



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Determinação de Aflatoxina M1 em leite e queijo dos Açores

Nuno Miguel Estrela Rego

Coimbra, julho 2021



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Determinação de Aflatoxina M1 em leite e queijo dos Açores

Coimbra, julho 2021

Nuno Miguel Estrela Rego

Aluno do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Constituição do Júri

Presidente do Júri: Professora Doutora Anabela
Maduro de Almeida Francisco

Arguente: Professora Doutora Angelina Pena

Orientador: Professora Doutora Sofia Alexandra
Giestas Cancela Duarte

Orientador Interno

Professora Doutora Sofia Alexandra
Giestas Cancela Duarte

Coorientador Interno

Professora Doutora Maria Eduarda
Moreno da Silveira

Orientador Externo

Dr. João Vidal
Associação Agrícola de São Miguel

Dissertação do Estágio curricular
dos ciclos de estudo conducentes ao Grau de Mestre em Medicina Veterinária da EUVG

Agradecimentos

Começo por agradecer à Professora Doutora Sofia Duarte por ter aceite ser minha orientadora, pelo auxílio prestado ao longo destes meses, pela enorme ajuda na realização da parte experimental do estudo e pelos esclarecimentos de dúvidas. Tudo isto foi fundamental à elaboração desta dissertação.

À minha coorientadora, Professora Doutora Eduarda Silveira, que sempre esteve disponível para me auxiliar.

À Professora Doutora Anabela Almeida, pelo tempo que despendeu para me ajudar na realização da parte experimental do estudo.

À Associação Agrícola de São Miguel por me acolher durante 6 meses de estágio, bem como, a todos os veterinários que tive a oportunidade de acompanhar e por todo o conhecimento que me transmitiram, nomeadamente Dr. João Vidal, Dr. Pedro, Dr. Nelson e em especial ao Dr. Francisco e a Dr. Joana, que me ajudaram e motivaram.

A todos os meus colegas que me acompanharam ao longo destes 6 anos.

Aos meus amigos, em especial à Sofia Ramos, à Inês Santos, à Barbara Ferreira, à Carla Azevedo, à Mariana Pinheiro e à Maria João por terem tornado estes anos mais fáceis.

À minha irmã, pela força e incentivo durante todos estes anos.

Aos meus sobrinhos que são agora a alegria da casa.

E finalmente aos meus pais, pelo apoio incondicional, que tudo fizeram para que hoje esteja a realizar um sonho de sempre.

Índice

Agradecimentos.....	iv
Índice.....	v
Índice de Figuras	vi
Índice de Tabelas.....	vi
Resumo	2
Palavras chaves:.....	2
<i>Abstract</i>	3
<i>Keywords</i>	3
1. Introdução.....	4
2. Material e métodos.....	6
2.1 Amostragem.....	6
2.2 Materiais e procedimento do teste	6
2.2.1 Preparação de amostra de leite e soro para pesquisa de AFM1.....	6
2.2.2 Preparação de amostra de queijo para pesquisa de AFM1	6
2.2.3 Determinação de AFM1 no leite, soro e queijo.....	7
2.3 Quantificação da AFM1	7
2.4 Cálculo da ingestão diária estimada	7
2.5 Cálculo dos valores extrapolados da concentração de AFB1 na alimentação dos bovinos e caprinos	8
3. Resultados e discussão	8
3.1 Desempenho analítico do método	8
3.2 Resultados das amostras analisadas.....	10
3.3 Estimativa da ingestão diária da AFM1 pelos humanos	17
3.4 Extrapolação da concentração de AFB1 na alimentação dos bovinos e caprinos.....	18
4. Conclusão.....	19
5. Bibliografia.....	19
Anexos	I

Índice de Figuras

Figura 1: Curva padrão considerada para determinação de AFM1 nas amostras de leite e soro.9

Figura 2: Curva padrão considerada para determinação de AFM1 nas amostras de queijo.....9

Índice de Tabelas

Tabela 1: Resultados da determinação de AFM1 nas amostras analisadas de leite, soro e queijo fresco.....10

Tabela 2: Estudos publicados relativamente à contaminação de AFM1 em leite e productos lácteos em Portugal12

Tabela 3: Ocorrência mundial de contaminação por AFM1 no leite14

Tabela 4: Ocorrência mundial de contaminação por AFM1 no queijo.16

Tabela 5: Distribuição de AFM1 em queijo fresco, soro de leite e leite, durante a produção do Queijo fresco.....17

Tabela 6: Cenários de avaliação de exposição e risco por consumo de queijo fresco de acordo com teor de AFM1.....18

Tabela 7: Extrapolação da concentração de AFB1 na alimentação dos bovinos e caprinos em 3 cenários (melhor, intermédio e pior).....18

Lista de abreviaturas e acrónimos

AF: Aflatoxina

AFB1: Aflatoxina B1

AFM1: Aflatoxina M1

CV: Coeficiente de variação

DOP: Denominação de Origem Protegida

ELISA: Ensaio imunoenzimático (do Inglês *Enzyme-linkedimmunosorbent assay*)

FAO: : Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (do Inglês *Food and Agriculture Organization*)

IARC: Agência internacional para a investigação do cancro (do Inglês *The International Agency for Research in Cancer*)

IDE: Ingestão Diária Estimada

INE: Instituto Nacional de Estatística

LM: Limite Máximo

PDI: Ingestão Diária Provável (do inglês Probable Daily Intake)

TDI: Ingestão Diária Tolerável (do Inglês Tolerable Daily Intake)

UE: União Europeia

VHB: Vírus da Hepatite B

Determinação de Aflatoxina M1 em leite e queijo dos Açores

Nuno Rego^a, Sofia Duarte^{a,b,c}, Eduarda Silveira^{a,c}

^aDepartamento de Ciências Veterinárias, Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário- Bloco E, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal (nuno-1996-rego@hotmail.com; sofia.duarte@euvvg.pt; eduardasilveira@euvvg.pt)

^bLAQV-REQUIMTE, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal

^cCentro de Investigação Vasco da Gama, Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário- Bloco E, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal

Resumo

As aflatoxinas (AF) são metabolitos secundários produzidos por fungos do género *Aspergillus* caracterizadas pela sua elevada toxicidade para animais e humanos. No caso dos ruminantes, quando estes ingerem alimento contaminado com AFB₁, esta sofre uma metabolização principalmente no fígado originando outros metabolitos, nomeadamente AFM₁, que é excretada no leite. As AFs, segundo a Agência Internacional para a Investigação do Cancro (IARC), estão incluídas no grupo 1 como agente carcinogénico humano. A AFB₁, a micotoxina com a maior carcinogenicidade conhecida, apresenta comprovada associação à ocorrência de carcinoma hepatocelular, bem como à existência de evidência da sua atuação sinérgica com o vírus da hepatite B (VHB). Sendo impossível fazer a eliminação total da presença 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, controlar os teores presentes nos alimentos. O objetivo do estudo foi avaliar a ocorrência da AFM₁ em leite (bovino e caprino) produzido nos Açores, destinado ao fabrico de queijo fresco. Pretendeu-se ainda determinar o teor de AFM₁ no queijo e soro resultantes, para avaliar a exposição e risco dos consumidores. Para tal foram recolhidos 14 conjuntos de amostras de leite bovino, respetivo queijo fresco e soro resultantes e 6 conjuntos de amostras de leite caprino, respetivos queijos e soro resultantes, perfazendo um total de 60 amostras. Estas foram recolhidas nos meses de março e abril de 2021 e analisadas através do método de um imunoensaio competitivo (Ridascreen, R-biopharm). Verificou-se que, considerando todas as amostras analisadas, a frequência de contaminação e o teor de AFM₁ foi superior nas amostras de queijo (65%; 159,3 ng/L) comparativamente às amostras de leite (15 %; 6,9 ng/L) e soro (5 %; 6,9 ng/L). No caso do queijo de cabra, a frequência de contaminação foi superior e o teor de AFM₁ foi inferior (83,3 %; 116 ng/L) relativamente ao queijo de vaca (57,1%; 186,3 ng/L). Estes resultados são semelhantes aos registados em estudos prévios similares que descrevem um aumento da concentração de AFM₁ em queijos, apesar de não existir, na União Europeia nenhum limite máximo aplicável neste alimento. Na avaliação da exposição humana à AFM₁ pelo consumo de queijo fresco verificou-se que o consumo de queijo fresco de bovino representa um contributo superior, relativamente ao consumo de queijo de cabra. O risco estimado no caso das crianças foi superior aos adultos, sendo identificadas por isso como mais vulneráveis. A concentração estimada de AFB₁ na alimentação animal dos bovinos foi de 0,35 µg/Kg, enquanto nos caprinos foi de 3,99 µg/Kg, e, portanto, inferiores ao Limite Máximo em vigor (5 µg/kg). É recomendada a realização de estudos adicionais, para garantir a monitorização contínua e diminuição do risco associado à exposição humana à AFM₁, em particular dos grupos mais vulneráveis como as crianças.

Palavras chaves: Açores, AFB₁, AFM₁, ELISA, Leite, Queijo-Fresco, Bovino, Caprino.

Abstract

Aflatoxins (AF) are secondary metabolites produced by fungi of the *Aspergillus* genus characterized by their high toxicity to animals and humans. When ruminants ingest AFB1- contaminated feed, it undergoes metabolization mainly in the liver, originating other metabolites, namely AFM1, which is excreted in milk. AF, according to the International Agency for Research on Cancer (IARC), are included in group 1 as a human carcinogen. AFB1, the mycotoxin with the greatest known carcinogenicity, has been shown to be associated with the occurrence of hepatocellular carcinoma, besides the evidence of its synergistic action with the hepatitis B virus (HBV). Since it is impossible to eliminate the presence of mycotoxins, it is essential to ensure the implementation of strategies that reduce their concentration in products intended for human and animal consumption, as well as control the levels present in food. The aim of the study was to evaluate the occurrence of AFM1 in bovine and goat milk produced in the Azores, intended for the manufacture of fresh cheese. It was also intended to determine the content of AFM1 in the resulting cheese and whey, to assess the exposure and risk of consumers. For this purpose, 14 sets of samples of bovine milk, corresponding fresh cheese and whey and 6 sets of goat milk samples, corresponding cheese and whey were collected, making a total of 60 samples. These were collected between March and April 2021 and analyzed using a competitive immunoassay method (Ridascreen, R-biopharm). It was found that, considering all analyzed samples, the frequency of contamination and the AFM1 content was higher in cheese samples (65%; 159.3 ng/L) compared to milk samples (15%; 6.9 ng /L) and whey (5%; 6.9 ng/L). In the case of goat cheese, the frequency of contamination was higher and the AFM1 content was lower (83.3 %; 116 ng/L) compared to cow's cheese (57.1%; 186.3 ng/L). These results are similar to those reported in previous similar studies that describe an increase in the concentration of AFM1 in cheese, although there is no maximum limit applicable in this food in the European Union (EU). In the evaluation of human exposure to AFM1 through the consumption of fresh cheese, it was found that the consumption of fresh bovine cheese represents a greater contribution than the consumption of goat cheese. The estimated risk in the case of children was higher than that of adults, which is why they are identified as more vulnerable. The estimated concentration of AFB1 in animal feed for cattle was 0.35 µg/kg, while in goats it was 3.99 µg/kg, and therefore below the current Maximum Limit (5 µg/kg) in force in the EU. Additional studies should be carried out to ensure continuous monitoring and reduction of the risk associated with human exposure to AFM1, in particular of the most vulnerable groups such as children.

Keywords: Azores, AFB1, AFM1, ELISA, Milk, Fresh Cheese, Bovine, Goat

1. Introdução

As aflatoxinas (AF) são metabolitos secundários produzidos por fungos do género *Aspergillus* nomeadamente das espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nominus* (Buszewska-Forajta *et al.*, 2020). As quatro principais AF com toxicidade mais elevada e ocorrência frequente são: AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 (Buszewska-Forajta *et al.*, 2020).

A aflatoxina B1 (AFB1) é a AF mais tóxica, com reconhecida teratogenicidade, poder carcinogénico e mutagénico. Resulta consequentemente numa diminuição do sistema imunitário do animal, aumentando a suscetibilidade a doenças e infeções secundárias (Buszewska *et al.*, 2020). Segundo a Agência Internacional para a Investigação do Cancro (IARC – do Inglês *The International Agency for Research in Cancer*), a AFB1 é a micotoxina com a maior carcinogenicidade conhecida, incluída no grupo 1 como agente carcinogénico humano, estando comprovadamente associada à ocorrência de carcinoma hepatocelular em humanos, bem como, à existência de evidência da sua atuação sinérgica com o vírus da hepatite B (VHB) (IARC, 2012).

No caso dos ruminantes, após a ingestão de AFB1, parte desta, sofre uma degradação ruminal não existindo a passagem para a corrente sanguínea. A porção que consegue resistir à degradação e chegar a corrente sanguínea é metabolizada principalmente no fígado dando origem a outros metabolitos, nomeadamente aflatoxina M1 (AFM1). Esta pode ser excretada pela via renal, pela biliar ou pela glândula mamária (EFSA, 2004)

Nos bovinos, estima-se que cerca de 1-2 % da AFB1 ingerida será excretada no leite como AFM1. Contudo, existem estudos que já evidenciaram uma excreção de 6,2 % (EFSA, 2004). A ingestão de alimento contaminado com AFB1 resultará na deteção de AFM1 no leite dois a três dias após a ingestão desse alimento e serão necessários mais dois ou três dias para que os níveis se reduzam até zero, considerando que durante todo esse período o animal não ingeriu alimento contaminado (Duarte *et al.*, 2012).

No caso dos caprinos, a AFM1 pode ser detetada no leite uma hora após a ingestão do alimento contaminado, sendo que, o pico surge três a seis horas após a ingestão. Esta micotoxina deixa de ser excretada no leite 84 horas após a ingestão de AFB1. A taxa de excreção de AFM1 no leite é muito inferior à de bovinos, estimada em 0,17 % da dose única de AFB1 (Battacone *et al.*, 2012).

Sendo impossível fazer a eliminação total da presença destes contaminantes naturais, torna-se essencial garantir que a sua concentração em produtos que se destinam à alimentação animal seja reduzida. Devido à relação direta dos níveis de AFB1 ingeridos com os níveis de AFM1 excretados, está estabelecido, na UE (União Europeia), um limite máximo (LM) de contaminação por AFB1 na alimentação animal (EC, 2002). Foram igualmente fixados limites máximos de AF em diversos géneros alimentícios, incluindo em leite cru, leite tratado termicamente e leite para o fabrico de produtos lácteos (50 ng/L; EC, 2010).

O arquipélago dos Açores representa cerca de 30% da produção de lacticínios a nível nacional (de Almeida *et al.*, 2020). Em 2019, o arquipélago apresentava um efetivo de bovinos que rondava as 125 mil vacas adultas (73 % vacas leiteiras), principalmente da raça Holstein-Frísia e um efetivo de de 8 mil caprinos, principalmente da raça Saanen (SREA *et al.*, 2020). O sistema de produção leiteira é caracterizado pelo uso rotacional de pastagens tendo, nos últimos anos, aumentado a prática de utilização de silagens (milho e/ou erva) e suplementação com concentrado, distribuído durante a hora de ordenha (de Almeida *et al.*, 2020). Em 2020 foi produzido nos Açores 102 000 toneladas de leite de vaca e cerca de 32 000 kg de queijo (SREA *et al.*, 2020). Em termos de produção leiteira caprina torna-se difícil quantificar, pois não possui a organização nem a dimensão da produção leiteira bovina, sendo que grande percentagem desse leite é para autoconsumo ou para venda direta ao consumidor (Capela *et al.*, 2017).

No arquipélago existem 2 queijos com Denominação de Origem Protegida (DOP) que são: queijo de São Jorge (queijo curado, de pasta dura ou semi-dura obtido através de leite cru de vaca) e queijo do Pico (queijo curado de pasta mole amanteigado obtido através de leite cru de vaca). Existem mais queijos produzidos nos Açores que não chegam ao mercado do continente devido a algumas limitações, tais como, o volume de produção não ser significativo, bem como, os custos de transporte associados, o que torna difícil competir com os queijos no mercado do continente (de Almeida *et al.*, 2020).

No processo de fabrico de queijo, a AFM1 liga-se à caseína, logo os valores de concentração desta micotoxina são inferiores no soro de leite comparativamente à coalhada. Estudos anteriores demonstraram que a concentração de AFM1 é superior em queijos de pasta mole (cerca de 3 vezes) ou pasta dura (cerca de 5 vezes) comparativamente ao leite a partir do qual foram produzidos (Prandini *et al.*, 2009). Processos tecnológicos como a pasteurização, esterilização ou até mesmo a congelação, realizado com o objetivo de reduzir os níveis de AF no leite e consequentemente nos restantes produtos lácteos derivados não demonstraram ter eficácia na redução dos níveis de AFM1 (Iqbal *et al.*, 2015).

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), o leite e pelo menos um producto lácteo representa 15 % da alimentação diária na Europa. Esta mesma organização refere que cerca de 6 biliões de pessoas consomem leite e lacticínios, o que revela a importância da regulamentação com o fim de reduzir a exposição humana a esta micotoxina perigosa para o homem, bem como, para o animal (FAO, 2020).

No presente estudo pretendeu-se determinar os teores de AFM1 no leite (bovino e caprino), no respetivo soro e nos queijos frescos resultantes produzidos na ilha de São Miguel, através da técnica de ELISA. Pretendeu-se ainda efetuar uma avaliação da exposição e análise de risco dos consumidores de queijo fresco. Com base nos dados de toxicocinética disponíveis para bovinos e caprinos, pretendeu-se finalmente avaliar a exposição dos animais produtores à AFB1.

2. Material e métodos

2.1 Amostragem

Foram recolhidos, em 4 queijarias da ilha de São Miguel, Açores, 20 conjuntos de amostras de leite pasteurizado, respetivo soro e queijo fresco final (14 produzidos em bovinos e 6 em caprinos). Todas as queijarias têm uma produção artesanal, recebendo leite de várias explorações, principalmente, com sistema semi-intensivo. O leite recebido foi tratado termicamente por pasteurização (65-67°C durante 30 minutos). No fabrico do queijo fresco, nas 4 queijarias, utilizou-se cloreto de sódio e promoveu-se a coagulação enzimática, com coalho de origem microbiana (derivado de *Rhizomucor miehei*, comercializado em pó).

As amostras foram recolhidas durante os meses de março e abril de 2021. Imediatamente após a sua recolha, todas as amostras foram congeladas até à respetiva análise.

2.2 Materiais e procedimento do teste

Para determinar os níveis de AFM1 nas amostras utilizou-se um ensaio imunoenzimático competitivo (ELISA) usando um Kit comercial (RIDASCREEN® Aflatoxin M1 R-Biopharm AG®, Alemanha), seguindo todas as instruções fornecidas pelo fabricante.

2.2.1 Preparação de amostra de leite e soro para pesquisa de AFM1

Após descongelação, as amostras de leite e soro foram centrifugadas (Sigma 3K15) para remover a gordura a 3500 *g* a uma temperatura de 10 °C durante 10 minutos. Após essa centrifugação, removeu-se toda a camada de gordura por aspiração com uma pipeta de Pasteur. No caso do leite, foi necessário repetir este procedimento de centrifugação e remoção da camada superior de gordura. Duzentos microlitros de amostra desnatada foram transferidos para um tubo Eppendorf®, devidamente identificado com o código da amostra.

2.2.2 Preparação de amostra de queijo para pesquisa de AFM1

Após descongelação, 5 g de cada amostra macerada de queijo num tubo de falcon (Deltalab) foi sujeita a homogeneização forte, com auxílio de um agitador vortex (Zx3 UniEquip), com 20 mL de metanol a 70 %. Seguiu-se uma incubação (Heidolph® incubator 1000) a 50 °C durante 30 minutos, sendo necessária uma agitação vigorosa dos tubos no vortex a cada 5 minutos. Após a incubação, procedeu-se a uma centrifugação a 3000 *g* durante 10 minutos a 10 °C. De seguida, transferiu-se 2 mL da fase aquosa (sem gordura) para um tubo de falcon, no qual foi adicionado 2 mL de *n*-hexano (Sigma-Aldrich) antes de uma agitação no vortex, a velocidade máxima, durante 10 segundos. Os tubos foram novamente centrifugados (10 minutos/ 3000 *g*/ 10 °C) para a separação de fases. Após a centrifugação retirou-se 100 µL da fase aquosa inferior e diluiu-se a 1:5 com 400 µL de tampão de diluição (incluído no kit) e transferiu-se para um tubo Eppendorf® devidamente identificado.

2.2.3 Determinação de AFM1 no leite, soro e queijo

Foram registadas todas as posições (em poços duplicados) das soluções padrão (0, 5, 10, 20, 40, 80 ng/L) e das amostras na microplaca. De seguida foi adicionado, 100 µL de anticorpo a cada poço, agitou-se a placa manualmente e incubou-se à temperatura ambiente (20-25 °C) durante 15 minutos. Após esse período de incubação, descartou-se o líquido dos poços e sacudiu-se a microplaca vigorosamente contra papel absorvente para garantir a sua remoção completa. Foram adicionados 250 µL de tampão de lavagem, a todos os poços e removeu-se novamente o líquido. Este procedimento de lavagem foi repetido duas vezes.

De seguida, adicionou-se 100 µl das amostras preparadas e soluções padrão na placa, agitando a placa manualmente e deixou-se incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. Após esse período de incubação, repetiu-se o procedimento de lavagem, tal como descrito anteriormente. Logo depois, adicionou-se 100 µl do conjugado enzimático nos poços, agitou-se a placa manualmente e incubou-se por 15 minutos à temperatura ambiente no escuro. Após esse período de incubação, efetuou-se novamente o procedimento de lavagem, tal como descrito anteriormente.

Adicionou-se 100 µl de substrato/cromogénio em todos os poços e agitou-se a placa manualmente, antes do período de incubação de 15 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Por fim, adicionou-se 100 µl da solução stop a cada poço, agitou-se a placa manualmente e mediu-se a absorbância a 450 nm, no leitor de microplacas (OpticlvymentSystem 2100-C®)

2.3 Quantificação da AFM1

As absorbâncias obtidas foram inseridas num software específico (RIDASOFT® Win.NET) do mesmo fabricante e, através da função spline cúbica, foi calculado o teor de AFM1 em cada amostra. De acordo com o fabricante, o limite de deteção (LOD) correspondeu a 5 ng/L, no caso das amostras de leite e soro. Relativamente às amostras de queijo, por utilização da nota de aplicação específica para esta matriz (associada a um factor de diluição de 22,5), o LOD correspondeu a 0,14 ng/L.

2.4 Cálculo da ingestão diária estimada

A ingestão diária estimada (IDE) de AFM1 foi calculada com base na soma da concentração de AFM1 das amostras (>LOD) analisadas (ΣC), a estimativa de consumo anual de queijo em Portugal (M), o total de amostras com teor superior ao LOD (N), o número de dias do ano (D) e por fim o peso corporal médio (P). Com estes dados utilizou-se a seguinte fórmula $IDE = (\Sigma C)(M.N^{-1}.D^{-1}.P^{-1})$. Em 2019, o consumo humano de queijo per capita (kg/ hab.) em Portugal, segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE), foi de 13,8 kg (INE, 2021). O peso corporal médio da população adulta foi considerado 69 kg (Arezes *et al.*, 2006), enquanto o peso médio de uma criança de 10 anos foi considerada 30kg (Ministério da Saúde *et al.*, 2009). Foram ainda considerados diferentes cenários, tendo em conta os teores mínimos (melhor cenário), médios (cenário intermédio) e máximos (pior cenário) dos queijos frescos produzidos a partir de leite bovino e caprino. Para a avaliação de risco, a

percentagem de ingestão diária tolerável (TDI do Inglês *Tolerable Daily Intake*) do consumo de queijo fresco foi calculada através da seguinte fórmula: $\%TDI = (IDE/TDI) \times 100$. Para AF, o TDI foi obtido através do valor proposto por Kuiper-Goodman (1990; 0.2 ng/Kg, pc/dia).

2.5 Cálculo dos valores extrapolados da concentração de AFB1 na alimentação dos bovinos e caprinos

Após a determinação dos níveis AFM1 nas amostras de leite foi estimado o teor médio de AFB1 presente no alimento consumido pelos animais. Para tal, considerou-se que a AFB1 ingerida é convertida em AFM1, excretada no leite, a uma taxa de 2 % no caso dos bovinos (EFSA, 2004) e 0,17 % no caso dos caprinos (Battacone *et al.*, 2012). A fórmula aplicada para esta estimativa foi a seguinte (Duarte *et al.*, 2013): $AFB1 (\mu g/Kg) = (AFM1 (ng/Kg) \times 100)/(T \times 1000)$, na qual T corresponde à taxa considerada para bovinos e caprinos

3. Resultados e discussão

3.1 Desempenho analítico do método

Uma vez que foram utilizadas duas microplacas para determinação do teor de AFM1, foram obtidas duas curvas padrão pelas determinações (valor médio de poços duplicados) de cada um dos seis níveis de concentração (soluções padrão) de AFM1. No caso das amostras de leite e soro foi obtida a curva padrão nº1 apresentada na Figura 1 e, no caso das amostras de queijo, foi obtida a curva nº2 apresentada na figura 2. Os coeficientes de variação (CV) calculados para os valores de absorbância obtidos em cada uma das soluções padrão foram inferiores a 4,7 % (no caso da curva nº1) e 6,7 % (no caso da curva nº2). No caso das absorbâncias das amostras, o valor médio de CV foi 2,8 % no caso de amostras de leite e soro e 2,7 % no caso das amostras de queijo.

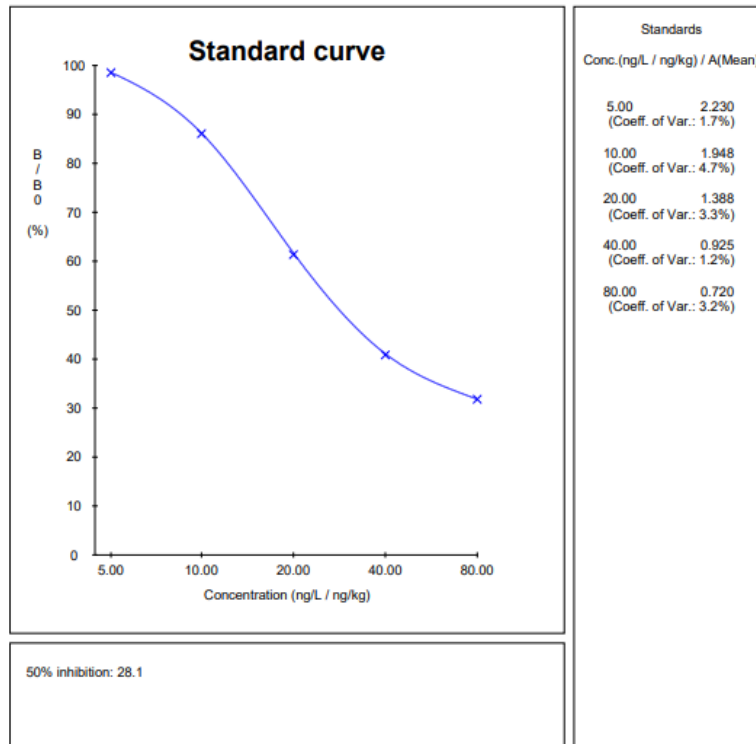


Figura 1: Curva padrão considerada para determinação de AFM1 nas amostras de leite e soro.

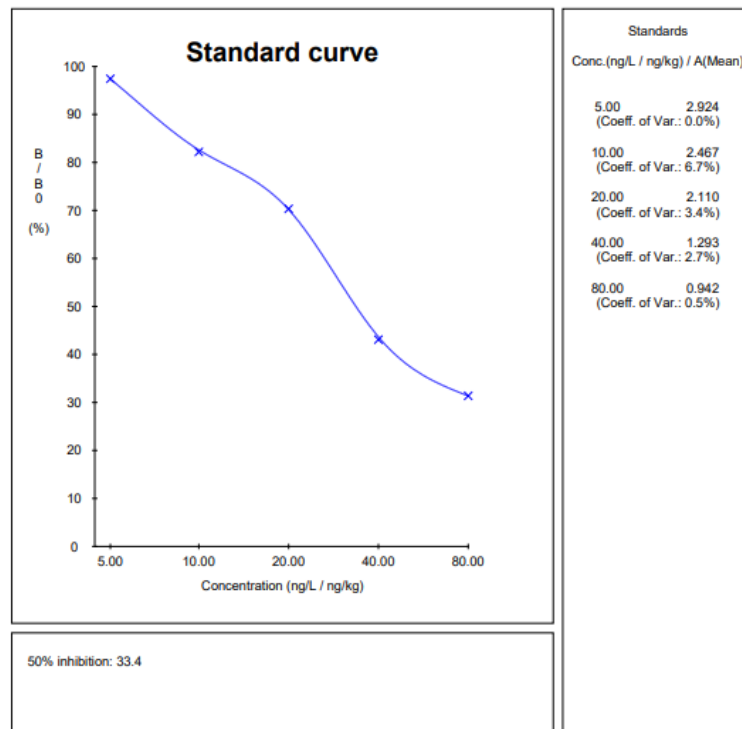


Figura 2: Curva padrão considerada para determinação de AFM1 nas amostras de queijo

3.2 Resultados das amostras analisadas

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1. Em relação à totalidade das amostras de leite analisadas (n=20), apenas 3 apresentaram resultado superior ao LOD (5 ng/L), variando entre 6,8 ng/L e 7,0 ng/L, e, portanto, muito inferior ao limite máximo permitido na União Europeia (UE) (50 ng/L; EC, 2010). Quanto às amostras de soro, apenas foi determinado um valor superior ao LOD, mas similar ao teor médio determinado no leite (6,9 ng/L). Quanto às amostras de queijo, observou-se um número superior de amostras positivas e no caso das amostras produzidas a partir de leite bovino, um teor superior e com um valor máximo de 362,3 ng/L.

Tabela 1: Resultados da determinação de AFM1 nas amostras analisadas de leite, soro e queijo fresco

Amostra	Espécie	Frequência de contaminação, n (%)	Média ± Desvio Padrão (ng/L)	Intervalo de contaminação (ng/L)
Leite	Bovina	2/14 (14,3%)	6,9 ± 0,1	[6,8-7,0]
Soro		1/14 (7,1%)	6,9	-
Queijo fresco		8/14 (57,1%)	186,3 ± 89,7	[100,2-362,3]
Leite	Caprina	1/6 (16,7%)	6,8	-
Soro		0/6 (0%)	-	-
Queijo fresco		5/6 (83,3%)	116 ± 15,7	[104,9-142,9]

O grupo oriental do arquipélago dos Açores, onde as amostras foram recolhidas, tem um clima do tipo Csb (clima temperado com verão seco e suave), húmido, com precipitação ao longo de todo o ano e uma temperatura estável que varia entre 15 e 25 °C (Almeida *et al.*, 2021). Os fungos do género *Aspergillus* apresentam uma ampla faixa de tolerância de temperatura (19-35°C) para produção de AFs. A atividade da água (aw) ou água livre é outro fator essencial para o crescimento de fungos e produção de micotoxinas (Valencia-Quintana *et al.*, 2020). Assim sendo, o clima dos Açores só por si apresenta condições favoráveis. E estas condições, poderão estar na origem dos elevados níveis de contaminação (superiores aos 50 ng/L) detetados nas amostras de leite UHT produzidas nos Açores no estudo de 2013 (Duarte *et al.*, 2013).

As amostras do presente estudo foram recolhidas na estação da primavera (março e abril), contudo a transferência/ carryover tende a variar ao longo do ano. Relativamente às variações sazonais, é reconhecido um aumento de AFM1 no leite durante o inverno e estação seca, pois é quando os animais recebem alimento com maior risco de estar contaminado ou uma alimentação mais incompleta. Sabe-se que uma diminuição de fibra efetiva na alimentação de ruminantes leva a

um desequilíbrio ruminal e consequentemente a flutuações do pH ruminal que influenciarão no crescimento de alguns grupos bacterianos de grande importância na degradação da AFB1 (Costamanga *et al.*, 2019).

Numa tentativa de perceber a influência do clima e estação do ano na taxa de excreção de AFM1 no leite de vaca, foi realizado um estudo no Brasil (Venâncio *et al.*, 2018), com o objetivo comparar a excreção de AFM1 no leite durante o verão e o inverno em clima temperado e clima subtropical. Será também importante referir que as amostras analisadas no estudo citado não apresentavam diferenças significativas na composição do leite (teor de gordura e teor proteico). Os resultados obtidos demonstraram a ausência de diferenças significativas entre as duas zonas climáticas, bem como, em ambas as estações do ano (Venâncio *et al.*, 2018).

O modo de produção tem também uma grande importância nos níveis de AFM1 no leite. As amostras analisadas no presente estudo, tanto de bovinos como caprinos, provêm de explorações semi-intensivas, pois apesar dos animais terem acesso à pastagem, é adicionado concentrado bem como silagem de erva e silagem de milho. Um estudo de determinação de AFM1 em amostras de leite de cabra relacionando com o sistema de produção dos animais, concluiu que amostras de sistemas intensivos apresentavam níveis de AFM1 e taxas de incidência superiores às recolhidas em sistemas extensivos (Virdis *et al.*, 2008).

O leite recolhido nas queijarias corresponde ao leite de tanque das explorações o que torna impossível comparar por fases produtivas. Existe uma grande variabilidade individual no que diz respeito à taxa de transferência de AFM1. O início da lactação tende a apresentar transferências mais elevadas comparativamente a lactações mais avançadas. Acresce que as infeções do úbere podem influenciar também na taxa de transferência (Prandini *et al.*, 2009). Recentemente foi publicado um estudo que avaliou o teor de AFM1 no leite de bovino comparativamente ao tipo de produção (alta produção, média produção, baixa produção) e os resultados deste estudo indicaram níveis de transferência mais elevados em animais de média e alta produção comparativamente a animais de baixa produção (Costamagna *et al.*, 2019)

Nos últimos 21 anos em Portugal foram publicados diversos estudos de determinações de AFM1 em produtos lácteos (Tabela 2).

Tabela 2: Estudos publicados relativamente à contaminação de AFM1 em leite e produtos lácteos em Portugal

Ano	Amostra (espécie animal produtora)	Metodologia Analítica (LOD, ng/L ou ng/Kg)	Frequência de contaminação, n (%)	Frequência de contaminação (n, %) por intervalos de contaminação(ng/L)					Referência
				< 5	5 – 10	11 – 20	21- 50	> 51	
1999	Leite Cru (bovino)	HPLC (5)	25/31 (80,6%)	6 (19,4%)	17 (54,8%)	2 (6,5%)	6 (19,3%)	0 (0%)	Martins <i>et al.</i> , (2000)
	UHT – leite gordo (bovino)		17/18 (94,4%)	1 (5,6%)	2 (11,1%)	8 (44,4%)	6 (33,3%)	1 (5,6%)	
	UHT – Leite meio gordo (bovino)		20/22 (90,9%)	2 (9,1%)	0 (0%)	1 (4,5%)	18 (81,9%)	1 (4,5%)	
	UHT – Leite magro (bovino)		23/30 (76,7%)	7 (23,3%)	7 (23,3%)	16 (53,4%)	0 (0%)	0 (0%)	
				Frequência de contaminação (n, %) por intervalos de contaminação(ng/L)					Martins <i>et al.</i> , (2004)
				< 10	10– 35	36-50	51-65	> 65	
2001	logurte natural (bovino)	HPLC (10)	2/48 (4,2%)	46 (95,8%)	0 (0%)	2 (4,2%)	0 (0%)	0 (0%)	
	logurte com pedaços de morango (bovino)		16/48 (33,3%)	32 (66,7%)	6 (12,5%)	4 (8,3%)	2 (4,2%)	4 (8,3%)	
				Frequência de contaminação (n, %) por intervalos de contaminação(ng/L)					Martins <i>et al.</i> , (2005)
				< 5	5-20	21-40	41-50	51 – 80	
1999-2004	Leite cru (bovino)	HPLC (5)	394/598 (65,8%)	204 (34,1 %)	254 (42,5%)	78 (13,0%)	13 (2,2%)	49 (8,2%)	
				Frequência de contaminação (n, %) por intervalos de contaminação(ng/L)					Duarte <i>et al.</i> , (2013)
				< 5	5-10	11-20	21-50	> 51	
2011	Leite (bovino)	ELISA (5)	11/40 (27,5%)	29 (72,5)	6 (15%)	2 (5%)	1 (2,5%)	2 (5%)	
				Frequência de contaminação (n, %) por intervalos de contaminação(ng/Lou ng/kg)					Presente estudo
				< 5	5-10	11-20	21-50	> 51	
2021	Leite (bovino)	ELISA (5)	2/14 (14,3%)	12 (85,7%)	2 (14,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	Soro (bovino)	ELISA (5)	1/14 (7,1%)	13 (92,9%)	1 (7,1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	Queijo (bovino)	ELISA (0,14)	8/14 (57,1%)	6(42,9%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (57,1%)	
	Leite (caprino)	ELISA (5)	1/6 (16,7%)	5 (83,3%)	1 (16,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	Soro (caprino)	ELISA (5)	0/6 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	Queijo (caprino)	ELISA (0,14)	5/6 (83,3%)	1 (16,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (83,3%)	

Através da Tabela 2 é possível observar que todos os estudos similares de determinação de AFM1 em leite, apresentaram níveis de AFM1 bem como de incidência muito superiores comparativamente aos estimados no presente estudo. Também é possível observar que, em todos os estudos, determinaram-se teores que ultrapassavam o limite máximo (50 ng/L; EC, 2010) o que não se verificou no presente estudo. De facto, no estudo mais recente (Duarte *et al.*, 2013), em que foram analisadas 42 marcas comerciais de leite UHT comercializadas em Portugal continental, verificou-se que os leites com os níveis mais elevados de AFM1 (acima do LM) eram provenientes dos Açores não se tendo verificado no presente estudo, valores semelhantes. É importante sublinhar que recentemente tem sido implementado um controlo numa das principais fábricas de alimentos compostos, na ilha de São Miguel, pela quantificação de AF do alimento final através de um teste de imunocromatografia quantitativo (ROSA® FAST5 AflatoxinQuantitativetestFlowChart, CHARM). Tal prática apresenta resultados comprovadamente benéficos, uma vez que, comparando os teores registados em 2013 (Duarte *et al.*, 2013) com os registados no presente estudo, verifica-se uma redução significativa dos teores de AFM1 no leite.

Ao observar a Tabela 3, que consiste numa compilação dos estudos publicados mais recentes, a nível mundial, acerca da contaminação do leite por AFM1, percebe-se que em todos os países foram detetados níveis que ultrapassam o LM europeu (50 ng/L; EC, 2010) estabelecido como medida para reduzir a exposição humana a esta micotoxina carcinogénica. No caso do Líbano, o valor máximo determinado foi superior ao LM estabelecido na Europa em cerca de 58 vezes (leite em pó; Murshed *et al.*, 2020) e no estudo do Paquistão em cerca de 61 vezes (leite pasteurizado; Asghar *et al.*, 2018). De uma forma geral, o leite de vaca apresenta teores mais elevados de AFM1 comparativamente ao leite de cabra, como pode ser observado em ambos os estudos realizados no Irão (Rahimi *et al.*, 2010; Bahrami *et al.*, 2016). Nestes estudos, as amostras de leite de cabra apresentam teores médios inferiores em cerca de 50% comparativamente às amostras de leite de vaca. Observa-se adicionalmente que os leites tratados termicamente não demonstram níveis inferiores ao leite cru, confirmando a ineficácia dos tratamentos tecnológicos térmicos na redução dos níveis de AFM1 em leite e produtos lácteos.

Tabela 3: Ocorrência mundial de contaminação por AFM1 no leite

Pais (Ano)	Metodologia analítica (LOD, ng/L)	Amostra (espécie)	Frequência de contaminação, n (%)	Teor médio (ng/L)	Intervalo de contaminação (ng/L)	Referência
Brasil (2004-2005)	HPLC (10)	Leite pasteurizado (caprino)	7/12 (58,3)	72 ± 48	[10-200]	Oliveira <i>et al.</i> , (2007)
		Leite UHT (caprino)	10/12 (83,3)	58 ± 44	[10-200]	
		Leite em pó (caprino)	8/12 (66,7)	56 ± 31	[10-100]	
Irão (2010)	ELISA (5)	Leite cru (bovino)	59/75 (78,7)	60,1 ± 57,4	nd	Rahimi <i>et al.</i> , (2010)
		Leite cru (caprino)	19/60 (31,7)	30,1 ± 18,3	nd	
Brasil (2014)	ELISA (5)	Leite pasteurizado(nd)	7 (100)	20 ± 1	[10-30]	Santos <i>et al.</i> , (2015)
		Leite UHT (nd)	28 (100)	40 ± 2	[10-80]	
		Leite em pó (nd)	7 (100)	610 ± 18	[33-810]	
Irão (2015)	ELISA (5)	Leite cru (bovino)	54/64 (84,3)	59,3 ± 6,2	[6,1-188,2]	Bahrami <i>et al.</i> , (2016)
		Leite cru (caprino)	25/56 (44,6)	33,6 ± 4,7	[8,9-81,7]	
Paquistão (2016-2017)	ELISA (5)	Leite pasteurizado(nd)	143/156 (91,7)	346,2 ± 12,3	[20-3090]	Asghar <i>et al.</i> , (2018)
Bangladesh (2019)	ELISA (5)	Leite cru (bovino)	35/50 (70)	699,1 ± 469,6	[22,8-1489,3]	Tarannum <i>et al.</i> , (2020)
		Leite pasteurizado(bovino)	13/25 (52)	99,8 ± 175,5	[18,11-672,18]	
		Leite UHT (bovino)	5/25 (20)	35,5 ± 11,0	[25,07-48,95]	
Egito (2016-2017)	HPLC (12)	LEITE cru colhido em 2016 (bovino)	13/60 (21,6)	351 ± 58	[50-660]	Ismail <i>et al.</i> , (2020)
		Leite cu colhido em 2017 (bovino)	11/60 (18,3)	240 ± 40	[50-510]	
Iêmen (2016-2017)	HPLC (2)	Leite cru (nd)	26/38 (68,4)	85 ± 182	[21-418]	Murshed <i>et al.</i> , (2020)
		Leite em pó (nd)	40/60 (66,6)	404 ± 80	[21-2890]	

Nd: Informação não disponível

Por consulta da tabela 4, que consiste numa compilação dos artigos mais recentes publicados a nível mundial, relativamente à contaminação do queijo por AFM1, observa-se uma frequência de contaminação que varia entre os 20% (Turquia; Temamogullari *et al.*, 2014) e os 100% (Etiópia; Tadesse *et al.*, 2020). Estabelecendo a comparação com o presente estudo (65% no total de amostras de queijo; 57,1% em amostras de queijo de leite bovino; 83,3% em amostras de queijo de leite caprino), conclui-se que está no intervalo das frequências de contaminação dos estudos publicados. Quando se pretende comparar os teores de AFM1 no queijo com estudos prévios (Tabela 4), conclui-se que os valores apresentam algumas diferenças. É possível observar valores máximos a rondarem os 6000 ng/Kg, correspondendo à Etiópia (Tadesse *et al.*, 2020) e ao Iémen (Murshed *et al.*, 2020). Contudo, é de realçar que o teor médio de AFM1 no queijo poderá variar entre estudos. Essas diferenças devem-se ao tipo de queijo alvo de estudo, a composição do leite que serviu de matéria-prima, os teores de AFM1 no leite, o tipo de fabrico (industrial ou artesanal), se existe ou não maturação bem como os métodos analíticos usados na quantificação das micotoxinas (Khaneghah *et al.*, 2021). Segundo Khaneghah *et al.* (2021), as amostras de queijo industrial apresentam teores de AFM1 inferiores comparativamente às amostras artesanais, justificando esse facto com controlos mais rigorosos na indústria e também pelo facto de, à escala industrial, ser utilizada uma mistura de leite de várias origens, o que não acontece à escala artesanal. Em relação à fase de maturação, existem alguns estudos contraditórios. Os estudos que referem um aumento da concentração de AFM1 durante esta fase justificam com a proteólise da caseína que liberta a AFM1 aumentando a sua taxa de recuperação (Prandini *et al.*, 2009). No presente estudo observou-se que o teor de AFM1 em queijo produzido a partir de leite de vaca era superior ao teor em queijo produzido a partir de leite de cabra. De acordo com Khaneghah *et al.* (2021), o queijo fresco tende a reter numa maior percentagem a AFM1 comparativamente ao queijo curado e o queijo fresco de vaca apresenta geralmente níveis mais elevados de AFM1 comparativamente ao queijo fresco proveniente de leite de mistura (vaca e cabra) ou de leite de cabra.

Na Tabela 5, é apresentada uma compilação de artigos que tiveram como objetivo avaliar a distribuição da AFM1 no queijo a partir do leite inicial. Em alguns dos artigos citados, nomeadamente no Irão (Kamkar *et al.*, 2008), o leite foi artificialmente contaminado com AFM1. Os teores de AFM1 no soro são muito inferiores aos níveis de AFM1 presente no queijo e comparando com o presente estudo, confirma-se a concordância de resultados, pois das vinte amostras de soro obtidos durante o fabrico do queijo fresco, apenas uma deu resultado positivo, sendo que as restantes tiveram resultado abaixo do limiar de deteção do teste (5 ng/L). Outra concordância observada deve-se ao aumento dos níveis de AFM1 no queijo final comparativamente ao leite inicial. Isto acontece porque AFM1 se liga à caseína e permanece ligada durante o processamento de produtos lácteos, especialmente em produtos com um alto teor proteico, como os queijos, pois AFM1 possui uma grande afinidade para as zonas hidrofílicas da caseína ou proteínas do soro de leite, devido à sua natureza hidrofílica (Khaneghah *et al.*, 2021).

Tabela 4: Ocorrência mundial de contaminação por AFM1 no queijo.

País (Ano)	Metodologia analítica (LOD, ng/Kg)	Amostra (espécie)	Frequência de contaminação, n (%)	Teor médio ng/kg	Intervalo de contaminação (ng/L)	Referência
Costa Rica (2012 e 2014)	HPLC (23)	Queijo fresco (bovino)	44/70 (62,8%)	85 ± 72	[31- 276]	Chavarría <i>et al.</i> , (2015)
Egipto (2016-2017)	HPLC 12)	Queijo fresco recolhido em 2016 (bovino)	21/62 (33,9%)	1110 ± 150	[50-2070]	Ismail <i>et al.</i> , (2020)
		Queijo fresco recolhido em 2017 (bovino)	25/56 (44,6%)	632 ± 90	[190-2120]	
Itália (2012)	HPLC (3)	Queijo (nd)	7/17 (41,2%)	nd	[3-18]	Santini <i>et al.</i> , (2013)
Coreia do Sul (2013-2014)	HPLC (15)	Queijo (bovino)	16/61 (26,2%)	37	[15-136]	Yoon <i>et al.</i> , (2016)
Turquia (2012)	ELISA (2)	Queijo branco (bovino)	10/50 (20%)	103,2 ± 29,1	[40,4-130,9]	Temamogullari <i>et al.</i> , (2014)
Etiópia (2020)	ELISA (nd)	Queijo (nd)	82/82 (100%)	2040 ± 1268	[80-5850]	Tadesse <i>et al.</i> , (2020)
Itália (2005)	ELISA (50)	Queijo (caprino)	4/41 (9,8)	257 ± 145	[79,5-389]	Virdis <i>et al.</i> , (2008)
Iémen (2016-2017)	HPLC (2)	Queijo (nd)	74/90 (82,22%)	567 ± 110	[22-5920]	Murshed <i>et al.</i> , (2020)

Nd: Informação não disponível

Tabela 5: Distribuição de AFM1 em queijo fresco, soro de leite e leite, durante a produção do Queijo fresco

País	Metodologia analítica (LOD, ng/L)	Espécie	Teor médio de AFM1 no leite (ng/L)	Teor médio de AFM1 no soro (ng/L)	Teor médio da AFM1 no queijo (ng/Kg)	Referencia
Irão (2008)	HPLC (nd)	Bovino	875	430	1570	Kamkar <i>et al.</i> , (2008)
Brasil (2010)	HPLC (3)	Bovino	104,8	37,6	186,5	Iha <i>et al.</i> , (2013)
Argentina (2016)	ELISA (5)	Bovino	15,2	13,2	84,2	Costamagna <i>et al.</i> , (2019)
Itália (2015)	ELISA (3)	Bovino	58,3	31,1	258,3	Pecorelli <i>et al.</i> , (2019)

Nd: Informação não disponível

3.3 Estimativa da ingestão diária da AFM1 pelos humanos

O valor da ingestão diária estimada de AFM1 pelos humanos e crianças foi calculado através da fórmula descrita no ponto 2.4., em diferentes cenários (Tabela 6), tendo em conta os teores mínimos (melhor cenário), médios (cenário intermédio) e máximos (pior cenário) para queijos produzidos a partir de leite bovino e caprino. Com base nos vários cenários criados, a IDE no adulto varia entre os 0,05-0,18 ng/kg pc/dia enquanto nas crianças varia entre os 0,12-0,46 ng/kg pc/dia. Fazendo a comparação com um estudo no Irão (Shahbazi *et al.*, 2017), que apresentou uma IDE de 0,04 ng/kg pc/dia, conclui-se que os resultados do presente estudo estão superiores. O presente estudo obteve resultados similares com o Brasil (Shundo *et al.*, 2009) que apresenta uma IDE de 0,18 ng/kg pc/dia. Estudos prévios em França (Leblanc *et al.*, 2005) e Servia (Škrbić *et al.*, 2014) apresentaram resultados da IDE superiores ao presente estudo com valores de 0,34 ng/kg pc/dia e 1,4 ng/kg pc/dia, respetivamente.

Segundo Abrunhosa *et al.*, (2014), a ingestão diária provável (PDI) de AFM1 no caso da população Portuguesa é de 0,073 ng/kg pc/dia, e portanto inferior à IDE no presente estudo, apenas considerando o consumo de queijo. Adicionalmente, considerando a TDI proposta por Kuiper-Goodman *et al.* (1990; 0,2 ng/kg pc/dia), verifica-se que o consumo de queijo de vaca no pior cenário considerado representa, no caso dos adultos, um risco superior. Independentemente dos cenários considerados, as crianças apresentam índices de risco superiores aos adultos, em particular pelo consumo de queijo fresco de vaca. As crianças representam um grupo populacional mais vulnerável pela imaturidade fisiológica, maior taxa metabólica e menor capacidade de desintoxicação (Cantu-

Cornelio *et al.*, 2016). Nos adultos, o risco é também superior quando é considerado o consumo de queijo de vaca, comparativamente ao queijo de cabra.

Tabela 6: Cenários de avaliação de exposição e risco por consumo de queijo fresco de acordo com teor de AFM1

		Melhor cenário		Cenário intermédio		Pior cenário	
		IDE (ng/kg pc/dia)	%TDI*	IDE (ng/kg pc/dia)	%TDI*	IDE (ng/kg pc/dia)	%TDI*
Queijo de leite bovino	Adulto (69 kg)	0,05	25	0,09	45	0,18	90
	Criança 10 anos (30 kg)	0,12	60	0,23	115	0,46	230
Queijo de leite caprino	Adulto (69 kg)	0,05	25	0,06	30	0,07	35
	Criança 10 anos (30 kg)	0,13	65	0,15	75	0,18	90

*conforme proposto Kuiper-Goodman *et al.*, (1990; 0.2ng/kg pc/dia)

3.4 Extrapolação da concentração de AFB1 na alimentação dos bovinos e caprinos

Com base nos valores obtidos nas amostras de leite, calculou-se os valores extrapolados da concentração de AFB1 na alimentação dos bovinos e caprinos através da fórmula descrita no ponto 2.5. em três cenários diferentes tendo em conta os teores mínimos (melhor cenário), médios (cenário intermédio) e máximos (pior cenário) determinados no leite bovino e caprino analisado.

Tabela 7: Extrapolação da concentração de AFB1 na alimentação dos bovinos e caprinos em 3 cenários (melhor, intermédio e pior)

Valor de AFM1 no Leite	Melhor cenário	Cenário Intermédio	Pior Cenário
Bovino	0,34	0,35	0,35
Caprino*	-	3,99	-

* Como obteve apenas um resultado positivo, foi considerado um cenário único

Como é possível consultar na Diretiva 2002/32/CE (CE, 2002) o limite máximo na alimentação completa para o gado leiteiro é de 5 µg/Kg com isto poderá concluir-se que a alimentação dos bovinos bem como dos caprinos respeitam os limites máximos não se observando, mesmo no pior cenário, limites superiores ao estabelecido.

4. Conclusão

Com os resultados obtidos no presente estudo comparativamente a outros estudos na mesma região (Açores), poderá demonstrar um esforço na redução da AFB1 na alimentação animal, pois o teor determinado de AFM1 no leite foi cerca de dez vezes inferior ao limite máximo Europeu (50 ng/L). Seria interessante realizar um estudo semelhante, mas envolvendo uma recolha ao longo de um ano completo, uma vez que as excreções tendem a variar ao longo dos meses/estações do ano, e assim poder-se-ia confirmar o controlo efetivo da redução da exposição a AFB1 na alimentação das espécies animais produtoras de leite nos Açores.

Foi adicionalmente observado, no presente estudo, um aumento da concentração dos teores de AFM1 nas amostras de queijo fresco recolhidas, demonstrando a afinidade da AFM1 pela caseína, pois das 20 amostras de queijo fresco analisados, 13 deram resultado positivo.

Certas faixas etárias, nomeadamente crianças, foram identificadas como mais vulneráveis, através da avaliação da exposição e análise de risco associadas ao consumo de queijo. Por esta razão e com o objectivo de reduzir a exposição a esta toxina carcinogénica, deveria ser obrigatório estabelecer limites máximos em produtos como o queijo, pois como demonstrado no presente estudo, houve uma grande concentração de AFM1 no queijo fresco comparativamente ao leite que deu origem.

Relativamente à extrapolação da concentração de AFB1 na alimentação dos bovinos e caprinos conclui-se que estas estavam dentro dos valores legais.

5. Bibliografia

Abrunhosa, L., Morales, H., Soares, C., Calado, T., Vila-Chã, A. S., Pereira, M., & Venâncio, A. (2014). A Review of Mycotoxins in Food and Feed Products in Portugal and Estimation of Probable Daily Intakes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(2), 249–265. doi:10.1080/10408398.2012.720619

Asghar, M. A., Ahmed, A., & Asghar, M. A. (2018). Aflatoxin M1 in fresh milk collected from local markets of Karachi, Pakistan. *Food additives & contaminants. Part B, Surveillance*, 11(3), 167–174. doi: 10.1080/19393210.2018.1446459

Arezes, P. M., Barroso, M. P., Cordeiro, P., Costa, L. G., & Miguel, A. S. (2006). *Estudo Antropométrico da População Portuguesa* (1st ed.). Lisboa: Instituto para a Segurança, Higiene e Saúde no Trabalho.

Bahrami, R., Shahbazi, Y., & Nikousefat, Z. (2016) Aflatoxin M1 in milk and traditional dairy products from west part of Iran: Occurrence and seasonal variation with an emphasis on risk assessment of human exposure. *Food Control*, 62, 250-256. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.10.039

Battaccone, G., Nudda, A., Rassu, S. P., Decandia, M., & Pulina, G. (2012). Excretion pattern of aflatoxin M1 in milk of goats fed a single dose of aflatoxin B1. *Journal of dairy science*, 95(5), 2656–2661. doi: 10.3168/jds.2011-5003

Buszewska-Forajta M. (2020). Mycotoxins, invisible danger of feedstuff with toxic effect on animals. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 182, 34–53. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.04.101

Capela, L. R. G. (2017). Caracterização da produção caprina leiteira em São Miguel, Açores (Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, Portugal)

Cantú-Cornelio, F., Aguilar-Toalá, J. E., de León-Rodríguez, C. I., Esparza-Romero, J., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A. F., García, H.S., Hernández-Mendoza, A. (2016). *Occurrence and factors associated with the presence of aflatoxin M1 in breast milk samples of nursing mothers in central Mexico. Food Control*, 62, 16–22. doi:10.1016/j.foodcont.2015.10.004

Chavarría, G., Granados-Chinchilla, F., Alfaro-Cascante, M., & Molina, A. (2015). Detection of aflatoxin M1 in milk, cheese and sour cream samples from Costa Rica using enzyme-assisted extraction and HPLC. *Food additives & contaminants. Part B, Surveillance*, 8(2), 128–135. doi: 10.1080/19393210.2015.1015176

Costamagna, D., Gaggiotti, M., Chiericatti, C. A., Costabel, L., Audero, G., Taverna, M., & Signorini, M. L. (2019). Quantification of aflatoxin M1 carry-over rate from feed to soft cheese. *Toxicology reports*, 6, 782–787. doi: 10.1016/j.toxrep.2019.07.004

de Almeida, A. M., Alvarenga, P., & Fangueiro, D. (2020). The dairy sector in the Azores Islands: possibilities and main constraints towards increased added value. *Tropical animal health and production*, 53(1), 40. doi:10.1007/s11250-020-02442-z

Duarte, S. C., Almeida, A. M., Teixeira, A. S., Pereira, A. L., Falcão, A. C., Pena, A., & Lino, C. M. (2013). Aflatoxin M1 in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal exposure. *Food Control*, 30(2), 411-417. doi:10.1016/j.foodcont.2012.08.002

EC. (2002). Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed. *Official Journal of the European Communities*, L 140, 10e21

E.C. (2010) Regulamento (CE) N.º 165/2010 SA COMISSÃO de 26 de Fevereiro de 2010 que altera o Regulamento (CE) n.º 1881/2006, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, no que diz respeito às aflatoxinas. 2009, 8-12

EFSA. (2004). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to aflatoxin B1 as undesirable substances in animal feed. The EFSA Journal, 39, 1e27

IARC (International Agency for Research on Cancer), 2012. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 100F. IARC.

Iha, M. H., Barbosa, C. B., Okada, I. A., & Trucksess, M. W. (2013). Aflatoxin M1 in milk and distribution and stability of aflatoxin M1 during production and storage of yoghurt and cheese. Food Control, 29(1), 1–6. doi:10.1016/j.foodcont.2012.05.058

INE (2021) Consumo humano de leite e produtos lácteos per capita (kg/hab) em 2019. Retrieved from https://ine.pt/xportal/xmain?xpgid=ine_main&xpid=INE

Iqbal, S. Z., Jinap, S., Pirouz, A. A., & Ahmad Faizal, A. R. (2015). Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review. Trends in Food Science & Technology, 46(1), 110–119. doi: 10.1016/j.tifs.2015.08.005

Ismaiel, A. A., Tharwat, N. A., Sayed, M. A., & Gameh, S. A. (2020). Two-year survey on the seasonal incidence of aflatoxin M1 in traditional dairy products in Egypt. Journal of food science and technology, 57(6), 2182–2189. doi: 10.1007/s13197-020-04254-3

Kamkar, A., Karim, G., Aliabadi, F. S., & Khaksar, R. (2008). Fate of aflatoxin M1 in Iranian white cheese processing. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 46(6), 2236–2238. doi: 10.1016/j.fct.2008.02.028

Khaneghah, A. M., Moosavi, M., Omar, S. S., Oliveira, C. A. F., Karimi-Dehkordi, M., Fakhri, Y., Husen, E., Nematollahi, A., Farahani, M., Sant'Ana, A. S. (2021) The prevalence and concentration of aflatoxin M1 among different types of cheeses: A global systematic review, meta-analysis, and meta-regression. Food Control. doi: 10.1016/j.foodcont.2021.107960

Leblanc, J.-C., Tard, A., Volatier, J.-L., & Verger, P. (2005). Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from The First French Total Diet Study. Food Additives and Contaminants, 22(7), 652–672. doi:10.1080/02652030500159938

Martins, M. L., & Martins, H. M. (2000). Aflatoxin M1 in raw and ultra high temperature treated milk commercialized in Portugal. *Food additives and contaminants*, 17(10), 871–874. doi: 10.1080/026520300420457

Martins, M. L., & Martins, H. M. (2004). Aflatoxin M1 in yoghurts in Portugal. *International journal of food microbiology*, 91(3), 315–317. doi:10.1016/S0168-1605(02)00363-X

Martins, H. M., Guerra, M. M., & Bernardo, F. (2005). A six year survey (1999-2004) of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products produced in Portugal. *Mycotoxin research*, 21(3), 192–195. doi: 10.1007/BF02959261

Ministério Da Saúde (2009) – “Boletim de Saúde Infantil e Juvenil” Modelo n.º 1396. Fonte – NCHS.

Murshed, S. (2020). Evaluation and Assessment of Aflatoxin M1 in Milk and Milk Products in Yemen Using High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Food Quality*, 2020, 1–8. doi:10.1155/2020/8839060

Oliveira, C. A. F., & Ferraz, J. C. O. (2007). Occurrence of aflatoxin M1 in pasteurised, UHT milk and milk powder from goat origin. *Food Control*, 18(4), 375–378. doi:10.1016/j.foodcont.2005.11.003

PECORELLI, I., BRANCIARI, R., ROILA, R., BIBI, R., RANUCCI, D., ONOFRI, A., & VALIANI, A. (2019). Evaluation of Aflatoxin M1 Enrichment Factor in Semihard Cow's Milk Cheese and Correlation with Cheese Yield. *Journal of Food Protection*, 82(7), 1176–1182. doi:10.4315/0362-028x.jfp-19-023

Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M., & Piva, G. (2009). On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47(5), 984–991. doi:10.1016/j.fct.2007.10.005

Rahimi, E., Bonyadian, M., Rafei, M., & Kazemeini, H. R. (2010). Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 129–131. doi:10.1016/j.fct.2009.09.028

Santini, A., Raiola, A., Ferrantelli, V., Giangrosso, G., Macaluso, A., Bognanno, M., ... Ritieni, A. (2013). Aflatoxin M1 in raw, UHT milk and dairy products in Sicily (Italy). *Food Additives and Contaminants: Part B*, 6(3), 181–186. doi:10.1080/19393210.2013.780186

Santos, J. S., França, V. R., Katto, S., & Santana, E. H. (2015). Aflatoxin M1 in pasteurized, UHT milk and milk powder commercialized in Londrina, Brazil and estimation of exposure. *Archivoslatinoamericanos de nutricion*, 65(3), 181–185.

Shahbazi, Y., Nikousefat, Z., & Karami, N. (2017). Occurrence, seasonal variation and risk assessment of exposure to aflatoxin M 1 in Iranian traditional cheeses. *Food Control*, 79, 356–362. doi:10.1016/j.foodcont.2017.04.021

Shundo, L., Navas, S. A., Lamardo, L. C. A., Ruvieri, V., & Sabino, M. (2009). Estimate of aflatoxin M1 exposure in milk and occurrence in Brazil. *Food Control*, 20(7), 655–657. doi:10.1016/j.foodcont.2008.09.019

Škrbić, B., Živančev, J., Antić, I., & Godula, M. (2014). Levels of aflatoxin M1 in different types of milk collected in Serbia: Assessment of human and animal exposure. *Food Control*, 40, 113–119. doi:10.1016/j.foodcont.2013.11.039

SREA. (2020) Regional statistics on milk production, dairy production and commercialization. Serviço Regional de Estatística dos Açores. <https://srea.azores.gov.pt/>. Accessed 1 maio 2021

Tadesse, S., Berhanu, T., & Woldegiorgis, A. Z. (2020). Aflatoxin M1 in milk and milk products marketed by local and industrial producers in Bishoftu town of Ethiopia. *Food Control*, 107386. doi:10.1016/j.foodcont.2020.107386

Tarannum, N., Nipa, M. N., Das, S., & Parveen, S. (2020). Aflatoxin M1 detection by ELISA in raw and processed milk in Bangladesh. *Toxicology Reports*, 7, 1339–1343. doi:10.1016/j.toxrep.2020.09.012

Temamogullari, F., & Kanici, A. (2014). Short communication: Aflatoxin M1 in dairy products sold in Şanlıurfa, Turkey. *Journal of Dairy Science*, 97(1), 162–165. doi:10.3168/jds.20126184

Valencia-Quintana, R., Milić, M., Jakšić, D., Šegvić Klarić, M., Tenorio-Arvide, M. G., Pérez-Flores, G. A., Bonassi, S., & Sánchez-Alarcón, J. (2020). Environment Changes, Aflatoxins, and Health Issues, a Review. *International journal of environmental research and public health*, 17(21), 7850. doi: 10.3390/ijerph17217850

Venâncio, R. L., Ludovico, A., de Santana, E., de Toledo, E. A., de Almeida Rego, F. C., & Dos Santos, J. S. (2019). Occurrence and seasonality of aflatoxin M1 in milk in two different climate

zones. *Journal of the science of food and agriculture*, 99(6), 3203–3206.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.9487>

Virdis, S., Corgiolu, G., Scarano, C., Pilo, A. L., & De Santis, E. P. L. (2008). Occurrence of Aflatoxin M1 in tank bulk goat milk and ripened goat cheese. *Food Control*, 19(1), 44–49.
[doi:10.1016/j.foodcont.2007.02.001](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.02.001)

Yoon BR, Hong SY, Cho SM, Lee KR, Kim MH, (2016) Aflatoxin M1 levels in dairy products from South Korea determined by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Food Nutr Res* 55: 171-180.

Anexos



ESCOLA
UNIVERSITÁRIA
VASCO DA GAMA



MEDICINA
VETERINÁRIA

REGISTO DE CASUÍSTICA

Nome aluno (a): Nuno Miguel Estrela Rego

Local (ais) de estágio : Associação Agrícola de São Miguel

Período estágio : 1 / 10 / 2020 a 31 / 03 / 2021

Breve contextualização
do EC:

O estágio Curricular foi na área de Clínica de Espécies Pecuárias. Durante o estágio a espécie bovina foi a mais observada.

Casos clínicos presenciados

	Caninos	Felinos	Bovinos	Ovinos/ Caprinos	Suínos	Equinos	Aves	Coelhos/ Outros	TOTAL
Aborto			4						
Abcesso			6	1					
Artrite séptica			12						
Cetose			24						
Clostridiose			17						
Corpo estranho			32						
Diarreia neonatal			89						
Diarreia em adulto			73						
Dermatofitose			3						
Eutanásia			59						
Fotossensibilidade			5						
Fratura óssea			3						
Ferida			7						
Hipomagnesemia			1						
Hipocalcémia			64						
Hérnia Umbilical			2						
Insuficiência Cardíaca			3						
Luxação dos membros posteriores			36						
Lactólito			2						
Laceração da Vulva			2						
Laceração do teto			1						
Metrite			46						

Mamite			149					
Meningite			2					
Orquite			1					
Pneumonia			168	8				
Problemas podais			27					
Parasitismo gastrointestinal			19		1			
Prolapso uterino			1					
Prolapso Vaginal			2					
Prolapso rectal					1			
Parto			21					
Reação Alérgica ao medicamento			1					
Retenção placentária			35					
Toxemia de gestação				4				
Timpanismo			19					
Tumor ocular			4					
Torção uterina			12					
Úlcera do abomaso			1					
TOTAL	0	0	890	12	2	0	0	0

Cirurgias presenciadas	Caninos	Felinos	Bovinos	Ovinos/ Caprinos	Suínos	Equinos	Aves	Coelhos/ Outros	TOTAL
Deslocamento do Abomaso à esquerda			28						
Deslocamento do abomaso à direita			4						
Cesariana			2						
Remoção de quistos da palpebra			27						
Enucleação do globo ocular			1						
TOTAL	0	0	62	0	0	0	0	0	0

Intervenções em sanidade e/ou produção animal	Caninos	Felinos	Bovinos	Ovinos/ Caprinos	Suínos	Equinos	Aves	Coelhos/ Outros	TOTAL
Vacinação com Bovilis Bovipast RSP			1296						
Vacinação com Bravoxin 10			642						
Vacinação com STARTVAC			196						
Recolha de tronco cerebral			58						
TOTAL	0	0	2192	0	0	0	0	0	0

Ações em Segurança Alimentar e Saúde Pública

TOTAL

Caninos	Felinos	Bovinos	Ovinos/ Caprinos	Suínos	Equinos	Aves	Coelhos/ Outros	TOTAL
0	0	0	0	0	0	0	0	0

Necrópsias

TOTAL

Caninos	Felinos	Bovinos	Ovinos/ Caprinos	Suínos	Equinos	Aves	Coelhos/ Outros	TOTAL
0	0	0	0	0	0	0	0	0

*discriminar em linhas abaixo os casos clínicos observados, subdivididos ou não por especialidades de acordo com o critério do orientador

**nomear e quantificar as cirurgias assistidas nas diferentes espécies

***devem ser incluídas e nomeadas as diferentes ações de profilaxia (ex: intradermotuberculinação, desparasitação, vacinação, colheita de sangue para rastreio sorológico)

****discriminar as ações de segurança alimentar (ex: inspeção carcaças). No caso de ações em que a definição de espécie não seja possível ou aplicável deverão apenas preencher o total na última coluna

OBS: os critérios de definição e apresentação da casuística devem ser discutidos com os orientadores interno e externo, sugerindo-se no entanto a sua apresentação em folha de cálculo ou modelo semelhante; os dados na tabela podem ainda, se a orientação interna e externa, assim o entender, ser trabalhados graficamente, por espécie, especialidade etc...