleção de alimento leva a uma flutuação de pH ao longo do dia, o que pode afetar a ingestão, a fermentação e a digestão em geral (Heinrichs, 2013). Relativamente ao crivo médio, para o qual é recomendado uma proporção de 30 a 50 % das partículas de TMR, verificou-se que apenas a exploração #1 e #4 respeitam o intervalo recomendado. O crivo médio é constituído principalmente por partículas de forragem que farão parte

da estratificação ruminal, mas que serão decompostas mais rapidamente para permitir uma degradação microbiana mais rápida no rúmen. Para o penúltimo crivo, o crivo inferior, o intervalo ideal situa-se entre 10 a 20 %, sendo que apenas a exploração #1 não cumpriu com as especificações. Por fim, em nenhuma das explorações se verificou o cumprimento dos valores recomendados (entre 30 % e 40 %) na base do conjunto que suporta os diferentes crivos. Em suma quando há falta de homogeneidade dos constituintes alimentares ou quando existe uma percentagem superior a 8 % de partículas de maior diâmetro, ocorre uma seleção, pelos bovinos, de partículas menores que passam rapidamente pelo rúmen, diminuindo o tempo de permanência do alimento no trato gastrointestinal e, em resultado, reduzindo a potencial degradação das micotoxinas pela microbiota.

Tabela 7 - Resultados do PSPS da TMR nas diferentes explorações e os respetivos valores de referência (%).

Identificação da Exploração	Percentagem de partículas da TMR (%)				
	≥ 19 mm	≥ 8 e < 19 mm	≥ 1,18 e < 8 mm	< 1,18 mm	
#1	56	33	5	6	
#2	66	21	10	5	
#3	47	27	17	9	
#4	39	41	11	9	
Total	Mínimo	39	21	5	5
	Máximo	66	41	17	9
	Média	52	30,5	10,75	7,25
Valores recomendados *	2 a 8	30 a 50	10 a 20	30 a 40	

\* (Heinrichs, 2013)

### 3.2 Avaliação das micotoxinas em leite

Oitenta e três (98,8 %) das amostras de leite em estudo apresentaram valores detetáveis de ZEA (LOD: 0,06 µg/L), com um teor médio de 1,56±1,36 µg/L (Tabela 8). Os valores desta micotoxina no leite apresentaram o mesmo padrão identificado na contaminação de ZEA no alimento, (Exploração#1>#2>#4>#3), como era expectável. A exploração #1, com o teor mais elevado de ZEA no alimento, é a que possui teores mais elevados dessa micotoxina no leite, tendo inclusivamente teores acima da capacidade de quantificação do método imunoenzimático ELISA aplicado (>4,455 µg/L; Tabela 8). A ZEA não é uma das micotoxinas com maior frequência de contaminação no leite e seus derivados, conforme confirmado pela consulta do sistema RASFF (RASFF, 2020). Por outro lado, são escassos os estudos que relataram contaminação de laticínios por ZEA. Num estudo de fórmulas infantis à base de leite realizado na Itália, (Meucci *et al.*, 2011) detetaram ZEA em 9 % (máximo: 0,76 µg/L; LOD: 0,02 µg/L), α- ZEA em 26 % (máximo: 12,91 µg/L; LOD: 0,02 µg/L) e β- ZEA em 28 % (máximo: 73,24 µg/L; LOD: 0,2 µg/L) das amostras. Adicionalmente, verificaram-se variações significativas nos níveis de metabolitos ZEA das marcas de fórmulas infantis avaliadas. Segundo os autores, tal poderia ser atribuído às diferentes práticas de produção e provavelmente à variação na

qualidade das matérias-primas utilizadas. Na Argentina, (Signorini *et al.*, 2012) estimaram uma concentração média de ZEA de 0,125 µg/L no leite cru. No presente estudo, setenta e nove animais apresentaram uma concentração de ZEA no leite cru superior ao teor reportado neste estudo realizado na Argentina. Num outro estudo, realizado na China, (Huang *et al.*, 2014) observaram a ocorrência de ZEA em amostras de leite cru, leite pasteurizado e leite em pó. Apesar do LOD ser aproximadamente dez vezes menor que o obtido por Meucci *et al.* (2011), a proporção de amostras de leite em pó contaminadas foi semelhante, 23,3 %, 16,7 % e 25 %, respectivamente.

Tabela 8 – Frequência e teores (µg/L) de Zearalenona nas amostras de leite das explorações em estudo.

	Exploração #1	Exploração #2	Exploração #3	Exploração #4	Total
n	22	10	27	25	84
Frequência de contaminação (%)	100	100	96,3	100	83 (98,8 %)
Mínimo	1,23	0,48	< LOD	0,31	< LOD
Máximo	>4,46 <sup>a</sup>	2,15	1,37	2,43	>4,46 <sup>a</sup>
Média±DP	3,53±0,85	1,15±0,62	0,48±0,39	1,15±0,61	1,56±1,36

<sup>a</sup> Superior ao valor máximo de quantificação do método utilizado; DP, desvio padrão; LOD, Limite de Detecção=0,06 µg/L

### 3.3 Associação a fatores produtivos e reprodutivos

A análise estatística (SAS®) da correlação entre a concentração de ZEA e os diferentes indicadores produtivos obtidos pelo contraste leiteiro e reprodutivos obtidos pelo Boviform®, mostrou não existir uma correlação positiva significativa ( $P \geq 0,05$ ) entre os níveis de ZEA e produção leiteira ( $P= 0,60$ ), teor butiroso ( $P= 0,17$ ), teor proteico ( $P= 0,75$ ), número de células somáticas ( $P= 0,52$ ) e ureia ( $P= 0,53$ ). Os dados mostraram uma correlação positiva significativa dos valores de dias em leite com os valores de ureia e teor proteico como esperado segundo a bibliografia (Aquino *et al.*, 2007).

No que diz respeito aos dados avaliados referentes aos indicadores reprodutivos, os dias em leite demonstraram uma correlação com ( $P= 0,09$ ), número de lactações ( $P= 0,32$ ), número de inseminações ( $P=0,44$ ) e intervalo entre parto e inseminação de ( $P=0,73$ ).

O produtor foi o fator que mais fez variar os dados em estudo tendo uma correlação positiva significativa com a produção leiteira e os dias em leite ( $P<0,01$ ).

Os produtores desempenham um papel vital na gestão e manejo da exploração, como observado neste estudo, pelo que a sua formação e cuidados com o manejo pode ser um dos fatores essenciais para o sucesso da rentabilidade e saúde dos animais em produção.

### 3.4 Avaliação de risco

Como esperado, considerando os teores de contaminação de ZEA, determinados nas amostras de alimento, a ingestão diária estimada de micotoxinas, nos bovinos destacou a exploração #1, com uma ingestão de 260 µg/kg pc/dia, seguida da exploração #2, com 14,8 µg/kg pc/dia, da exploração #4, com 6,08 µg/kg pc/dia, e, por último, da exploração #3, com o EDI mais baixo de 1,03 µg/kg pc/dia.

Na Tabela 8 encontra-se sistematizada a ingestão diária estimada de ZEA, através do consumo de leite, considerando que o tratamento térmico a que será sujeito não influenciará o respetivo teor, pelo facto das micotoxinas serem termorresistentes. Conforme descrito anteriormente, foram consideradas duas situações: o consumo por crianças de 4 anos (considerando o percentil 50) e o consumo por parte de um adulto. Foi ainda considerado que o Painel Científico dos Contaminantes na Cadeia Alimentar da EFSA que estabeleceu uma TDI para ZEA de 0,25 µg/kg peso corporal/dia. Verificou-se que o consumo de leite proveniente das quatro explorações em estudo representa um nível aceitável (HQ<1) relativamente à exposição à ZEA Contudo, realça-se que existem outros alimentos que podem contribuir para a exposição à ZEA, para além do consumo de leite. O consumo de leite com o teor mais elevado determinado na exploração #1 (pior cenário), na faixa etária criança, representa um HQ superior a 1, e, portanto, uma preocupação para a Saúde Pública.

Tabela 9 - Valores de Ingestão Diária Estimada (µg /kg peso corporal/dia) de ZEA a partir do leite em estudo no caso de crianças (4 anos; percentil 50) e adultos.

Faixa Etária	Cenário	Exploração #1		Exploração #2		Exploração #3		Exploração #4	
		EDI <sup>a</sup>	HQ	EDI <sup>a</sup>	HQ	EDI <sup>a</sup>	HQ	EDI <sup>a</sup>	HQ
Criança 4 anos Sexo masculino 16 kg	Melhor	0,077	0,308	0,030	0,120	0,003	0,012	0,019	0,076
	Pior	0,278	1,112	0,134	0,536	0,085	0,340	0,151	0,604
	Médio	0,220	0,880	0,072	0,288	0,029	0,116	0,071	0,284
Adulto 30 anos Sexo Feminino 69 kg	Melhor	0,006	0,024	0,002	0,008	0,0002	0,0008	0,001	0,004
	Pior	0,021	0,084	0,009	0,036	0,006	0,024	0,011	0,044
	Médio	0,016	0,064	0,005	0,020	0,002	0,008	0,005	0,020

<sup>a</sup> µg/kg peso corporal/dia.

#### 4. Considerações finais.

No presente estudo verificou-se que embora as explorações em regime semi-intensivo dos Açores se caracterizem por recorrerem ao pastoreio ao ar livre, a TMR ainda possui um papel importante no manejo alimentar destes animais e consequentemente na presença de micotoxinas no alimento fornecido aos bovinos leiteiros. Desta forma as explorações em regime intensivo podem aumentar substancialmente a exposição às micotoxinas por parte dos animais e, indiretamente dos humanos. No binómio produtor-animal, verificou-se que a formação do produtor é essencial para a rentabilidade e saúde dos animais em produção. Uma boa prática de conservação dos alimentos é fundamental para a segurança e qualidade dos mesmos.

Foi detetado no alimento um teor de contaminação médio na TMR por ZEA de 840,86 ± 1259,98 µg/kg. O leite analisado apresentou um teor de contaminação médio de 1,56±1,36 µg/L com setenta e nove animais a apresentarem um teor médio de ZEA no leite cru superior ao reportado em estudos anteriores.

O HPLC, método utilizado para determinação de ZEA nas amostras de TMR, tem sido amplamente utilizado devido ao seu elevado poder de separação, elevada sensibilidade e reprodutibilidade, facilidade de uso, adequação para automatização e capacidade de acoplar com diferentes detetores. Em contrapartida, a técnica de ELISA, utilizada para a análise da ZEA no leite apresenta níveis de detecção satisfatórios. É uma técnica de elevado rendimento e sensibilidade que requer uma pequena quantidade de amostra na sua preparação. Uma das limitações do presente estudo foi o número de amostras que foi possível analisar. A realização de apenas uma colheita, num único momento temporal, pode limitar as possíveis correlações com indicadores produtivos, pelo que se sugere que em estudos futuros seja efetuado um estudo longitudinal, no qual possa ser monitorizada a contaminação por micotoxinas e o contraste leiteiro dos animais em estudo, por um período de pelo menos seis meses.

No que diz respeito à avaliação de risco, este estudo demonstra um nível aceitável de exposição humana com exceção do consumo de leite com o teor máximo determinado (4,46 µg/L), por crianças (HQ=1,112), o que representa um risco intolerável para a saúde pública. O presente estudo reforça, por isso, a necessidade de um maior controlo para diminuir a contaminação e assim os efeitos tóxicos das micotoxinas como a ZEA, considerada um disruptor endócrino, pelos seus efeitos estrogénicos.

Do conhecimento dos autores, este é o primeiro estudo de determinação de ZEA em alimentos destinados a bovinos e no leite produzido, com análise da potencial associação a fatores produtivos. No entanto são necessários mais estudos para avaliar a importância da ZEA, na exposição humana e bovina e o seu possível impacto em indicadores produtivos leiteiros.

## Referências Bibliográficas

- ALIP. (2008). Classificação do leite na produção. *Segurança e Qualidade Alimentar*, 19–21.
- Alonso, V. A., Pereyra, C. M., Keller, L. A. M., Dalcerro, A. M., Rosa, C. A. R., Chiacchiera, S. M., & Cavaglieri, L. R. (2013). Fungi and mycotoxins in silage: An overview. *Journal of Applied Microbiology*, 115(3), 637–643. <https://doi.org/10.1111/jam.12178>
- Aquino, A. A., Botaro, B. G., Ikeda, F. dos S., Rodrigues, P. H. M., Martins, M. de F., & Santos, M. V. dos. (2007). Efeito de níveis crescentes de uréia na dieta de vacas em lactação sobre a produção e a composição físico-química do leite. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36(4), 881–887. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982007000400018>
- Arezes, P. M., Barroso, M. P., Cordeiro, P., Costa, L. G. da, & Miguel, A. S. S. R. (2006). *Estudo Antropométrico População Portuguesa*. 51.
- Bakirdere, S., Bora, S., Bakirdere, E. G., Aydin, F., Arslan, Y., Komesli, O. T., Aydin, I., & Yildirim, E. (2012). Aflatoxin species: Their health effects and determination methods in different foodstuffs. *Central European Journal of Chemistry*, 10(3), 675–685. <https://doi.org/10.2478/s11532-012-0009-2>
- BIOMIN. (2021). *Resultados da Pesquisa de micotoxinas da BIOMIN no 2º trimestre de 2021 | biomin.net*. <https://www.biomin.net/br/science-hub/resultados-da-pesquisa-de-micotoxinas-da-biomin-no-2o-trimestre-de-2021/>
- Buszewska-Forajta, M. (2020). Mycotoxins, invisible danger of feedstuff with toxic effect on animals. *Toxicon*, 182(May), 34–53. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.04.101>
- Carvalho, F., Meirelles, M., Henriques, D., & Navarro, P. (2020). Alterações Climáticas e Energia no contexto dos Açores. *Boletim Do Núcleo Cultural Da Horta*, 29, 95–108.
- Comissão Europeia. (2006). *RECOMENDAÇÃO DA COMISSÃO, de 17 de Agosto de 2006, sobre a presença de desoxivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 e HT-2 e fumonisinas em produtos destinados à alimentação animal*. 2005–2007. <http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/>
- Comissão Europeia. (2009). *REGULAMENTO (CE) N.º 152/2009 DA COMISSÃO de 27 de Janeiro de 2009 que estabelece os métodos de amostragem e análise para o controlo oficial dos alimentos para animais*.
- Comissão Europeia. (2016). *RECOMENDAÇÃO (UE) 2016/1319 DA COMISSÃO. RECOMENDAÇÃO (UE) 2016/1319 DA COMISSÃO de 29 de Julho de 2016*, 2018(4), 210–230.
- Coppock, R. W., Mostrom, M. S., Sparling, C. G., Jacobsen, B., & Ross, S. C. (1990). Apparent zearalenone intoxication in a dairy herd from feeding spoiled acid-treated corn. In *Veterinary and Human Toxicology* (Vol. 32, Issue 3, pp. 246–248). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2141202/>
- Direcção geral de Saúde. (2006). *Curvas de crescimento*. 1–14.

<http://www.monografias.com/trabajos76/estadisticas-estado-computadores-laboratorio/estadisticas-estado-computadores-laboratorio2.shtml>

- Driehuis, F., Spanjer, M. C., Scholten, J. M., & Te Giffel, M. C. (2008). Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. *Journal of Dairy Science*, *91*(11), 4261–4271. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1093>
- EFSA. (2011). Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA Journal*, *9*(6), 1–124. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2197>
- Fink-Gremmels, J. (2008). The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *Veterinary Journal*, *176*(1), 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.034>
- Goryacheva, I. Y., de Saeger, S., Eremin, S. A., & van Peteghem, C. (2007). Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection: Evolution from single to multiple analyte screening: A review. *Food Additives and Contaminants*, *24*(10), 1169–1183. <https://doi.org/10.1080/02652030701557179>
- Goumenou, M., & Tsatsakis, A. (2019). Proposing new approaches for the risk characterisation of single chemicals and chemical mixtures: The source related Hazard Quotient (HQS) and Hazard Index (HIS) and the adversity specific Hazard Index (HIA). *Toxicology Reports*, *6*, 632–636. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2019.06.010>
- Heinrichs. (2013). *Penn State Particle Separator*. 1–16.
- Huang, L. C., Zheng, N., Zheng, B. Q., Wen, F., Cheng, J. B., Han, R. W., Xu, X. M., Li, S. L., & Wang, J. Q. (2014). Simultaneous determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol in milk by UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, *146*, 242–249. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.047>
- IARC. (1993). Some Naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, *56*, 403. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2017.06.004>
- INE. (2021). *Portal do INE*. [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_indicadores&indOcorrCod=0008609&contexto=bd&selTab=tab2&xlang=pt](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0008609&contexto=bd&selTab=tab2&xlang=pt)
- Kiessling, K., Pettersson, H., Sandholm, K., & Olsen, M. (1984). Metabolism of Aflatoxin, Ochratoxin, Zearalenone,. *Environmental Microbiology*, *47*(5), 1070–1073.
- Lourenço, H. M. (2016). *Comportamento do contraste leiteiro na ilha de são Miguel*. AASM-CUA. <http://aasm-cua.com.pt/aDefInfTec.asp?ID=128#>
- Meucci, V., Soldani, G., Razzuoli, E., Saggese, G., & Massart, F. (2011). Mycoestrogen pollution of Italian infant food. *The Journal of Pediatrics*, *159*(2). <https://doi.org/10.1016/J.JPEDI.2011.01.028>
- Moreira, B. (2015). *Faculdade de Medicina Veterinária Faculdade de Medicina Veterinária*. 63.

<https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/1408>

- Moss, M. O., & Thrane, U. (2004). Fusarium taxonomy with relation to trichothecene formation. *Toxicology Letters*, 153(1), 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.021>
- Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia. (2002). DIRECTIVA 2002/32/CE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 7 de Maio de 2002 relativa às substâncias indesejáveis nos alimentos para animais. *Jornal Oficial Das Comunidades Europeias*, 140, 10–21.
- RASFF. (2020). The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) Annual Report 2020. In *Office of the European Union, 2021*. <http://www.ssrn.com/abstract=1152122>
- Rodríguez-Blanco, M., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2020). Fusarium mycotoxins in total mixed rations for dairy cows. *Mycotoxin Research*, 36(3), 277–286. <https://doi.org/10.1007/s12550-020-00390-z>
- Schrenk, D., Bignami, M., Bodin, L., Chipman, J. K., Mazo, J., Grasl-kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L. R., Nebbia, C. S., Nielsen, E., Ntzani, E., Petersen, A., Sand, S., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Marko, D., Oswald, I. P., Routledge, M., Schlatter, J., ... Gergelova, P. (2020). *Opinião científica*. 18(3).
- Scudamore, K. A., & Livesey, C. T. (1998). Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(1), 1–17. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199805\)77:1<1::AID-JSFA9>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199805)77:1<1::AID-JSFA9>3.0.CO;2-4)
- Signorini, M. L., Gaggiotti, M., Molineri, A., Chiericatti, C. A., Zapata de Basílico, M. L., Basílico, J. C., & Pisani, M. (2012). Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina. *Food and Chemical Toxicology*, 50(2), 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.09.036>
- Streit, E., Schwab, C., Sulyok, M., Naehrer, K., Krska, R., & Schatzmayr, G. (2013). Multi-mycotoxin screening reveals the occurrence of 139 different secondary metabolites in feed and feed ingredients. *Toxins*, 5(3), 504–523. <https://doi.org/10.3390/toxins5030504>
- Twarużek, M., Skrzydlewski, P., Kosicki, R., & Grajewski, J. (2021). Mycotoxins survey in feed materials and feedingstuffs in years 2015–2020. *Toxicon*, 202(August), 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.09.005>
- Weaver, G. A., Kurtz, H. J., Behrens, J. C., Robison, T. S., Seguin, B. E., Bates, F. Y., & Mirocha, C. J. (1986). Effect of zearalenone on the fertility of virgin dairy heifers. *American Journal of Veterinary Research*, 47(6), 1395–1397. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2942065/>

