



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**CONTAMINAÇÃO POR MICOTOXINAS, RESÍDUOS DE
ORGANOFOSFORADOS E CARBAMATOS: INFLUÊNCIA NA
QUALIDADE DO LEITE**

Autor: Carlos Eduardo Crispim O. Ramos
Orientador: Prof. Dr. Julio César Damasceno
Co-orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia, da Universidade Estadual de Maringá – Área de Concentração Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro – 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**CONTAMINAÇÃO POR MICOTOXINAS, RESÍDUOS DE
ORGANOFOSFORADOS E CARBAMATOS: INFLUÊNCIAS NA
QUALIDADE DO LEITE NO ESTADO DO PARANÁ**

Autor: Carlos Eduardo Crispim O. Ramos
Orientador: Prof. Dr. Julio César Damasceno
Co-orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia, da Universidade Estadual de Maringá – Área de Concentração Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro – 2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

R175c Ramos, Carlos Eduardo Crispim de Oliveira

Contaminação por micotoxinas, resíduos de organofosforados e carbamatos: influência na qualidade do leite / Carlos Eduardo Crispim de Oliveira Ramos, Maringá: [s.n.], 2011.

91 f.

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Damasceno

Co-orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, da Universidade Estadual de Maringá – Área de Concentração: Produção Animal.

1. Produção leiteira. 2. Micotoxinas. 3. Alimentação do rebanho. 4. Pesticidas I. Damasceno, Julio Cesar. II. Santos, Geraldo Tadeu dos. III. Universidade Estadual de Maringá.

CDD 22. ed. 636.2142

FOLHA DE APROVAÇÃO

CARLOS EDUARDO CRISPIM DE OLIVEIRA RAMOS

Contaminação por micotoxinas, resíduos de organofosforados e carbamatos:
influências na qualidade do leite no estado do Paraná

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Zootecnia do Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Julio César Damasceno
DZO/Universidade Estadual de Maringá
(Presidente)

Prof^a Dr^a Eliane Dalva Godoy Danesi
DTC/Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Carlos Antonio Lopes de
Oliveira
DZO/Universidade Estadual de Maringá

Prof^a Dr^a Magali Soares dos Santos Pozza
CCA/Universidade Estadual do Oeste do
Paraná

Prof. Dr. Ferenc Istvan Bankuti
DZO/Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 24 de fevereiro de 2011.

Local de defesa: Anfiteatro 02, Bloco J-45, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

Epígrafe

“Não é sinal de sanidade ou saúde ser ajustado a uma sociedade profundamente doente”

- Jiddu Krishnamurti -

Dedicatória

À Idalina, por vir me ensinando que para transcender os problemas existenciais e práticos mais pungentes temos que encontrar as soluções na vida quotidiana, coisa esta que ela vem fazendo com muito Amor e companheirismo;

À Sophie, por demonstrar diariamente que inteligência e criatividade estão longe de ser atributos acadêmicos;

Ao Heitor, por me ensinar que vigor, simplicidade, doçura e espontaneidade resolvem a maioria dos “graves” problemas que nós temos com o Mundo;

DEDICO.

Agradecimentos

Aos produtores de leite, que foram os inspiradores, os informantes e a razão da realização deste trabalho;

A todo o povo brasileiro, que mantém as instituições que têm relevância no ensino, pesquisa e extensão no país;

A Universidade Estadual de Maringá, que me possibilitou o acesso a muitas oportunidades de conhecimento e de engrandecimento pessoal;

Ao professor Dr. Júlio César Damasceno, quem considero um mestre e um amigo, por todas as inestimáveis contribuições que me deu durante minha vida acadêmica;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

Ao MAPA, pela colaboração com a execução do projeto “*Avaliação de contaminantes do leite e dos fatores de risco associados a sua incidência*”, do qual este trabalho deriva;

Aos funcionários e técnicos do LANA-DZO/UEM, por toda a ajuda e contribuição para a realização deste trabalho;

Aos professores do PPZ, em especial o prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos, que possibilitou a realização deste trabalho e contribuiu em todos os seus aspectos;

Ao prof. Dr. Ricardo Kazama, pela inestimável contribuição na realização deste trabalho e amizade;

Ao senhor Marcos Paulo Branco, sem o qual esse trabalho não seria realizado, pela amizade e disposição ao trabalho;

Aos colegas da Universidade Estadual de Londrina, laboratório de toxicologia animal, em especial a Sra Thálitha Jayme, pela valiosa ajuda nas análises dos contaminantes;

A professora Daisy Pontes Netto, que coordena o laboratório de toxicologia animal da UEL, pela colaboração e parceria;

Aos bolsistas envolvidos na fase laboratorial e de coleta: Taynara Prestes, André Neves, Bruna Fernanda, Kelly Oliveira, Carina Galvão e em especial a Analice Brigatti, que estendeu sua participação até a tabulação dos dados;

Às professoras e amigas Dra. Magali Pozza e Dra Maximiliane Alavarse Zambom da Unioeste, pela grande contribuição;

Aos colegas todos do PPZ, cujos nomes omito, pela amizade e convivência e ajudas nos momentos mais tensos;

A Sra. Daniela Andressa Lino Lourenço, pela grande ajuda na fase de análise, pela amizade e excepcional paciência;

A banca de qualificação, pela grande contribuição para os ajustes, na arguição e para o artigo final.

Biografia

CARLOS EDUARDO CRISPIM DE OLIVEIRA RAMOS, nascido aos 21 de setembro de 1980 no Jaguarí de Cima, Município de Camanducaia, Estado de Minas Gerais, filho de Luiz Carlos de Oliveira Ramos e Nadir Crispim de Oliveira Ramos.

Foi graduado em Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá – PR, no ano de 2004, ingressou no Programa de Pós-graduação em Zootecnia, curso de mestrado, área de concentração de Produção Animal no ano de 2006. Em 2008, ingressou no curso de Doutorado na mesma área de concentração pelo Programa de Pós-graduação em Zootecnia-UEM e na linha de pesquisa de Sistemas de Produção em Bovinos Leiteiros.

Em dezembro de 2010 submeteu-se à banca de qualificação e em fevereiro de 2011 submeteu sua tese à arguição da banca para a defesa do trabalho.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ocorrência geográfica das micotoxinas.....	19
Tabela 2 – Alguns alimentos de origem animal, sujeitos a contaminação natural com micotoxinas.....	20
Tabela 3 – Estatísticas para a análise de variância e teste de médias utilizando MLG (Modelos Lineares Generalizados) para a quantificação de Aflatoxina M ₁ em um arranjo fatorial.....	44
Tabela 4 – Probabilidades de ocorrência de contaminantes a partir dos MLG <i>probit</i> , família binomial, para as interações alimentos: região e alimentos: período	46
Tabela 5 – Efeito das fontes de contaminação por resíduos de organofosforados e carbamatos sobre a presença ou ausência ^a no leite.	47
Tabela 6 – Estimativas dos efeitos diretos (diagonal em negrito) e indiretos, da soma dos efeitos indiretos (IND), da correlação (COR) e da razão entre os efeitos diretos e indiretos (DIR/IND) das fontes de contaminação por micotoxinas sobre a incidência de aflatoxina M ₁ para o total da amostragem.	61
Tabela 7– Estimativas dos efeitos diretos (diagonal em negrito) e indiretos, da soma dos efeitos indiretos (IND), da correlação (COR) e da razão entre os efeitos diretos e indiretos (DIR/IND) das fontes de contaminação por micotoxinas sobre a incidência de aflatoxina B ₁ para o total da amostragem.	63
Tabela 8 – Relação das variáveis de eleição submetidas à ACM e seus níveis de ocorrência	72
Tabela 9a – Correlação entre as variáveis transformadas para a ACM – parte 1	76
Tabela 9b – Correlação entre as variáveis transformadas para a ACM – continuação.....	77

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Modelo conceitual da dinâmica entre qualidade e contaminação do produto leite e suas variáveis de estado e fluxos.	22
Figura 2 - Esquema dinâmico do sistema de produção leiteiro, dividido em dois subsistemas: decisão e biológico + técnico, para a construção dos resultados na produção.	24
Figura 3 – Diagrama de blocos dos fluxos da contaminação do leite e suas possíveis fontes	26
Figura 4 – Proporção de amostras contaminadas por AFM ₁ <i>versus</i> não contaminadas segundo o limite de detecção 0,2 ppb	43
Figura 5 – Contaminação por resíduos químicos por fonte alimentar, colheita e região para os SPL de acordo com os MGL	45
Figura 6 – Contaminação de micotoxinas por fonte alimentar da dieta dos rebanhos para os SPL analisados	59
Figura 7 – Diagrama de trilha para os principais efeitos e erros associados às estimativas ...	64
Figura 8 – Representação das variáveis e suas contribuições para a formação das duas primeiras dimensões da ACM.....	75
Figura 9 – Representação dos níveis de incidência das variáveis sobre o plano fatorial e interpretação da ACM.....	78
Figura 10 – Representação das tipologias dos SPL sobre o plano fatorial para a ACM.	80

LISTA DE TERMOS E ABREVIACOES

ACM – Análise de Correspondências Múltiplas
ACP – Análise de Componentes Principais
AFB1 – Aflatoxina B₁
AFB2 – Aflatoxina B₂
AFG1 – Aflatoxina G₁
AFG2 – Aflatoxina G₂
AFM₁ – Aflatoxina M₁
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC – Association of Official Analytical Chemists
ATER – Assistência Técnica e Extensão Rural
CCD – Cromatografia em Camada Delgada
CHA – Classificao Hierárquica Ascendente
ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FAO – Food and Agriculture Organization
GC – Gás Chromatography
HPLC – High-Performance Liquid Chromatography
MLG – Modelos Lineares Generalizados
OCRA – Ocratoxina
ppb – Partes por bilhão
ppt – Partes por Trilho
SPL – Sistemas de Produo Leiteiros
TLC – Thin Layer Chromatography
WHO – World Health Organization
ZEA – Zearalenona

SUMÁRIO

Contaminação por micotoxinas, resíduos de organofosforados e carbamatos: influência na qualidade do leite / Carlos Eduardo Crispim de Oliveira Ramos, Maringá: [s.n.], 2011.	iii
Epígrafe.....	ii
Dedicatória.....	iii
Biografia	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	8
LISTA DE TERMOS E ABREVIACÕES	9
SUMÁRIO.....	10
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
CAPÍTULO I	17
INTRODUÇÃO GERAL.....	17
<i>Uma visão geral da origem dos efeitos de contaminação na produção de alimentos ...</i>	17
<i>As micotoxinas e sua importância na contaminação de alimentos</i>	18
<i>A cadeia de produção de leite.....</i>	21
<i>O sistema de produção leiteiro e a ação sobre a contaminação do leite</i>	23
<i>Das técnicas de colheita de dados</i>	27
<i>Da abordagem analítica</i>	28
LITERATURA CITADA	32
OBJETIVO GERAL	36
CAPITULO II.....	37
A Influência de Região e Períodos na Contaminação por Aflatoxina M ₁ e Caracterização dos Carbamatos e Organofosforados no Leite, no Estado do Paraná	37
RESUMO.....	37
ABSTRACT.....	38
Introdução	39
Material e métodos.....	40
Resultados e discussão.....	43
Conclusão.....	48
Literatura citada	50
CAPITULO III.....	53
Analisando as Fontes de Contaminação de Micotoxinas: O que contribui para os Níveis de Aflatoxina M ₁ ?.....	53
RESUMO.....	53
ABSTRACT.....	54

Introdução	55
Material e métodos.....	56
Resultados e discussão.....	59
Conclusão.....	65
Literatura citada.....	66
CAPITULO IV	68
As causas da contaminação química e biológica do leite segundo análise das práticas adotadas nos Sistemas de Produção de Leite.....	68
RESUMO.....	68
ABSTRACT.....	69
Introdução	70
Material e métodos.....	71
Resultados e discussão.....	75
Conclusão.....	82
LITERATURA CITADA	83
APÊNDICES IV	86
APÊNDICE A.....	87
Quadro 1 - Mapa do Estado do Paraná discriminando as regiões pesquisadas	87
APÊNDICE B	88
QUESTIONÁRIO TÉCNICO – MAPA/CNPq/UEM.....	88

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a contaminação do leite nos SPL tanto por micotoxinas quanto por resíduos químicos de organofosforados e carbamatos foi realizado um estudo englobando 95 SPL em três regiões no estado do Paraná. Foram colhidas amostras de leite, água e alimentos, sendo avaliados os resíduos químicos para todas as amostras e de aflatoxinas apenas para os alimentos e o leite. As micotoxinas nos alimentos (Aflatoxinas B1, B2, G1, G2, Zearalenona e Ocratoxina) foram detectadas por meio do método de cromatografia de camada delgada – CCD e para a determinação da AFM₁ foi utilizado um kit de imuno-ensaio ELISA competitivo, Ridascreen[®]. A determinação dos resíduos de carbamatos e organofosforados foi realizada por método colorimétrico qualitativo. Foram avaliadas as diferenças entre regiões, períodos, as fontes de contaminações por micotoxinas. Carbamatos e organofosforados foram avaliados quanto a sua presença no leite e nas fontes de alimentação e água. Posteriormente foram estimadas as contribuições de cada micotoxina para a contaminação do leite, bem como a de seus respectivos alimentos contaminados. Foram encontradas diferenças entre os períodos ($p < 0,05$) para a contaminação do leite com AFM₁. Para os carbamatos e organofosforados foi detectada a distinção das fontes de contaminação ($p < 0,01$), sendo para os primeiros os pesticidas usados para o controle de parasitoses do rebanho, e para os outros, os agrotóxicos utilizados na agricultura. Para as fontes de contaminação alimentar originando a contaminação por AFM₁ foi detectado que a AFB₁ foi a principal fonte para a primeira. A AFG1 apresentou forte correlação ($p < 0,01$) com os níveis de AFB₁ sugerindo uma relação causal com esta em função das cepas fúngicas produzindo ambas ao mesmo tempo. Constatou-se ainda a prevalência da contaminação por aflatoxinas em 70% das amostras contaminadas.

Palavras-chave: micotoxinas, produção leiteira, pesticidas, alimentação do rebanho

ABSTRACT

Aiming to evaluate the milk contamination in the DPS for mycotoxins and chemical residues of organophosphates and carbamates it was made a study encompassing 95 SPL in three regions of Parana state. There where collected samples of milk, water and food and they were evaluated for chemical residues in all samples and aflatoxin only for food and milk. Mycotoxins in food (aflatoxin B1, B2, G1, G2, zearalenone and ochratoxin) were detected by the method of thin layer chromatography - TLC and for the determination of aflatoxin M1 was used an immunoassay kit competitive ELISA Ridascreen ® . The residues of organophosphates and carbamates was performed by colorimetric method qualitatively. There were evaluated the differences between regions, periods and the sources of mycotoxin contamination. Carbamates and organophosphates were screened for their presence in milk and the sources of food and water. Then it was estimated the contributions of each mycotoxin for milk contamination, as well as their respective contaminated food. Differences were found between periods ($p < 0.05$) for milk contamination with aflatoxin M1. For carbamates and organophosphates were found a different contamination sources ($p < 0.01$), and for the first pesticides used to parasitic herd control and for other pesticides used in agriculture. For food sources contamination resulting in the AFM1 contamination it was detected that AFB1 was the main source for the first. The AFG1 showed a strong correlation ($p < 0.01$) with AFB1 levels suggesting a causal relationship is a function of fungal strains producing both at the same time. It was also found the prevalence of aflatoxin contamination in 70% of contaminated samples and its predominant presence in relation to others in all kinds of foods analyzed.

Keywords: mycotoxins, dairy production, pesticides, herd feeding

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

Uma visão geral da origem dos efeitos de contaminação na produção de alimentos

As atividades antrópicas¹ nos dois últimos séculos aumentaram sensivelmente em todas as regiões do planeta. Suas consequências mudaram profundamente a face da Terra em todos os sentidos.

A indústria, o comércio e as relações entre as nações passaram a ser regidas pela lógica da revolução industrial, pela visão desenvolvimentista de mundo. Acompanhando essas tendências, por uma lógica natural, o aumento crescente da população impulsiona as indústrias de todos os gêneros alimentícios, incluindo as agroindústrias e indústrias químicas, que intensificaram e ampliaram suas operações com perspectivas muito claras de crescimento. Nada obstante, uma das consequências deletérias imediatas a médio e longo prazo foi a descarga de grandes quantidades de diversos compostos químicos provenientes das indústrias nos diversos compartimentos ambientais (ALMEIDA et al. 2007).

No último quarto de século no Brasil, houve consequências de todo esse processo histórico, no que tange a produção de alimentos provenientes da agricultura e pecuária. Uma delas, que convém ressaltar, é o desenvolvimento desigual dos elos das cadeias agro-alimentares.

¹ Toda ação ou resultado proveniente da intervenção do Homem sobre o Meio ambiente.

Os elos industriais desenvolvidos fazem sentir sua influência, em vários matizes, nos elos primários, ou seja, de produção de matéria-prima e da mesma forma sobre as populações humanas sob sua influência.

A difusão de tecnologias e de pacotes tecnológicos baseados nos produtos e serviços oferecidos a partir do pressuposto da necessidade da tecnificação e industrialização das cadeias produtivas (VEIGA, 1999) cresceu assustadoramente, sem o crescimento correspondente na qualificação dos usuários, os produtores rurais, assistentes técnicos e órgãos de ATER², pública ou privada. Como corroboração desse fato, em 2006, segundo a ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – o Brasil passou a ser o segundo maior consumidor mundial de agrotóxicos (RODRIGUES, 2006) e ainda, segundo pesquisa desenvolvida pela mesma agência utilizando 4.000 amostras de alimentos destinados ao consumo humano, a taxa de contaminação acima dos níveis máximos permitidos pela legislação foi de 28%.

Especificamente no caso dos produtos químicos: quimioterápicos, agrotóxicos, antibióticos, aditivos e toda a gama de produtos utilizados na produção animal e vegetal, há sérias discussões sobre suas formas de utilização e influências na saúde pública. Medidas regulatórias contra a contaminação ambiental, efeitos nocivos sobre os seres vivos e produtos de consumo humano são o foco atual de várias instituições e agências de alcance mundial (EEA, 2005; 2006; European Commission - DG ENV, 2010; WHO, 1997; FAO/WHO, 2008). Os contaminantes não são apenas de natureza industrial, mas podem ser de natureza biossintética e ligados aos processos de produção agropecuária como é o caso das micotoxinas.

As micotoxinas e sua importância na contaminação de alimentos

Micotoxinas são metabólitos secundários de baixo peso moleculares produzidos por certos gêneros de fungos filamentosos como principalmente *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (IHESHIULOR et al. 2011). Segundo o mesmo autor, infestam as culturas, principalmente cereais, ainda no estágio de campo, sob condições favoráveis de temperatura e umidade.

² Assistência Técnica e Extensão Rural - ATER

Não há região do planeta que esteja livre das micotoxinas, são estimadas 300 moléculas nocivas dessa natureza. Segundo a FAO (1998), estima-se que mais de 25% de todas as culturas no planeta contêm micotoxinas. Na tabela 1, está apresentada a ocorrência de micotoxinas por grandes regiões do mundo.

Tabela 1 – Ocorrência geográfica das micotoxinas

Locais de ocorrência	Micotoxinas
Europa Ocidental	Ocratoxina, vomitoxina, zearalenona
Europa Oriental	Zearalenona, vomitoxina
América do Norte	Ocratoxina, vomitoxina, zearalenona, aflatoxina
América do Sul	Aflatoxina, fumosina, ocratoxina, vomitoxina, T-2toxina
África	Aflatoxina, fumosina, zearalenona
Ásia	Aflatoxina
Austrália	Aflatoxina, fumosina

Fonte: DEVEGOWDA et al., 1998.

Essas moléculas têm uma grande importância para a saúde pública e também econômica no que diz respeito à produção animal. Suas propriedades tóxicas para humanos têm um amplo espectro, merecendo atenção especial às carcinogênicas (WAN NORHASHIMA et al., 2009; CALDAS et al., 2002). As micotoxinas estão presentes em várias *commodities* e representam o mais perigoso dos contaminantes de alimentos atualmente (OKOLI, 2005; IHESHIULOR et al. 2011), em razão de:: i) quantidade absoluta nos estoques de alimentos, ii) ocorrência mundial, iii) efeitos tóxicos e sinérgicos (OMEDE, 2008).

Rodríguez-Amaya & Sabino, (2002) conduziram uma grande revisão e sumarização de trabalhos feitos no país sobre o assunto e observaram o acréscimo de 27% de investigações, representando 128 artigos indexados, sobre esse assunto de 1991 a 2000 demonstrando que o problema, de alguma forma, tomou uma conotação mais preocupante, no Brasil.

Desta forma torna-se importante avaliar os riscos de micotoxinas nos sistemas de produção de leite por (dentre outros) dois motivos principais: 1) o considerável consumo de cereais (o que será tratado a seguir) e alimentos conservados, provenientes da agricultura, pelas vacas em lactação e 2) o extenso e amplo uso do leite na alimentação humana, principalmente de crianças, seja como tal ou como ingrediente.

A seguir é apresentado um demonstrativo de alguns efeitos das principais micotoxinas provenientes de fontes animais para a saúde humana segundo dados da FAO, (1998) na Tabela 2.

Tabela 2 – Alguns alimentos de origem animal, sujeitos a contaminação natural com micotoxinas

Micotoxina	Efeito potencial em humanos	Ocorrência	Nível máximo informado (ppb)**
Aflatoxina B ₁	Câncer hepático	Ovos	0,4
		Fígado suíno	0,5
		Músculo suíno	1,04
		Rim suíno	1,02
Aflatoxina M ₁	Carcinogênico	Leite*	0,33
Ocratoxina A	Danos renais	Fígado suíno	98
		Rins	89
		Salsichas	3,4
Zearalenona	Estrogênico	Fígado suíno	10
		Músculo suíno	10

* Nível máximo permitido no MERCOSUL: 0,50 ppb; UE: 0,05 ppb; EUA: 0,50 ppb ; Canadá: 0,05 ppb.

**Referência de dimensão da medida: µg/Kg.

Os métodos de detecção desses contaminantes são relativamente sofisticados indo desde métodos qualitativos (colorimétricos de presença ou ausência) até métodos quantitativos com alta sensibilidade de detecção como ELISA competitivo, Cromatografia de Camada Delgada (TLC), Cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e Cromatografia gasosa (GC) (RODRÍGUEZ-AMAYA & SABINO, 2002; TURNER et al. 2008).

Desta forma caracterizam as micotoxinas como um desafio atual e importante a ser equacionado em saúde pública e produção animal, áreas interdependentes. Uma importante representante desse cenário é a cadeia do leite, que é objeto de interesse deste trabalho. A cadeia do leite tem algumas características ímpares que merecem ser ressaltadas para um melhor entendimento e desenvolvimento das argumentações subsequentes.

A cadeia de produção de leite

A produção leiteira tem uma grande importância cultural e econômica para o Brasil e atualmente movimenta um mercado mundial bastante significativo chegando a algo em torno de 20,16 milhões de toneladas anuais (IBGE, 2006).

Pelas condições de alimentação e fornecimento de cereais às vacas leiteiras, como suplemento ou como base da ração, pode-se quantificar a importância do impacto da contaminação destes produtos agrícolas. Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal (SINDIRAÇÕES, 2010) 4,3 milhões de toneladas de concentrados foram fornecidos para o rebanho leiteiro brasileiro no ano de 2009.

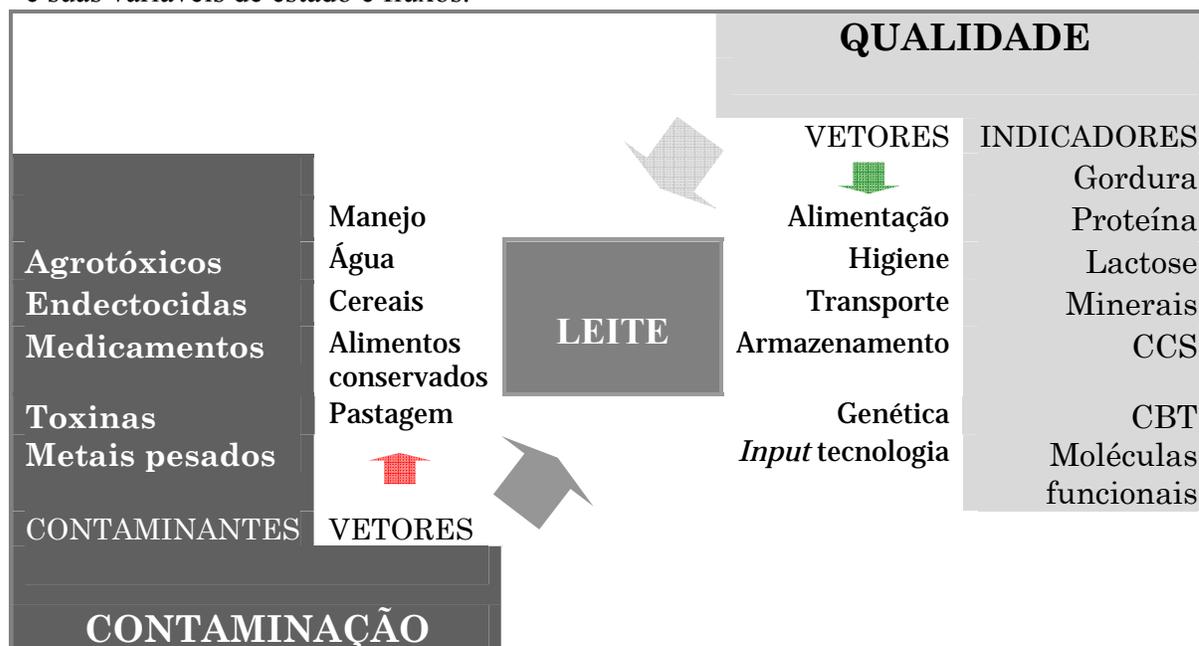
Significa dizer que cada uma das 12,63 milhões de vacas ordenhadas (IBGE, 2006), receberam na média nacional em torno de 340 kg de concentrados ao ano, ou seja, 1,1kg/animal/dia de lactação³. A alimentação concentrada, bem como as silagens, são fontes importantes tanto para contaminação por agrotóxicos (NERO et al, 2007) quanto para as micotoxinas (OLIVEIRA et al. 2010) provenientes principalmente dos processos de estocagem de cereais.

Os metais pesados podem também estar presentes na contaminação do leite, seu vetor de contaminação do leite é usualmente a poluição dos cursos e reservatórios subterrâneos de água (OKADA et al. 1997).

No esquema abaixo (Figura 1), busca-se elucidar a dinâmica da contaminação *versus* a qualidade do leite por meio de um modelo conceitual.

³ Considera-se uma lactação ajustada para 305 dias.

Figura 1 – Modelo conceitual da dinâmica entre qualidade e contaminação do produto leite e suas variáveis de estado e fluxos.



Do esquema apresentado se subentende que existem variáveis que originam a contaminação, bem como alguns componentes ou fatores que traduzem a qualidade do leite. Por dedução existe alguma complementaridade entre a qualidade e a inocuidade do alimento leite.

Por outro lado o leite é um dos resultados (em muitos casos o principal) de um sistema de produção bastante complexo, quanto à natureza (HOUSTIQU, 2006); diverso, quanto ao conjunto de sistemas (DAMASCENO et al. 2008) e abrangente, quanto a sua representação quantitativa no estado do Paraná, que atualmente passa dos 114,4 mil produtores (IPARDES, 2009).

Assim a análise e a compreensão da contaminação em si, mas também dos processos que a ocasionam dentro dos sistemas de produção, seus determinantes regionais e suas peculiaridades condicionadas pela natureza diversa desses sistemas, torna-se uma tarefa mais desafiadora.

Para entender como deverá ser abordado esse problema é necessário o aprofundamento nas características dos sistemas de produção leiteira quanto a sua dinâmica de funcionamento ou pilotagem estratégica (RAMOS, 2008).

O sistema de produção leiteiro e a ação sobre a contaminação do leite

Para entender como deverá ser abordado esse problema é necessário o entendimento sobre alguns conceitos úteis, o primeiro deles é o de *sistemas de produção*. Originalmente cunhado como “*Systèmes d’élevage*” no trabalho clássico de Landais (1987), referindo-se ao estudo, sistematização, organização da atuação sobre os produtores envolvidos com a produção animal da França. Foi definido por Dedieu et al. (2008) como: “um conceito que objetiva levar em conta as interações as dimensões humanas e biotécnicas dos sistemas de produção”. Esse entendimento facilita a estruturação do esforço de pesquisa e evita as simplificações excessivas das abordagens univariadas, geralmente experimentais.

O estudo de fenômenos contemporâneos no contexto real, em que as divisões entre o fenômeno e o contexto não são claramente definidos (YIN, 2005) não há, na maioria dos casos, como exercer controles locais, portanto a utilidade da abordagem multifatorial dos sistemas de produção leiteiros.

No caso específico da contaminação do leite é necessário entender não só do processo de contaminação em si, dentro da porteira ou dos meios de determinação deste último (FAGAN, 2006; SOUZA et al. 2003), mas de como ele reage as diferentes condições de “fazenda”, de região, de práticas de manejo, de ofertas de alimento, das estratégias de gestão zootécnica, de ATER, de possibilidades de investimento e *input* tecnológico e outros diversos fatores não listados.

Dedieu (2009) propõe a análise e qualificação das capacidades adaptativas dos sistemas de produção, ou seja, sua habilidade em absorver impactos de instabilidades, tanto de natureza endógena (rebanho, sanidade, reprodução, alimentação, produção forrageira) como exógena (mudanças climáticas, eventos climáticos extremos, políticas reguladoras, surtos de doenças, variação no preço de insumos e preços do leite).

A maior ou menor capacidade de absorção desses impactos é designada com o termo “resiliência⁴” e esta é preponderantemente relacionada à forma com que o produtor gere sua propriedade, sendo mais ou menos conservador com relação à adoção de tecnologias ou boas práticas de produção, que definem os atributos do produto final, o leite⁵.

⁴ Um termo originário da **física**, redefinido pela **psicologia** como a capacidade do indivíduo lidar com problemas, superar obstáculos ou resistir à pressão de situações adversas - choque, estresse, etc.

⁵ Vide Quadro I - Modelo conceitual da dinâmica entre qualidade e contaminação do produto leite e suas variáveis de estado e fluxos.

Para a elucidação do funcionamento do sistema de produção leiteira propõe-se o esquema contido na Figura 2.

Fonte: RAMOS et al. (2008)

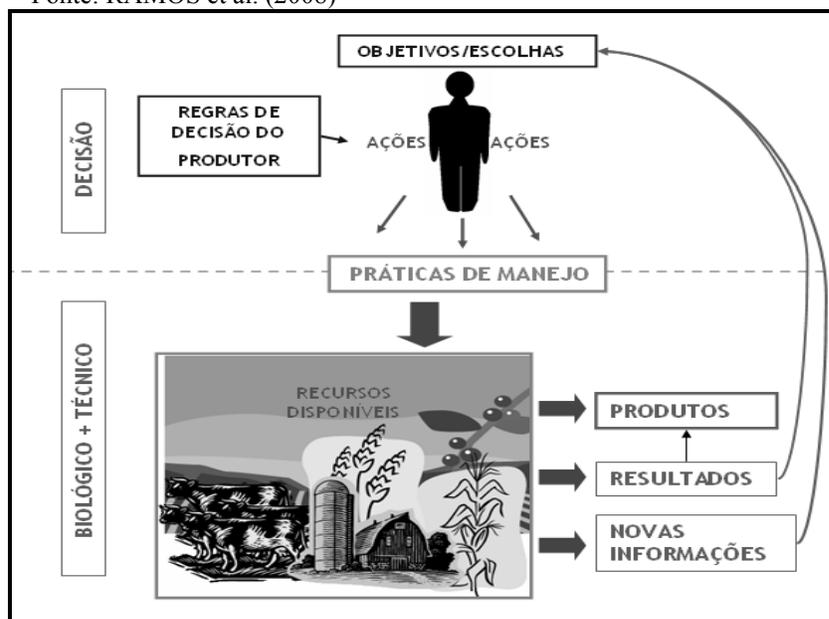


Figura 2 - Esquema dinâmico do sistema de produção leiteiro, dividido em dois subsistemas: decisão e biológico + técnico, para a construção dos resultados na produção.

Os fatores predisponente para a construção da qualidade, tanto quanto para a contaminação podem ser abordados nos pontos a seguir, descritos na Figura 2:

- a. RECURSOS DISPONÍVEIS: pode-se entender sobre toda a espécie de insumos quanto a sua aquisição, qualidade, quantidade, tempo de armazenamento forma de utilização e distribuição intra-anual de sua utilização.
- b. NOVAS INFORMAÇÕES: baseados em resultados atuais, anteriores ou em informações externas, vindas da assistência técnica, pesquisa ou ainda de outras fontes de informações que possam interferir no planejamento e nas ações futuras.
- c. REGRAS DE DECISÃO: avaliação interna do produtor (em conjunto com a família ou não), que como sujeito e organizador da produção aceitam, rejeitam e concretizam suas decisões, ponderadas por critérios tantos externos (item anterior) quanto intrínsecos (perfil psicológico, fatores culturais, etc.)

- d. PRÁTICAS DE MANEJO: veículo tanto da **materialização das decisões do produtor** como da determinação das saídas, ou dos diversos resultados do sistema de produção de leite, entre eles o próprio produto leite.

As práticas de manejo definem a continuidade dos sistemas de produção leiteira, bem como todos os seus indicadores produtivos e de qualidade de produtos e processos envolvidos direta ou indiretamente com a contaminação do produto final. É por meio das práticas de manejo que se podem acessar os dados de análise para uma pesquisa de campo como esta.

Normalmente dados para pesquisas desta natureza são obtidos conjugando esforços de coletas tradicionais de amostras (indicadores físicos e biológicos do fenômeno), de dados produtivos e estruturais, que dão uma ideia das variáveis de estado do sistema de produção.

O passo seguinte é obtenção de dados acerca dos processos que constituem a estratégia produtiva do sistema e que levarão aos pontos críticos da contaminação do leite. Isso pode ser feito por meio de questionários semiestruturados orientando entrevistas para colheita de dados, de acordo com a metodologia utilizada e descrita por Damasceno et al. (2008) e Ramos (2008).

A seguir é apresentada uma descrição sintética, diagrama de bloco, da contaminação do leite em um sistema leiteiro (Figura 3)

Os fluxos representados fornecem o modelo de abordagem para o problema da contaminação, segundo a teoria de sistemas de produção, da porteira para dentro. Os componentes de contaminação visam identificar as fontes desta e medi-la em cada um dos vetores: i) água, ii) cereais (concentrados e resíduos da produção agrícola são considerados nessa grande categoria), iii) alimentos conservados (silagens e toda espécie de conservados incluindo fenos) e iv) pastagens.

Fonte: Pesquisa de campo (2009 – 2010).

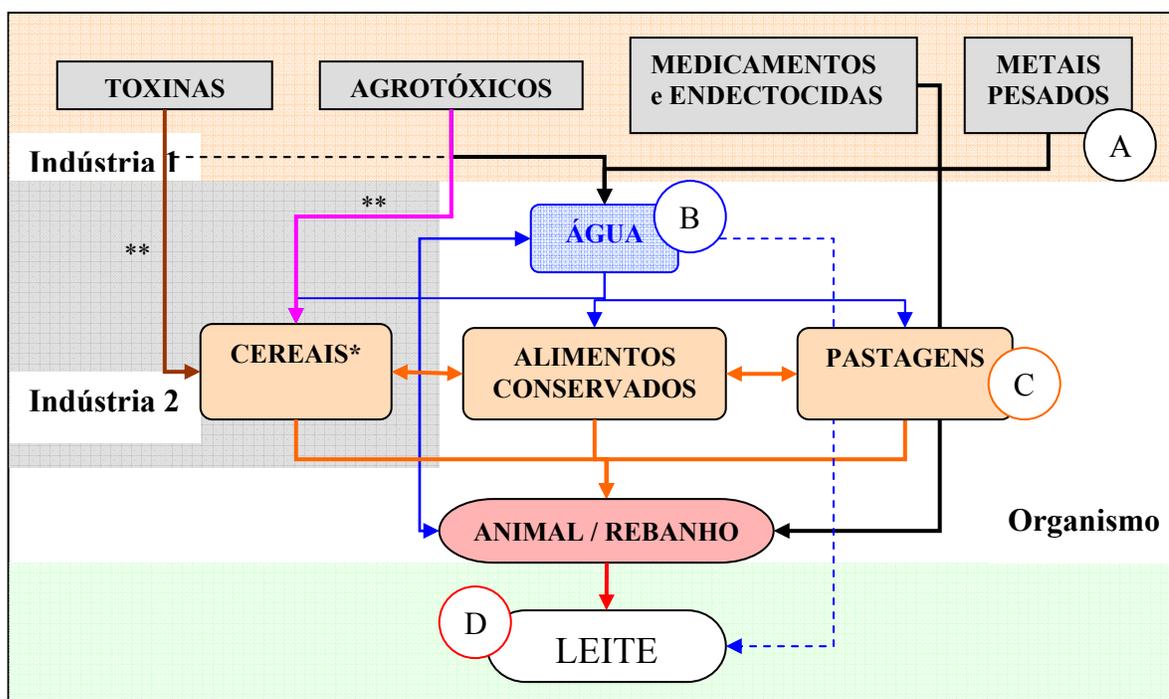


Figura 3 – Diagrama de blocos dos fluxos da contaminação do leite e suas possíveis fontes⁶

Outra função deduzida do diagrama é a relação dos fluxos com as variáveis, possíveis de serem descritas por meio de modelos determinísticos, empíricos ou estocásticos (BALDWIN, 1995) utilizando-se de equações diferenciais, em nível de sistemas complexos (SCHWINNING & PARSONS, 1996).

Essas relações também podem ser descritas em termos de comparação, dentro de uma amostragem, utilizando a abordagem estatística para construir tipologias de sistemas leiteiros (SMITH et al.2002) de acordo com as particularidades de cada um sobre o quesito: “processos que levam à contaminação”.

A abordagem estatística mais comum para esses estudos, são as técnicas multivariadas (LEBART, 2000) abordadas a seguir em detalhes.

⁶ A intensidade dos fluxos está representada pela espessura das linhas em quatro níveis (A, B, C e D) da origem, passando pelos vetores de contaminação até o produto. Os símbolos significam: * podem ou não ser industrializados; ** vias de contaminação direta que incidem sobre todos os componentes no nível “C”.

Das técnicas de colheita de dados

Existem neste trabalho dois paradigmas diferentes de coletas de dados por se tratar de um trabalho em parte conduzido de forma tradicional, em parte não experimental e não sujeito a controle local planejado.

O primeiro se refere à colheita de amostras a campo e análise química, bromatológica e bioquímica de indicadores da contaminação (alimentos diversos, concentrados, volumosos conservados, leite e água) e de indicadores regionais em que os SPL estão inseridos. Esses dados são de coleta e análise corriqueira nos domínios da zootecnia e serão analisados de forma clássica, univariada explicitada em detalhes nos artigos subsequentes.

O segundo paradigma se refere aos dados que descrevem processos, obtidos por meio de entrevistas, enquetes, questionários e outras ferramentas pouco usuais nestes domínios. Por esse motivo será dada mais atenção as suas implicações práticas e metodológicas no presente item desta revisão.

A colheita destes dados é um ponto fundamental de estudos dessa categoria, pois, principalmente para as variáveis que descrevem processos, muitas vezes qualitativas e categóricas é necessário rigor para que não haja viés de interpretação ou confusão, dado o grau de subjetividade de muitas das informações. O problema das variáveis qualitativas para a interpretação de dados é discutido por Minayo & Sanches, (1993).

Para Foddy, (2003) a questão da construção das entrevistas e questionários é um ponto fundamental nas pesquisas de obtenção de dados a partir de pessoas, para este autor o cerne do problema se concentra em falhas corriqueiras como:

- a. Quando o respondente não entende o que foi perguntado;
- b. Alguma falta de interesse dos respondentes em responder às questões em alguns casos;
- c. Os respondentes não estão propensos a querer responder sobre certas atitudes e comportamentos que apresentam;
- d. Falha dos respondentes em responder, lembrar ou compreender questões sob situações estressantes (particularmente em entrevistas); e,
- e. Falhas do entrevistador de várias naturezas (tendência em interpretar as perguntas, trocar palavras por algumas que crê ser equivalentes, falhas na formulação do questionário).

Mesmo assim, com suas limitações as entrevistas, enquetes e questionários se mostram uma poderosa ferramenta na obtenção de dados notadamente nas ciências humanas⁷, ciências da saúde (MOLINA et al.2010) e mais recentemente nas ciências agrárias (HOSTIOU, 2006; DEDIEU, 2008; DAMASCENO et al., 2008).

Dentro do método de coleta de dados por entrevistas e questionários ainda há algumas variações na forma e na mecânica de obtenção de informação que merecem alguma atenção, por influenciar nas estatísticas, de forma mais sutil ou induzindo a erros (VERGER, 2004).

A discussão básica é acerca dos questionários ditos “fechados” ou estruturados em que as respostas são opções, respondidas por formulário impessoalmente ou apresentadas em meio a uma entrevista. Questionários abertos ou não estruturados são aqueles que não há, na medida do possível, intervenção ou direcionamento das respostas por parte do entrevistador.

Entre esses extremos existem os semiestruturados, que são questionários em que se usa algum direcionamento das perguntas e respostas, mas não dentro de opções herméticas, com é o caso do estruturado (ROEHSIG, 2005). Uma revisão mais detalhada entre os prós e contras de cada abordagem é encontrada em Foddy, (2003).

Erros de perguntas mal formuladas ou respostas enviesadas podem ser consideravelmente minimizados se houver um grupo de trabalho com discussões assíduas sobre as variáveis e sobre a abordagem metodológica dos dados. Em Bodenmüller, (2008) é assinalada a importância da discussão do grupo de pesquisa acerca da obtenção dos dados e construção das variáveis.

Da abordagem analítica

A abordagem de dados de SPL para determinar os componentes e os processos de contaminação do leite lança o foco da pesquisa para a unidade experimental “propriedade”.

Bondenmüller Filho et al. (2010), exploraram, neste contexto, a caracterização da qualidade do leite no estado do Paraná em mais de 1.000 estabelecimentos com os pressupostos: a) a qualidade do leite é uma construção; b) ela é definida por alguns

⁷ Notadamente na psicologia, antropologia e ciências sociais aplicadas.

componentes principais ligados ao sistema de produção e c) a inferência desses componentes é feita a partir da diversidade dos sistemas estudados.

Assim, por definição, um objeto complexo deve ter um tratamento equivalente que reduza a sua dimensionalidade sem simplificar excessivamente as informações provenientes deste (LEBART, 2000).

Para isso os métodos multivariados de estatística são necessários para a abordagem. Esses métodos (frequentistas ou não) derivam basicamente de análises exploratórias, classificatórias e fatoriais. As peculiaridades dessas análises variam de acordo com o objetivo do estudo e com a natureza intrínseca dos dados ou variáveis, sejam esses quantitativos qualitativos ou um conjunto misto (MINAYO & SANCHES, 1993).

As principais abordagens neste estudo poderão ser feitas pela: Análises de Componentes Principais – ACP; Análise de Correspondências Múltiplas – ACM e Análise de Classificação Hierárquica Ascendente – CHA (pelo método de *Clusters*). A finalidade dos usos dessas técnicas é: 1) definir variáveis de importância explicativa, 2) explicar a estrutura de correlações entre variáveis e casos e 3) construir **tipologias**, definidas como a ciência da elaboração de “tipos” com a finalidade de guiar análises de dados em uma realidade complexa (LANDAIS, 1998). As análises de dados de natureza univariada também são usadas nessa seara analítica, porém não diretamente aos dados brutos que descrevem os processos, mas aos dados de respostas diretas (contaminação do leite em função de época ou região, por exemplo).

Uma descrição mais detalhada dos métodos multivariados úteis para esse trabalho se segue:

- ACP – A análise de Componentes principais pode ser descrita como se segue, em termos matemáticos.

Seja $X = (X_1, \dots, X_p)$ um conjunto de variáveis observadas sobre n objetos (casos), os componentes principais C_i são definidos como:

$$C_i = \sum_j a_{ij} X_j, \text{ sujeito a:}$$

- a) $\text{var}(C_i) = \text{máxima}$

$$b) \sum_i a_{ij}^2 = 1$$

$$c) \text{cor}(C_i, C_{i'}) = 0, \text{ para } i \text{ diferente de } i'; i = 1, \dots, p$$

em que: a = objeto (caso) na i -ésima observação para a j -ésima variável

X = variável original variando de 1 a " p "

C = *Componente Principal* variando de 1 a " q " sendo q o total de iterações até a convergência a 100% da variância.

Deste modo, podem-se destacar algumas características essenciais da ACP segundo Kubrusly (2001). A primeira é que sendo uma análise com propriedades geométricas a dispersão dos dados é importante, pois está associada à quantidade de variância contida nos mesmos, proveniente das combinações lineares das variáveis originais. Portanto a variância (variância explicada ou também inércia) é a medida central, pois traduz a informação contida em cada variável, obtida por sua vez, a partir dos autovalores.

- ACM – A Análise de Correspondências Múltiplas, é um caso especial da Análise de Correspondências, basicamente é similar a ACP em interpretação, porém suas estatísticas são calculadas levando em consideração que suas variáveis são categóricas, ou seja, aplica-se aos dados discretos, inclusive qualitativos.

Suas estatísticas são complexas do ponto de vista matemático, porque envolvem uma pesada notação de álgebra matricial (De LEEUW, 1984), não muito comum nesta área de estudo, mas seguem algumas definições simples para o entendimento funcional.

Desta forma:

- a) as ponderações levam em conta a variável X_{ij} , sendo:
- b) X na sua i -ésima observação para a j -ésima categoria (ou nível);
- c) As categorias são exclusivas, cada caso só pode assumir uma categoria por variável.
- d) À Análise de Correspondências é aplicada a matriz indicadora \mathbf{Z} com n linhas (sistemas de produção leiteiros ou propriedades) e p colunas que categorias nominais das variáveis de estudo, no caso as variáveis relativas aos processos

produtivos que podem ocasionar a contaminação do leite ou dos vetores de contaminação⁸.

- e) A seguir a matriz Z é padronizada em cada elemento para G por seus respectivos perfis de linha (r_i) e coluna (c_j) de acordo com:

$$g_{ij} = \frac{z_{ij}}{\sqrt{r_j \cdot c_j}}$$

para $0 \leq i \leq n$ e $0 \leq j \leq p$.

Maiores informações sobre as estatísticas dessa análise podem ser vistas em: De Leeuw, (1984); Costa et al., (2008); Abdi & Valentin, (2007) e Lebart (2000).

- CHA – A Análise Hierárquica Ascendente, também chamada de análise de grupamentos ou *clusters* (KUBRUSLY, 2001) é uma técnica baseada nas distâncias Euclidianas de grupamentos de objetos de acordo com determinadas variáveis com segue:

Seja $X = \{X_1, \dots, X_p\}$ um conjunto de variáveis e

$O = \{O_1, \dots, O_n\}$ um conjunto de objetos (sistemas de produção leiteira) que se deseja agrupar.

Tomando o conjunto X , determinar uma partição de O em grupos g_i tal que:

se O_r e O_s pertencem a $g_i \rightarrow O_r$ e O_s são semelhantes,

se O_r pertencem a g_i e O_s pertencem a $g_j \rightarrow O_r$ e O_s são distintos.

Outros detalhes sobre as métricas e os cálculos podem ser vistos em Lebart (2000).

A forma de utilização dessas análises não é uniforme, sendo seguida aquela metodologia, cuja abordagem mais se adapte às características dos dados e que extraia as informações necessárias destes de acordo com a estruturação da hipótese. A construção de tipologias (LANDAIS, 1998) ou a elaboração de índices classificatórios (KUBRUSLY, 2001) está entre essas nuances de utilização do método de estatísticas exploratórias multidimensionais, termo utilizado por Lebart (2000), se referindo às análises multivariadas apresentadas.

⁸ Vide Quadro1 e Figura 2

LITERATURA CITADA

- ABDI, H. VALENTIN, D. Multiple correspondence analysis. In: **Encyclopedia of measurement and statistics..** Ed.: SALKIND, N. Thousand Oaks. Sage, p.651-657, 2007.
- ALMEIDA, F. V., CENTENO, A. J., BISINOTI, M. C., JARDIM, W. F. Substâncias tóxicas persistentes (STP) no Brasil. **Química Nova.** v.30, n.8, p.1976-1985, 2007.
- ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Revista de Saúde Pública.** v.40, n.2, p.361-363, 2006.
- BALDWIN, R. L. **Modelling ruminant digestion and metabolism.** 1st ed. London: Chapman & Hall. 1995. 592p.
- BODENMÜLLER FILHO, A. **Tipologia de sistemas de produção baseada nas características do leite.** Maringá, UEM, Programa de Pós Graduação em Zootecnia 2006. 37p. (Dissertação mestrado)
- BODENMÜLLER FILHO, A., DAMASCENO, J. C., PREVIDELLI, I. T. S., SANTANA, R. G., RAMOS, C. E. C. O., SANTOS, G. T. Tipologia de sistemas de produção baseada nas características do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia.** v.39, n.8, p.1832-1839, 2010.
- CALDAS, E.D., SILVA, S.C., OLIVEIRA, J.N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública.** v.36, n.3, p319-323, 2002.
- COSTA, J. C. G. D., INFANTOSI, A. F. C., ALMEIDA, R. M. V. R., RAMIARINA, R. A. Análise de correspondência múltipla na avaliação de deslocamento inter-municipal para parto. In: 21º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA, 2008, Salvador. **Anais...** Salvador: CEFET-BA, 2008, p.327-330.
- DAMASCENO, J.C., BOUNDERMÜLLER FILHO, A., RAMOS, C. E. C. O., Dos SANTOS, J. C., SANTOS, G. T. O Papel do homem na gestão e controle de qualidade da produção de leite. In: **Inovação tecnológica na cadeia produtiva do leite e a sustentabilidade da pecuária leiteira.** Ed.: SANTOS, G. T., UHLIG, L., BRANCO,

- A. F., JOBIM, C. C., DAMASCENO, J. C., CECATO, U. Maringá. Eduem, 310 p, 2008.
- De LEEUW, J. Statistical properties of multiple correspondence analysis. In: NEW MULTIVARIATE METHODS IN STATISTICS: THE 1984 JOINT SUMMER RESEARCH CONFERENCE SERIES IN THE MATHEMATICAL SCIENCES, 1984, Brunswick. **Proceedings...** Brunswick: Bowdoin College, 1984. 19p.
- DEDIEU, B. Qualificação das capacidades adaptativas de sistemas pecuários. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.38, suplemento especial, p.397-404, 2009.
- DEDIEU, B., FAVERDIN, P., DOURMAD, J.Y., GIBON, A. Système d'élevage, un concept pour raisonner les transformations de l'élevage. **INRA Productions Animales**. v.21, n.1, p. 45-58, 2008.
- DEVEGOWDA, G., RADU, M.L.V., NAZAR, A., SWAMY, H.V.L.M. Mycotoxin picture worldwide : Novel solution for their counteraction. In: ALLTECH'S 14th ANNUAL SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY IN FEED INDUSTRY: PASSPORT TO THE YEAR 2000, 1998. Nottingham. **Proceedings...** Nottingham University Press, 1998, p.248-255.
- EUROPEAN COMMISSION-DG ENV. **Soil biodiversity: functions, threats and tools for policy makers**. Paris: Bio Intelligence Service, 2010. 255p.
- EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY-EEA Report. **Integration of environment into EU agriculture policy - the IRENA indicator-based assessment report**. n.2. Copenhagen: Office for Official Publications of the European Communities, 2006. 60p.
- EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY-EEA Report. **Source apportionment of nitrogen and phosphorus inputs into the aquatic environment**. n.7. Copenhagen: Office for Official Publications of the European Communities, 2005. 48p.
- FAGAN, E. P. **Fatores ambientais e de manejo sobre a composição química, microbiológica e toxicológica do leite produzido em duas granjas produtoras de leite tipo "A" no estado do Paraná**. Maringá, UEM, Programa de Pós Graduação em Zootecnia 2006. 117p. (Tese Doutorado).
- FAO. **Animal feeding and food safety**. FAO Food and Nutrition Paper. Rome: n.69, 1998.
- FAO/WHO - Expert Committee on Food Additives. **Residue evaluation of certain veterinary drugs**. 70^o meeting. Roma: Electronic Publishing Policy and Branch Communication Division-FAO, 2008. 296p.
- FODDY, W. H. **Constructing questions for interviews and questionnaires: Theory and practice in social research**. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. 228p.
- HOSTIOU, N., VEIGA, J. B., TOURRAND, J. F. Dinâmica e evolução de sistemas familiares de produção leiteira em Uruará, frente de colonização da Amazônia brasileira. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v44, n.2, p. 295 – 311, 2006.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Censo Agropecuário 2006**. Rio de Janeiro: IBGE, 2009. 777p.

- IHESHIULOR, O.O.M., ESONU, B.O., CHUWUCA, O.K., OMEDE, I.C., OKOLI, I.C., OGBUEWU, I.P. Effects of mycotoxins in animal nutrition: a review. **Asian Journal of Animal Sciences**. v.5, n.1, p.19-33, 2011.
- IPARDES - Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social-Convênio IPARDES/EMATER/SETI. **Caracterização socioeconômica da atividade leiteira no Paraná**. Curitiba: IPARDES, 2009. 187p.
- KUBRUSLY, L. S. Um procedimento para calcular índices a partir de uma base de dados multivariados. **Pesquisa Operacional**. v.21, n.1, p.107-117, 2001.
- LANDAIS E. **Recherches sur les systèmesd'élevage**. Document de travail. Versailles: INRA SAD, 1987. 70 p.
- LANDAIS, E. Modelling farm diversity, new approaches to typology building in France. **Agricultural Systems**. v.58, n.4, p.505-527, 1998.
- LEBART, L.; MORINEAU, A.; PIRON, M. **Statistique exploratoire multidimensionnelle**. 3.ed. Paris: Dunod, 2004. 439p.
- MINAYO, M. C. S., SANCHES, O. Quantitativo-Qualitativo: oposição ou complementaridade? **Cadernos de Saúde Pública**. v.9, n.3, p.239-262, 1993.
- MOLINA, M. C. B., LOPÉZ, P. M., FARIA, C. P., CADE, N. V., ZANDONADE, E. Preditores socioeconômicos da qualidade da alimentação de crianças. **Revista de Saúde Pública**. v.44, n.5, p.785-792, 2010.
- NERO, L. A., MATTOS, M. R., BELOTI, V., BARROS, M. A. F., PONTES NETTO, D., FRANCO, B. D. G. M. Organofosforados e carbamatos no leite produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e ação sobre *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.27, n.1, p.201-204, 2007.
- OKADA, I. A., SAKUMA, A. M., MAIO, F. D., DOVIDAUSKAS, S., ZENEBON, O. Avaliação dos níveis de chumbo e cádmio em leite em decorrência de contaminação ambiental na região do Vale do Paraíba, Sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v.31, n.2, p.140-143, 1997.
- OKOLI, I.C. Mycotoxin contamination of feedstuff and mycotoxicoses are neglected livestock production research topics in Nigeria. In: REDUCING IMPACT OFMYCOTOXINS IN TROPICAL AGRICULTURE, WITH EMPHASIS ON HEALTH AND TRADE IN AFRICA, 2005. Accra. **Proceedings...** Myco-globe conference, 2005, p.65-66.
- OLIVEIRA, C. A. F., SEBASTIÃO, L. S., FAGUNDES, H., ROSIM, R. E., FERNANDES, A. M. Determinação de aflatoxina B1 em rações e aflatoxina M1 no leite de propriedades do Estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.30, supl.1, p.221-225, 2010.
- RAMOS, C. E. C. O. **Análise das estratégias de gestão zootécnica em sistemas de produção de bovinos leiteiros**. Maringá. UEM, Programa de Pós Graduação em Zootecnia. 2008. 59p. (Dissertação mestrado).
- RODRIGUES, N. R. Agrotóxicos: Análises de Resíduos e Monitoramento. **Construindo a História dos Produtos Naturais**. n.7, p.1-7, 2006.

- RODRÍGUEZ-AMAYA, D., SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: The last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.33, p.1-11, 2002.
- ROEHSIG, L.; **Análise das estratégias de alimentação de vacas leiteiras a partir das práticas adotadas pelo produtor**. Maringá, UEM, Programa de Pós Graduação em Zootecnia 2006. 39p. (Dissertação mestrado)
- SCHWINNING, S., PARSONS, A. J. Analysis os coexistence mechanisms for grasses an legumes in grazing systems. **Journal of Ecology**. v.84, issue 6, p.799-813, 1996.
- SINDIRAÇÕES - Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal. **Boletim trimestral, maio de 2010**. São Paulo: Sindirações, 2010. 6p.
- SMITH, R. R., MOREIRA, V. M., LATRILLE, L. L. Caracterización de sistemas productivos lecheros en la X región de Chile mediante análisis multivariable. **Agricultura Técnica**. v.62, n.3, p.375-395, 2002.
- TURNER, N.W., SUBRAHMANYAM, S., PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**. v.632, p.168–180, 2009.
- VEIGA, J.E. Metamorfoses da política agrícola dos estados unidos. São Paulo: Fapesp Annablume, 1999.
- VERGER, D. La qualité das lês enquêtes auprès des ménages. In : Échantillonnage et méthodes d'enquêtes. Ed. : ARDILLY, P. Paris. Dunod, 375p, 2004.
- WAN NORHASIMA, W.M., ABDULAMIR, A.S., ABU BAKAR, F., SON, R., NORHAFNISA, A. The health and the toxic adverse effects of *Fusarium* fungal mycotoxin, fumonisins, on human popularion. **American Journal of Infectious Diseases**. v.5, n.4, p.283-291, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION- Programme of Food Safety and Food Aid. **Guidelines for predicting dietary intake of pesticide residues (revised)**. Switzerland: WHO Graphics, 1997. 41p.
- YIN, R. K., **Estudo de caso: planejamento e métodos**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 207p.

OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi determinar os fatores relacionados à contaminação do leite por micotoxinas e resíduos químicos de organofosforados e carbamatos nos SPL.

CAPITULO II

A Influência de Região e Períodos na Contaminação por Aflatoxina M₁ e Caracterização dos Carbamatos e Organofosforados no Leite, no Estado do Paraná

RESUMO – Objetivando caracterizar a contaminação por AFM₁ e por resíduos de químicos de organofosforados e carbamatos em três regiões (Maringá, Arapoti e Mal. Candido Rondon), e dois períodos de fornecimento de alimentos foi conduzido um estudo sobre 95 SPL no ano de 2009/2010. Foram colhidas e analisadas amostras de leite para avaliar a contaminação pelos resíduos químicos e de aflatoxina. A AFM₁ foi quantificada por meio de um kit-imunoensaio ELISA competitivo Ridascren[®] capaz de quantificar até 100ppt da toxina. A água e os alimentos, bem como o leite foram analisados quanto a presença ou ausência dos carbamatos e organofosforados por método qualitativo. Houve diferença entre as médias de concentração de AFM₁ entre os períodos de maior e menor fornecimento de alimentos conservados e concentrados ($p < 0,05$) da ordem de 0,1433 ppb, mas não foi observada diferença ($p > 0,05$) entre as regiões. A contaminação do leite por carbamatos não esteve correlacionada ($p < 0,01$) com a contaminação por organofosforados, evidenciando a distinção entre as fontes de contaminação: tratamento de parasitos do rebanho e agrotóxicos utilizados na agricultura. Esse último fato evidenciado pela presença de organofosforados nos alimentos afetando ($p < 0,001$) a contaminação dos suprimentos de água para os SPL estudados. Conclui-se que a contaminação por aflatoxinas tem estrita relação com o fornecimento de alimentos concentrados e conservados e que se torna necessária a quantificação da contaminação por agrotóxicos e a identificação das fontes de contaminação por micotoxinas a fim de criar condições para a intervenção sobre a contaminação do leite.

Palavras-chave: produção leiteira, segurança alimentar, micotoxinas, sistemas de alimentação de bovinos

ABSTRACT – Aiming to characterize the contamination by AFM₁ and chemical residues (organophosphate and carbamates) in 3 regions in Paraná state- Brazil over 2 feeding periods, it was conducted a study in 95 DPS on 2009/2010 years. There were collected and analysed samples of milk and water to evaluate contamination by chemicals residues and AFM₁. This contaminant was quantified using a competitive immuno-assay: Ridascren[®]. This test was able to quantify until 100ppt of AFM₁. Water and feeds, as well as milk, were analyzed about presence or absence of carbamates and organophosphates by a quantitative method. There was difference ($p < 0.05$) for AFM₁ contamination between the periods of higher and the lower supply of concentrate feeds. That was of about 0.1433 ppb, however there was no difference among regions ($p > 0.05$). There was no relation between milk contamination by carbamate and organophosphate, showing the distinction between the contamination sources: treatment of herd parasites and pesticides used in agriculture. This last one was evidenced by organophosphates presence in feeds affecting ($p < 0.05$) the contamination of water supply. It was concluded that the mycotoxins contamination have a strict relation with feed supply (specially concentrate and silage) and it became necessary the quantifying the contamination source by organophosphate and carbamates as well as to define the sources of mycotoxins contamination.

Keywords: dairy production, food safety, mycotoxins, herd feed systems

Introdução

Sabe-se que as características de uma propriedade leiteira, necessariamente, influenciam nos seus resultados (DEDIEU et al., 2008; HOSTIOU et al., 2006) e que o leite, quer em quantidade, quer em qualidade é função do SPL utilizado (BONDENMÜLLER et al. 2008). Portanto, suas características, positivas ou negativas, são construídas ao longo do processo de produção.

Os diferentes SPL, em função do produtor, o indivíduo (ou família) que toma as decisões (DAMASCENO et al. 2008), tratam diferentemente, em termos de estratégias produtivas, os postos de manejo⁹. Um dos postos de manejo que mais influencia na quantidade, na qualidade (JAHREIS et al., 1997; ALDRICH et al., 1997; FORBES, 1995) e na distribuição da produção do leite ao longo do ano é o de alimentação (ROEHSIG, 2005).

Para a contaminação se aplica o sentido inverso do de “construção da qualidade”. Tanto os fatores que originam as contaminações por resíduos químicos (OKADA et al., 1997; FLORES et al. 2004) quanto àquelas originadas por micotoxinas (PARAMITHIOTIS et al., 2009) têm forte componente nos processos de produção agropecuários como é o caso do: i) manejo de agrotóxicos nas culturas ou de ii) combate de parasitas no rebanho, de iii) estocagem de alimentos (principalmente em se tratando as micotoxinas), iv) processamento e transporte.

A variação intra-anual na oferta de alimentos seja em quantidade ou qualidade é uma realidade prática na atividade leiteira que leva os produtores a desenvolver estratégias para balancear a variação da oferta de alimentos (ROEHSIG, 2005; SANTOS & VILELA, 2000). Uma dessas estratégias muito difundidas entre os produtores é a da armazenagem, seja para grãos secos, seja por fenação ou ensilagem. Porém quanto à contaminação por micotoxinas a armazenagem causa alguns inconvenientes dada a natureza da proliferação dos fungos causadores (Gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*) em cereais armazenados. Não somente o armazenamento, mas também o cultivo e tratos culturais de cereais são determinantes tanto para a contaminação por micotoxinas (WAN NORHASIMA et al., 2009) quanto por agrotóxicos (FLORES et al. 2004).

⁹ Postos de manejo são as unidades que compõe o sistema de produção quanto a organização do manejo zootécnico: A Sanidade, A gestão do efetivo de animais, Sistema de alimentação, Gestão da superfície forrageira, Reprodução e a Comercialização são exemplos de postos de manejo.

Desta forma a contaminação do leite por Aflatoxina M₁, resíduos de carbamatos e organofosforados é a consequência natural da contaminação dos cereais utilizados na alimentação dos rebanhos leiteiros.

Considerando a sazonalidade na alimentação dos animais, bem como na produção de cereais e a influência que a região pode ocasionar sobre essas atividades, o objetivo deste trabalho é determinar os efeitos de região e de época sobre a contaminação do leite por Aflatoxina M₁, resíduos de agrotóxicos e endectocidas dos grupos Carbamato e Organofosforado.

Material e métodos

O presente estudo foi realizado no ano agrícola de 2009/2010, em três regiões do Estado do Paraná. 1) Região noroeste, delimitada entre: 23°00” e 23°30” sul; 51°30” e 52°30” oeste; clima tipo Cfa e solo predominantes Latossolo e Nitossolo contando com 38 SPL; 2) Região sudeste, delimitada entre as coordenadas: 24°00” e 24°30” sul; 49°30” e 50°00” oeste, clima tipo Cfb¹⁰ e solo predominantes Latossolo e Cambissolo¹¹ contando com 32 Sistemas de Produção Leiteiros – SPL e 3) Região sudoeste, delimitada entre: 24°30” e 25°00” sul; 53°30” e 54°06” oeste; clima tipo Cfa e solo predominantes Latossolo e Nitossolo contando com 25 SPL. Todas as regiões totalizaram 95 SPL. Mapa das regiões no Apêndice.

As colheitas de amostras dos alimentos concentrados, forragens e grãos conservados, subprodutos da agricultura, água e leite foram realizadas no período de maio a agosto de 2009 e subsequentemente de outubro de 2009 e abril de 2010. As entrevistas com os produtores foram realizadas de maio de 2009 e setembro de 2010, segundo a disponibilidade para a realização das visitas conforme questionário guia (vide Apêndice) visando identificar os processos de contaminação. Foram realizadas, no mínimo, duas visitas por SPL e no máximo quatro.

As amostras de alimentos foram refrigeradas logo após a colheita de campo e em seguida congeladas a -20°C em freezer até a realização das análises de contaminantes no laboratório de Toxicologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina, campus sede. As amostras de leite e água foram colhidas e acondicionadas da mesma forma que os

¹⁰ Classificação de Köppen; fonte: Simepar/ITGC-PR 2008.

¹¹ Fonte: EMBRAPA/EMATER-ITGC-PR 2009.

alimentos e posteriormente as amostras de leite (em duplicata) foram divididas em dois lotes. As amostras de água e o primeiro lote das amostras de leite foram enviados à UEL, assim como as amostras de alimentos, para a realização das análises de contaminantes. O segundo lote das amostras de leite foi submetido à extração do plasma para a leitura de Aflatoxina M₁ no Laboratório de Alimentos e Nutrição Animal da Universidade Estadual de Maringá.

A metodologia utilizada para a realização das análises de resíduos de carbamatos e organofosforados no leite, nos alimentos da dieta e na água foi a cromatografia de camada delgada – CCD com coloração em Rodamina e P-nitroanilina, uma técnica qualitativa descrita em AOAC (2003).

Para detecção de micotoxinas, utilizou-se a CCD, descrita por Soares e Rodriguez-Amaya (1989) adaptada por Gimeno (1983). Os padrões e concentrações (µg/mL) utilizados foram AfB1 (2,55), AfB2 (2,62), AfG1 (2,45), AfG2 (4,55) e Ocratoxina A (143,05) (Sigma Inc. - EUA), conforme metodologia da AOAC, (1995). Os limites de detecção do método foram 2 e 5 µg/Kg e os limites de determinação foram de 4 e 10 µg/Kg para aflatoxina e ocratoxina, respectivamente.

Na extração do plasma do leite, os potes plásticos de 20 ml, contendo as amostras, foram descongelados em banho-maria a 40°C por 30 minutos e imediatamente centrifugados em centrífuga refrigerada Fahn® a 10°C durante 10 minutos a uma rotação de 6700 RPM. Posteriormente foram retiradas alíquotas da fase intermediária, depois de removida a matéria graxa sobrenadante, e depositadas com pipeta em recipientes *ependorf* sendo acondicionadas em refrigerador e identificadas para análise subsequente.

As amostras de leite foram analisadas, em duplicata, com o *kit* imunoenzimático ridascreen®Fast Aflatoxin M₁, R-biopharm®. Este, composto por um suporte para os “poços”, recobertos com anticorpos anti-IgG, cinco soluções-padrão de AFM₁ (de 0, 250, 500, 1000 e 2000ppt), contendo anticorpo IgG policlonal anti-AFM₁, conjugado, cromógeno e solução bloqueadora de acordo com o protocolo descrito no manual.

A leitura foi realizada utilizando-se espectrofotômetro em comprimento de onda (λ) de 450nm e o resultado expresso pela média dos valores observados para cada duplicata. As absorbâncias foram calculadas para cada observação segundo:

$$A_{\lambda} = \left(\frac{A_i}{A_{0ppt}} \right) * 100$$

Em que::

A = absorvância para λ de 450 nm;

A_{0ppt} = absorvância para o padrão 0 (0 ppt de AFM₁);

A_i = absorvância observada para cada amostra (de i até n).

Os valores de absorvância obtidos (em %) para cada observação foram convertidos em concentração (ppt) pela curva padrão, parametrizada a cada ensaio, fornecida pelo software Softmax-pro[®], versão 5.4. O protocolo de análise desenvolvido foi para ensaios de imunofinidade competitiva, (ELISA) lidos no “*endpoint*” de cada reação com base no protocolo para melamina (Softmax-pro 5.4).

As análises exploratórias dos dados foram realizadas com a ajuda do software R versão 2.12.0 (2010). Preliminarmente os dados foram analisados segundo o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + R_i + P_j + RP_{ij} + e_{ijkl}$$

Em que::

Y = observação associada à Região i para o Período j ;

μ = constante geral, representando a média das observações;

R = região, com i variando de 1 até 3;

P = período, com j variando de entre 1 e 2¹²;

RP = interação entre região i e período j ;

e = erro aleatório associado às observações.

Como a variável resposta (AFM₁) não apresentasse distribuição normal pelo teste de Shapiro Wilk ($P > 0,05$), foi utilizado o procedimento de modelos lineares generalizados – GLM para distribuição gamma, do pacote *car* do software R2.12.0. As variáveis carbamato e organofosforado no leite e alimentos foram analisadas por métodos não paramétricos e baseados em tabelas de contingência.

¹² Não somente com sentido climático, mas como período de maior fornecimento de concentrados e de alimentos conservados.

Os testes de média para AFM₁ foram feitos por meio de comparações múltiplas utilizando o recurso “Tukey” ($p < 0,05$) com a ajuda, livreria *multcomp*. (R, 2.12.0)

Resultados e discussão

A sumarização dos dados da contaminação dos SPL com AFM₁ e apresentada a seguir. A contaminação total das amostras, acima do limite de detecção do teste ($\sim 0,2$ ppb) foi de 55,68% da amostras. Para as regiões os dados são apresentados na Figura 4.

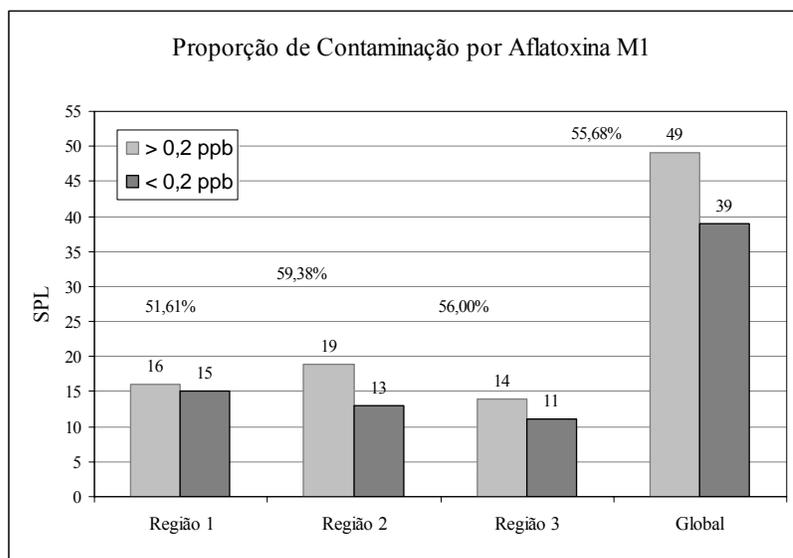


Figura 4 – Proporção de amostras contaminadas por AFM₁ versus não contaminadas segundo o limite de detecção 0,2 ppb

A percentagem de contaminação total por AFM₁ encontrada foi consideravelmente mais baixa que a encontrada por Skrinjar et al. (1995) estudando amostras de leite cru, na região da antiga Iugoslávia, cuja proporção de contaminação foi de 91%. Rodríguez-Amaya & Sabino (2002) reportaram proporções de 11% em São Paulo e 75% em Minas Gerais, para leite em pó reconstituído e queijos, respectivamente.

As amostras que excederam o limite estabelecido pela ANVISA (2006) e adotado como legislação no país (0,5 ppb), perfizeram 2,84% das amostras totais para este estudo. Levando-se em consideração os limites adotados por países como o Canadá e a União Europeia que é de 0,05 ppb (FAO, 2005) teríamos um total de 89% das amostras acima do nível de tolerância. Considerando que países mais tolerantes como os EUA (0,5 ppb) são grandes produtores de leite (USDA, 2010) o leite da região estudada ainda está aquém dos padrões internacionais de potenciais importadores como a União Europeia.

A apresentação dos resultados para os efeitos das variáveis independentes testadas sobre a Aflatoxina M₁ e suas estatísticas está na Tabela 3, que contém o sumário das estatísticas.

Tabela 3 – Estatísticas para a análise de variância e teste de médias utilizando MLG (Modelos Lineares Generalizados) para a quantificação de Aflatoxina M₁ em um arranjo fatorial.

n = 95	Médias para os Fatores				
	REG1	REG 2	REG 3	PER1	PER2
μ	0,1673 ^a	0,1869 ^a	0,2164 ^a	0,2594 ^a	0,1171 ^b
Max	0,5650	0,4420	1,2370	1,2370	0,3480
Min	0,0180	0,0230	0,0100	0,0910	0,0100
Dp	0,1101	0,1115	0,2124	0,1650	0,0767
Anova	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	**	**

** significativo a $p < 0,001$. Letras diferentes na linha diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,001$)

Os níveis de AFM₁ não apresentaram variação de contaminação ($p > 0,05$) entre as propriedades, por região, embora a diferença seja significativa entre períodos e nem entre as interações entre período e região.

Como esses períodos foram considerados como períodos com números de fases de alimentação distintas (ROEHSIG, 2005), ou seja, em um período de maior consumo de concentrados e alimentos conservados e no outro consumo menor desses insumos, os valores encontrados demonstram um efeito da contaminação sobre as práticas de planejamento alimentar nos SPL.

Fagan (2006) encontrou diferenças entre SPL (0,180 e 0,628ppb) embora sua abordagem não fosse amostral, mas de um estudo de casos, isso evidencia as variações individuais que não se transpuseram para as variações entre grupos de produtores (Tabela 3) no presente estudo. Esse fato pode ser reforçado se considerada a variação entre o máximo e o mínimo amostral (0,100 ppb) e no máximo (1,233 ppb) como o indicador da heterogeneidade das variações individuais.

A variação entre os períodos remete a dois raciocínios: os tratos culturais com os cereais (WAN NORHASIMA et al., 2009) e os cuidados de armazenamento e estocagem de grãos (IHESHIULOR et al. 2011). Ambos estão estritamente ligados aos processos de

planejamento anual da alimentação, ou seja, gestão da oferta e da demanda de alimentos no rebanho (DAMASCENO et al., 2008).

Oliveira et al. (2010) estudando SPL na região de São Carlos – SP encontrou níveis mais elevados de AFM₁ para SPL que combinavam o concentrado (base milho e soja) com outras oleaginosas (0,322 ppm) ou com silagem e polpa cítrica (0,121 ppb) do que com combinações somente com a silagem (0,010 ppb). No presente trabalho, principalmente as regiões 2 e 3 apresentam combinações de alimentos oleaginosos com maiores níveis de fornecimento de concentrados, sendo que a região 3 apresentou a maior variação entre os limites inferior e superior para AFM₁. Foram estes 0,100 e 1,2370 ppb, respectivamente.

A ocorrência de carbamatos e organofosforados no leite também é decorrência dos tratos culturais e do manejo com o rebanho (NERO et al, 2007). Na Figura 5, é apresentado um panorama da contaminação por carbamatos e organofosforados no presente trabalho.

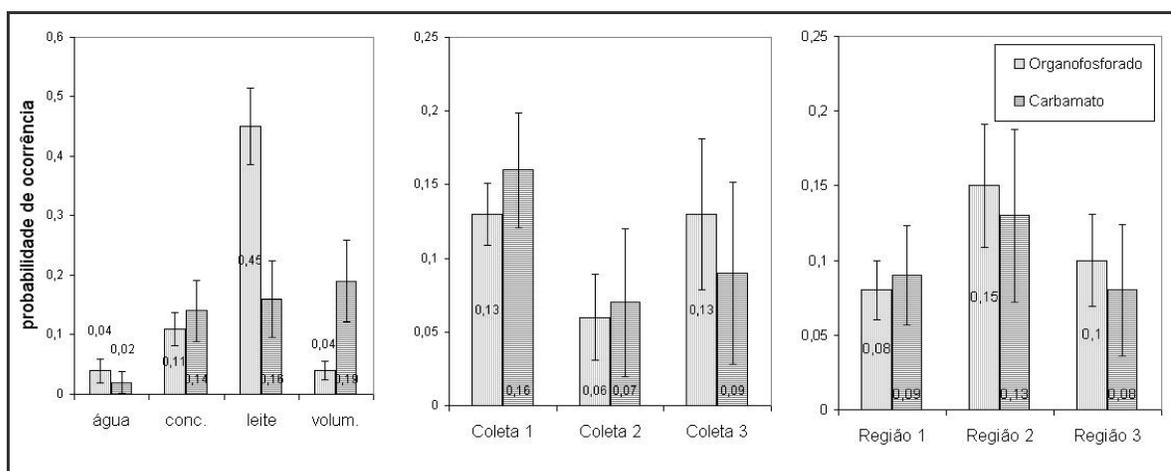


Figura 5 – Contaminação por resíduos químicos por fonte alimentar, colheita e região para os SPL de acordo com os MGL.

A probabilidade de contaminação por organofosforados nos alimentos foi maior para o leite ($p < 0,05$), não tendo sido observada diferença em relação aos demais alimentos e para os carbamatos. A colheita 1 (figura 5) apresentou um acréscimo em relação à colheita 2, somente para os organofosforados.

Segundo Nero et al. (2007), fazendo uma caracterização da contaminação em quatro regiões do Brasil (MG, SP, PR e RS), num total de 209 amostragens e também da influência destes contaminantes sobre microrganismos do leite contabilizaram um total de 75,12% de contaminação por organofosforados e em torno de 74% por carbamatos. Apenas

em torno de 6% das SPL estavam livres de contaminantes. Na presente amostragem, esse montante foi de 46,97% para organofosforados e 24,2% para carbamatos, entretanto os SPL descontaminados ocorreram numa proporção maior com relação àquele estudo, perfazendo 33,3% do total.

De qualquer modo, dois terços dos SPL contaminados é um dado preocupante em termos de saúde pública: Caldas et al. (2000) conduziram um estudo que apontou que muitas das fontes de alimentação humana e animal, têm níveis elevados de IDA (ingestão diária aceitável), e em vários casos próximos de 100% em um só alimento.

Os dados encontrados no presente trabalho, e na literatura, são reforçados pelas estimativas da ANVISA (2006) que aponta o Brasil entre os maiores consumidores de agrotóxicos e pesticidas no Mundo. Na tabela 4, são apresentadas as interações entre os alimentos, períodos de colheita e regiões.

Tabela 4 – Probabilidades de ocorrência de contaminantes a partir dos MLG *probit*, família binomial, para as interações alimentos: região e alimentos:período

Alimento	Organofosforados			Carbamatos		
	Reg 1	Reg 2	Reg 3	Reg 1	Reg 2	Reg 3
Água	0,07 ^a	< 0,01 ^a	0,03 ^a	< 0,01 ^a	< 0,01 ^a	< 0,01 ^a
Concentrado	< 0,01 ^a	< 0,01 ^a	< 0,01 ^a	0,19 ^a	0,21 ^a	0,21 ^a
Leite	0,35 ^b	< 0,01 ^a	0,42 ^b	< 0,01 ^a	< 0,01 ^a	< 0,01 ^a
Volumoso	0,03 ^a	0,13 ^a	0,06 ^a	0,07 ^a	0,34 ^a	0,15 ^a
	Per 1	Per 2	Per 3	Per 1	Per 2	Per 3
Água	< 0,01 ^a					
Concentrado	0,17 ^b	< 0,01 ^a	0,06 ^b	0,22 ^a	0,21 ^a	0,19 ^a
Leite	0,54 ^a	0,35 ^a	0,56 ^a	0,25 ^b	0,08 ^b	< 0,01 ^a
Volumoso	0,04 ^a	0,10 ^a	-	0,22 ^a	0,11 ^a	-

Reg, de 1 a 3 = regiões noroeste, sudeste e sudoeste do Paraná, respectivamente; Per, de 1 a 3 são os períodos de colheita das amostras. Letras diferentes na linha diferem pelo teste de χ^2 com a correção de Bonferroni ($p < 0,05$).

As regiões 1 e 3 se encontram mais propensas a apresentar contaminação no leite por causa dos resíduos de organofosforados, o que não se repete para os períodos sugerindo causas locais para esse tipo de contaminação. Já para os carbamatos o leite apresentou maior propensão a contaminação nos períodos 1 e 2, com destaque para o período 1 com 25% de probabilidade. Os concentrados se mostraram influenciados pelo período na contaminação pelo grupo dos organofosforados.

Períodos de interferindo na contaminação podem estar associados com índices de pluviosidade ou evaporação desses compostos para a atmosfera, conforme observado por Rodrigues et al. (2009), embora neste caso possa estar mais relacionado à época de tratamentos culturais mais intensos causados pelas maiores infestações de plantas daninhas e pragas de verão conforme descrito por Waquil et al. (2004) estudando épocas de ocorrências e pragas mais frequentes na cultura do milho.

O aumento da chance de contaminação do leite por organofosforados em regiões de intensa atividade agrícola, como é o caso das regiões 1 e 3 sugere que há ligação entre essa atividade e a contaminação das fontes alimentares do rebanho. Para determinar essas inter-relações entre as fontes e as prováveis origens da contaminação foram utilizados métodos não paramétricos cujas estatísticas estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Efeito das fontes de contaminação por resíduos de organofosforados e carbamatos sobre a presença ou ausência^a no leite.

Correlação não paramétrica de Kendall τ (tau)					Teste χ^2	p valor
	Estatísticas	ORG _{leite}	CARB _{leite}	ORG _{alimento}		
CARB _{leite}	τ	-0,320**	-	-	7,43**	0,0064
	<i>n</i>	66	-	-		
ORG _{alimento}	τ	0,234*	-0,03	-	2,09 ^{ns}	0,1486
	<i>n</i>	64	64	-		
CARB _{alimento}	τ	0,058	-0,149	0,086	ns	ns
	<i>n</i>	63	63	63		
ORG _{agua}	τ	0,011	0,106	0,240*	18,39***	0,0000
	<i>n</i>	66	66	64		

*, **, *** significativo a $p < 0,05$; $< 0,01$; $< 0,001$, para o tau de Kendall e o χ^2 (Chi-quadrado com ajuste de McNemar).^a Os carbamatos como fonte de contaminação da água estiveram ausentes em todas as amostras.

A presença de carbamatos no leite, nos SPL estudados não está associada à presença dos organofosforados ($P < 0,01$) o que indica que estes provêm de fontes diversas. Os carbamatos, segundo Nero et al. (2007) são base de endectocidas disponíveis no mercado. Deste modo, neste estudo, sua presença está provavelmente relacionado ao tratamento inadequado e mal orientado de parasitoses no rebanho. Vários fatores podem contribuir

para isto, entre outros o desrespeito dos prazos de carência e das dosagens recomendadas (CALDAS et al. 2000). A passagem do organofosforado ao leite pela alimentação se apresenta positivamente correlacionada ($\tau \leq 0,05$), embora o teste do χ^2 não sustente essa hipótese ($p > 0,05$). Esta não sensibilidade do teste pode retratar uma limitação no esforço amostral, já que retrospectivamente, a relação entre pesticidas agrícolas e resíduos de organofosforados no leite foi estabelecida (NERO et al. 2007; RODRIGUES et al. 2009). Um fato que reforça essa linha de argumentação é que a presença de organofosforados nos alimentos influenciou ($p < 0,05$) a presença deste contaminante na água. Rodrigues et al. (2009) relata a deterioração da biodiversidade pela contaminação da água em certos *habitats* naturais principalmente em virtude dos resíduos de glifosato (Roundup[®]).

Valeeva et al. (2005) classificaram na Holanda, os cuidados em procedimentos de produção com relação à contaminação química do leite. O processo de produção foi o fator mais importante (entre 18 fatores) perfazendo 6,84% de impacto para a segurança alimentar do leite, seguido da qualidade dos insumos alimentares (6,74%) o que foi determinado por meio de pesquisa com envolvidos em todos os setores da cadeia do leite. Esforços como estes demonstram que existem soluções possíveis para implantação de protocolos de segurança alimentar uma vez que numerosos esforços de pesquisa têm sido feitos no sentido de elucidar o problema da contaminação.

Tanto a contaminação por compostos químicos (carbamatos e organofosforados), quanto por bio-toxinas (especificamente a AFM₁, neste trabalho) causam, conforme discutido, problemas endêmicos de saúde pública e poderão causar perdas econômicas consideráveis, considerando as restrições internacionais para importação de produtos lácteos brasileiros, com relação a sua segurança alimentar e inocuidade (FAO, 2005).

As três regiões têm problemas com a contaminação do leite, portanto identificar, localizar e sistematizar ações no sentido de se atacar a contaminação é um passo importante para a produção de alimentos, notadamente o leite, no Estado do Paraná.

Conclusão

A contaminação do leite por Aflatoxina M₁ não variou entre as regiões ($p > 0,05$), mas variou de acordo com os períodos de fornecimento de alimentos conservados e concentrados em maiores quantidade. A amplitude da variação foi de 0,1 a 1,2 ppm o que

explica as regiões não diferirem ($p > 0,05$). A contaminação do leite por carbamatos teve relação negativa ($p < 0,01$) com os resíduos de organofosforados, sugerindo que esses contaminantes provêm de fontes diferentes, sendo o primeiro relacionado aos endectocidas e o segundo aos inseticidas e dessecantes largamente utilizados na agricultura, nas três regiões. Essa afirmação é fortalecida pela presença de organofosforados na água ($p < 0,001$), relacionado à sua presença nos alimentos.

Torna-se necessário quantificar os resíduos químicos para prever o real impacto na saúde humana e dos rebanhos dos SPL.

Literatura citada

- ABDI, H. VALENTIN, D. Multiple correspondence analysis. In: **Encyclopedia of measurement and statistics..** Ed.: SALKIND, N. Thousand Oaks. Sage, p.651-657, 2007.
- FORBES, J.M. Voluntary food intake and diet selection by farm animals. Madison: CAB Internacional, 1995. 532p
- ALDRICH, J.B., MULLER, L.D., VARGAS, G.A. Nonstructural carbohydrate and protein effects on rumen fermentation, nutrient flow, and performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.76, p.1091-1099, 1997.
- JAHREIS, G., FRITSCH, J., STEINHART, H. Conjugated linoleic acid in milk fat: High variation depending on production system. *Nutrition Research*. v.17, n.9, p.1479-1484, 1997.
- PARAMITHIOTIS, S., PAPPA, A. M., DROSINOS, E.H., ZOIPOULOS, P. E. Microbiological, physico-chemical and safety parameters of cereal based animal diets. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*.v.1, Issue 3, p.141–203, 2009.
- ALMEIDA, F. V., CENTENO, A. J., BISINOTI, M. C., JARDIM, W. F. Substâncias tóxicas persistentes (STP) no Brasil. **Química Nova**. v.30, n.8, p.1976-1985, 2007.
- ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Revista de Saúde Pública**. v.40, n.2, p.361-363, 2006.
- BALDWIN, R. L. **Modelling ruminant digestion and metabolism**. 1st ed. London: Chapman & Hall. 1995. 592p.
- BODENMÜLLER FILHO, A. **Tipologia de sistemas de produção baseada nas características do leite**. Maringá, UEM, Programa de Pós Graduação em Zootecnia 2006. 37p. (Dissertação mestrado)
- BODENMÜLLER FILHO, A., DAMASCENO, J. C., PREVIDELLI, I. T. S., SANTANA, R. G., RAMOS, C. E. C. O., SANTOS, G. T. Tipologia de sistemas de produção baseada nas características do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.39, n.8, p.1832-1839, 2010.
- CALDAS, E.D., SILVA, S.C., OLIVEIRA, J.N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**. v.36, n.3, p319-323, 2002.
- COSTA, J. C. G. D., INFANTOSI, A. F. C., ALMEIDA, R. M. V. R., RAMIARINA, R. A. Análise de correspondência múltipla na avaliação de deslocamento inter-municipal para parto. In: 21º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA, 2008, Salvador. **Anais...** Salvador: CEFET-BA, 2008, p.327-330.
- DAMASCENO, J.C., BOUNDERMÜLLER FILHO, A., RAMOS, C. E. C. O., Dos SANTOS, J. C., SANTOS, G. T. O Papel do homem na gestão e controle de qualidade da produção de leite. In: **Inovação tecnológica na cadeia produtiva do leite e a sustentabilidade da pecuária leiteira**. Ed.: SANTOS, G. T., UHLIG, L., BRANCO, A. F., JOBIM, C. C., DAMASCENO, J. C., CECATO, U. Maringá. Eduem,310 p, 2008.

- De LEEUW, J. Statistical properties of multiple correspondence analysis. In: NEW MULTIVARIATE METHODS IN STATISTICS: THE 1984 JOINT SUMMER RESEARCH CONFERENCE SERIES IN THE MATHEMATICAL SCIENCES, 1984, Brunswick. **Proceedings...** Brunswick: Bowdoin College, 1984. 19p.
- DEDIEU, B. Qualificação das capacidades adaptativas de sistemas pecuários. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.38, suplemento especial, p.397-404, 2009.
- DEDIEU, B., FAVERDIN, P., DOURMAD, J.Y., GIBON, A. Système d'élevage, un concept pour raisonner les transformations de l'élevage. **INRA Productions Animales**. v.21, n.1, p. 45-58, 2008.
- DEVEGOWDA, G., RADU, M.L.V., NAZAR, A., SWAMY, H.V.L.M. Mycotoxin picture worldwide : Novel solution for their counteraction. In: ALLTECH'S 14th ANNUAL SYMPOSIUM ON BIOTECHONOLOGY IN FEED INDUSTRY: PASSPORT TO THE YEAR 2000, 1998. Nottingham. **Proceedings...** Nottingham University Press, 1998, p.248-255.
- EUROPEAN COMMISSION-DG ENV. **Soil biodiversity: functions, threats and tools for policy makers**. Paris: Bio Intelligence Service, 2010. 255p.
- EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY-EEA Report. **Integration of environment into EU agriculture policy - the IRENA indicator-based assessment report**. n.2. Copenhagen: Office for Official Publications of the European Communities, 2006. 60p.
- EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY-EEA Report. **Source apportionment of nitrogen and phosphorus inputs into the aquatic environment**. n.7. Copenhagen: Office for Official Publications of the European Communities, 2005. 48p.
- FAGAN, E. P. **Fatores ambientais e de manejo sobre a composição química, microbiológica e toxicológica do leite produzido em duas granjas produtoras de leite tipo "A" no estado do Paraná**. Maringá, UEM, Programa de Pós Graduação em Zootecnia 2006. 117p. (Tese Doutorado).
- FAO. **Animal feeding and food safety**. FAO Food and Nutrition Papper. Rome: n.69, 1998.
- FAO/WHO - Expert Committee on Food Additives. **Residue evaluation of certain veterinary drugs**.70^o meeting. Roma: Eletronic Publishing Policy and Branch Communication Division-FAO, 2008. 296p.
- FODDY, W. H. **Constructing questions for interviews and questionnaires: Theory and practice in social research**. Cambridge: Cambrige University Press, 2003. 228p.
- HOSTIOU, N., VEIGA, J. B., TOURRAND, J. F. Dinâmica e evolução de sistemas familiares de produção leiteira em Uruará, frente de colonização da Amazônia brasileira. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v44, n.2, p. 295 – 311, 2006.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Censo Agropecuário 2006**. Rio de Janeiro: IBGE, 2009. 777p.
- IHESHIULOR, O.O.M., ESONU, B.O., CHUWUCA, O.K., OMEDE, I.C., OKOLI, I.C., OGBUEWU, I.P. Effects of mycotoxins in animal nutrition: a review. **Asian Journal of Animal Sciences**. v.5, n.1, p.19-33, 2011.

- IPARDES - Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social-Convênio IPARDES/EMATER/SETI. **Caracterização socioeconômica da atividade leiteira no Paraná**. Curitiba: IPARDES, 2009. 187p.
- NERO, L. A., MATTOS, M. R., BELOTI, V., BARROS, M. A. F., PONTES NETTO, D., FRANCO, B. D. G. M. Organofosforados e carbamatos no leite produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e ação sobre *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.27, n.1, p.201-204, 2007.
- OKOLI, I.C. Mycotoxin contamination of feedstuff and mycotoxicoses are neglected livestock production research topics in Nigeria. In: REDUCING IMPACT OF MYCOTOXINS IN TROPICAL AGRICULTURE, WITH EMPHASIS ON HEALTH AND TRADE IN AFRICA, 2005. Accra. **Proceedings...** Myco-globe conference, 2005, p.65-66.
- OLIVEIRA, C. A. F., SEBASTIÃO, L. S., FAGUNDES, H., ROSIM, R. E., FERNANDES, A. M. Determinação de aflatoxina B1 em rações e aflatoxina M1 no leite de propriedades do Estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.30, supl.1, p.221-225, 2010.
- RAMOS, C. E. C. O. **Análise das estratégias de gestão zootécnica em sistemas de produção de bovinos leiteiros**. Maringá. UEM, Programa de Pós Graduação em Zootecnia. 2008. 59p. (Dissertação mestrado).
- RODRIGUES, N. R. Agrotóxicos: Análises de Resíduos e Monitoramento. **Construindo a História dos Produtos Naturais**. n.7, p.1-7, 2006.
- RODRÍGUEZ-AMAYA, D., SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: The last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.33, p.1-11, 2002.
- ROEHSIG, L.; **Análise das estratégias de alimentação de vacas leiteiras a partir das práticas adotadas pelo produtor**. Maringá, UEM, Programa de Pós Graduação em Zootecnia 2006. 39p. (Dissertação mestrado)
- SMITH, R. R., MOREIRA, V. M., LATRILLE, L. L. Caracterización de sistemas productivos lecheros en la X región de Chile mediante análisis multivariable. **Agricultura Técnica**. v.62, n.3, p.375-395, 2002.
- TURNER, N.W., SUBRAHMANYAM, S., PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**. v.632, p.168-180, 2009.
- WAN NORHASHIMA, W.M., ABDULAMIR, A.S., ABU BAKAR, F., SON, R., NORHAFNISA, A. The health and the toxic adverse effects of *Fusarium* fungal mycotoxin, fumonisins, on human population. **American Journal of Infectious Diseases**. v.5, n.4, p.283-291, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION- Programme of Food Safety and Food Aid. **Guidelines for predicting dietary intake of pesticide residues (revised)**. Switzerland: WHO Graphics, 1997. 41p.

CAPITULO III

Analisando as Fontes de Contaminação de Micotoxinas: O que contribui para os Níveis de Aflatoxina M₁?

RESUMO – Objetivando caracterizar a contaminação por AFM₁ quanto às fontes de contaminação alimentar e os metabólitos que a originaram foi conduzido um estudo sobre 95 SPL no ano de 2009/2010. Foram colhidas e analisadas amostras de leite para avaliar a contaminação por aflatoxina. A AFM₁ foi quantificada por meio de um kit-imunoensaio ELISA competitivo Ridascren[®] capaz de quantificar até 200ppt da toxina. Os alimentos foram analisados por meio de CCD quanto à presença ou ausência de micotoxinas e os dados analisados via análise de trilha. Houve uma um efeito direto de 0,51 da AFB₁ sobre a contaminação por AFM₁. A AFG₁ Apresentou forte correlação (P < 0,01) com a AFB₁, demonstrando possivelmente oriundas da mesma cepa fúngica. As aflatoxinas exerceram contaminação majoritária (70% em relação às demais micotoxinas) em todas as amostras colhidas. Os níveis de contaminantes no milho, na soja e nos concentrados não foram mais importantes do que a presença dos metabólitos de Aflatoxina, provavelmente por causa de sua ampla distribuição por todos os alimentos componentes da dieta animal nos SPL.

Palavras-chave: produção leiteira, fontes de contaminação, metabólitos de toxinas, alimentos concentrados

ABSTRACT - In order to characterize the AFM₁ contamination on food sources contamination and metabolites it was done a study over 95 SPL, in the years 2009/2010. There were collected and analyzed milk samples to assess contamination by aflatoxin. The AFM₁ was measured using a competitive ELISA immunoassay kit-Ridascreen ® 200ppt even able to quantify the toxin. The foods were analyzed by TLC for the presence or absence of mycotoxins and the data analyzed through path analysis. There was a direct effect of 0.51 on the AFB₁ contamination by aflatoxin M₁. The AFG₁ presented strong correlation ($P < 0.01$) with AFB₁ and demonstrated possibly be drawn from the same fungal strain. Aflatoxins contamination exerted majority (70% compared to other mycotoxins) in all samples. Contaminant levels in corn, soybeans and concentrates were not more important than the presence of aflatoxin metabolites, probably due to its wide distribution in all food components of animal diet in the SPL.

Keywords: dairy production, contamination sources , metabolites of toxins, concentrate feed

Introdução

Quando se estuda um fenômeno crônico e endêmico como é o caso da contaminação de alimentos por micotoxinas (FAO, 2003) não basta testar os efeitos e definir algumas condições em que isto ocorre (WAN NORHASIMA et al., 2009; IHESHIULOR et al. 2011) é necessário, como próximo passo, quantificar as influências dos fatores envolvidos.

A literatura aponta diversas fontes de contaminação por micotoxinas (FREIRE et al. 2007), embora a natureza dessas fontes seja, notadamente, alimentar. Os problemas de saúde derivados de sua toxidez são na maior parte dos casos abordados como: “alarmantes problemas de saúde pública” (BENNETT & KLICH, 2003) com vários episódios dramáticos de intoxicação aguda e morte (FREIRE et al. 2007), seja de animais (MOREAU, 1979) seja de humanos (RODRICKS et al., 1977; PITT & HOCKING, 1986).

Não obstante, contaminações crônicas subagudas estão relacionadas a muitos efeitos deletérios para o organismo, quer animal ou humano (WAN NORHASHIMA et al., 2009; CALDAS et al., 2002) como a carcinogenia e a hepatotoxicidade. Esses efeitos afetam diretamente a produção animal pela contaminação dos produtos finais ou pelo dano metabólico, causado pelo envenenamento crônico nos animais, o que adiciona ineficiência ao processo de produção (JELINEK et al., 1989; LEUNG et al., 2006).

A qualidade das matérias-primas para alimentação animal é um ponto de importante discussão nesse sentido, já que em última instância o consumo dos produtos animais carrega essas toxinas para os humanos (MACHISNKI JUNIOR, 2008). A legislação de tolerância de contaminação em produtos para alimentação animal no Brasil é condescendente, 50 µg/Kg para alimentos destinados ao consumo animal¹³ (ingestão direta ou matéria-prima de rações), desta forma a regulação por meio de políticas públicas sobre o problema fica comprometida, já que a única regulação é exercida pelo custo/preço de mercado.

A passagem das micotoxinas para os produtos de origem animal, neste caso principalmente as aflatoxinas, está condicionada a fenômenos de biotransformação, sendo a denominação genérica das vias metabólicas de detoxificação desses metabólitos. Segundo

¹³ MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Portaria MA/SNAD/SFA, n ° 07, 09/11/88, Diário Oficial da União – Seção I, pg: 21.968, 1988.

Machinski Junior (2008) em torno de 58% dessas toxinas são eliminadas pela secreção biliar, por volta de 35% pela urina e uma fração considerável pelo leite na forma de AFM₁.

Portanto, analisando e mapeando as fontes mais importantes de contaminação alimentar, pode-se determinar pontos de controle eficientes para o problema da gestão da contaminação sobre matérias-primas na alimentação animal e posterior contaminação dos produtos de origem animal. Uma das propostas analíticas que se adequam a esta abordagem do problema da contaminação por micotoxinas é a análise de trilhas (*path analysis*) (REGO et al. 2006).

Deste modo, esse estudo objetiva determinar os efeitos diretos e indiretos e as relações entre as variáveis “fonte de contaminação” e as concentrações de AFM₁.

Material e métodos

O presente estudo foi realizado no ano agrícola de 2009/2010 em três regiões do Estado do Paraná. 1) Região noroeste, delimitada entre: 23°00” e 23°30” sul; 51°30” e 52°30” oeste; clima tipo Cfa e solo predominantes Latossolo e Nitossolo contando com 38 SPL; 2) Região sudeste, delimitada entre as coordenadas: 24°00” e 24°30” sul; 49°30” e 50°00” oeste, clima tipo Cfb¹⁴ e solo predominantes Latossolo e Cambissolo¹⁵ contando com 32 Sistemas de Produção Leiteiros – SPL e 3) Região sudoeste, delimitada entre: 24°30” e 25°00” sul; 53°30” e 54°06” oeste; clima tipo Cfa e solo predominantes Latossolo e Nitossolo contando com 25 SPL. Todas as regiões totalizaram 95 SPL. Mapa das regiões no Apêndice.

As colheitas de amostras dos alimentos concentrados, forragens e grãos conservados, subprodutos da agricultura, água e leite foram realizadas no período de maio a agosto de 2009 e subsequentemente de outubro de 2009 e abril de 2010.

As amostras de alimentos foram refrigeradas logo após a colheita de campo e em seguida congeladas a -20°C em freezer até a realização das análises de contaminantes no laboratório de Toxicologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina, campus sede. As amostras de leite e água foram colhidas e acondicionadas da mesma forma que os alimentos e posteriormente as amostras de leite (em duplicata) foram divididas em dois lotes. As amostras de água e o primeiro lote das amostras de leite foram enviados à UEL,

¹⁴ Classificação de Köppen; fonte: Simepar/ITGC-PR 2008.

¹⁵ Fonte: EMBRAPA/EMATER-ITGC-PR 2009.

assim como as amostras de alimentos, para a realização das análises de contaminantes. O segundo lote das amostras de leite foi submetido à extração do plasma para a leitura de Aflatoxina M₁ no Laboratório de Alimentos e Nutrição Animal da Universidade Estadual de Maringá.

Para detecção de micotoxinas, utilizou-se a CCD, descrita por Soares e Rodriguez-Amaya (1989) adaptada por Gimeno (1983). Os padrões e concentrações (µg/mL) utilizados foram AfB1 (2,55), AfB2 (2,62), AfG1 (2,45), AfG2 (4,55) e Ocratoxina A (143,05) (Sigma Inc. - EUA), conforme metodologia da AOAC, (1995). Os limites de detecção do método foram 2 e 5 µg/Kg e os limites de determinação foram de 4 e 10 µg/Kg para aflatoxina e ocratoxina, respectivamente.

Na extração do plasma do leite, os potes plásticos de 20 ml, contendo as amostras, foram descongelados em banho-maria a 40°C por 30 minutos e imediatamente centrifugados em centrífuga refrigerada Fahren[®] a 10°C durante 10 minutos a uma rotação de 6700 RPM. Posteriormente foram retiradas alíquotas da fase intermediária, depois de removida a matéria graxa sobrenadante, e depositadas com pipeta em recipientes *ependorf* sendo acondicionadas em refrigerador e identificadas para análise subsequente.

As amostras de leite foram analisadas, em duplicata, com o *kit* imunoenzimático ridascreen[®]Fast Aflatoxin M₁, R-biopharm[®]. Este, composto por um suporte para os “poços”, recobertos com anticorpos anti-IgG, cinco soluções-padrão de AFM₁ (de 0, 250, 500, 1000 e 2000ppt), contendo anticorpo IgG policlonal anti-AFM₁, conjugado, cromógeno e solução bloqueadora de acordo com o protocolo descrito no manual.

A leitura foi realizada utilizando espectrofotômetro em comprimento de onda (λ) de 450nm e o resultado expresso pela média dos valores observados para cada duplicata. As absorbâncias foram calculadas para cada observação segundo:

$$A_{\lambda} = \left(\frac{A_i}{A_{0ppt}} \right) * 100$$

Onde:

A = absorbância para λ de 450 nm;

A_{0ppt} = absorbância para o padrão 0 (0 ppt de AFM₁);

A_i = absorbância observada para cada amostra (de i até n).

Os valores de absorbância obtidos (em %) para cada observação foram convertidos em concentração (ppt) pela curva padrão, parametrizada a cada ensaio, fornecida pelo

software Softmax-pro[®], versão 5.4. O protocolo de análise desenvolvido foi para ensaios de imunofluorescência competitiva, (ELISA) lidos no “*endpoint*” de cada reação com base no protocolo para melamina (Softmax-pro 5.4).

Foram realizadas análises de regressão múltiplas pelo método da análise de trilhas “*path analysis*” segundo o método utilizado por Rego et al. (2006), mas com a ajuda do software R versão 2.12.0 (2010) utilizando a livreria *agricolae*. Os dados referentes às concentrações das Aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), Ocratoxina e Zearalenona nos alimentos, todas elas relacionadas aos níveis de AFB₂ e AFM₁ foram analisados segundo o modelo estatístico:

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_{i_1}.X_{i_1} + \dots + \beta_{i_n}.X_{i_n} + \varepsilon_{ij}$$

Em que :

\hat{Y} = observação da variável dependente (Aflatoxina_{M1});

β_0 = coeficiente do parâmetro inicial da regressão, intercepto;

β_i = coeficiente da regressão para a variável independente i , com n variando de 1 a 9 para: Aflatoxina b1, b2, g1, g2, Aflatoxina no milho, no concentrado, na soja, Zearalenona e Ocratoxina; respectivamente;

X_i = valor das observações para as variáveis independentes i (n variando de 1 a 9);

ε = vetor de erros associados a i -ésima variável na j -ésima observação.

Resultados e discussão

A caracterização das fontes de contaminação a distribuição dos contaminantes nos alimentos amostrados e regiões estão representadas na Figura 6.

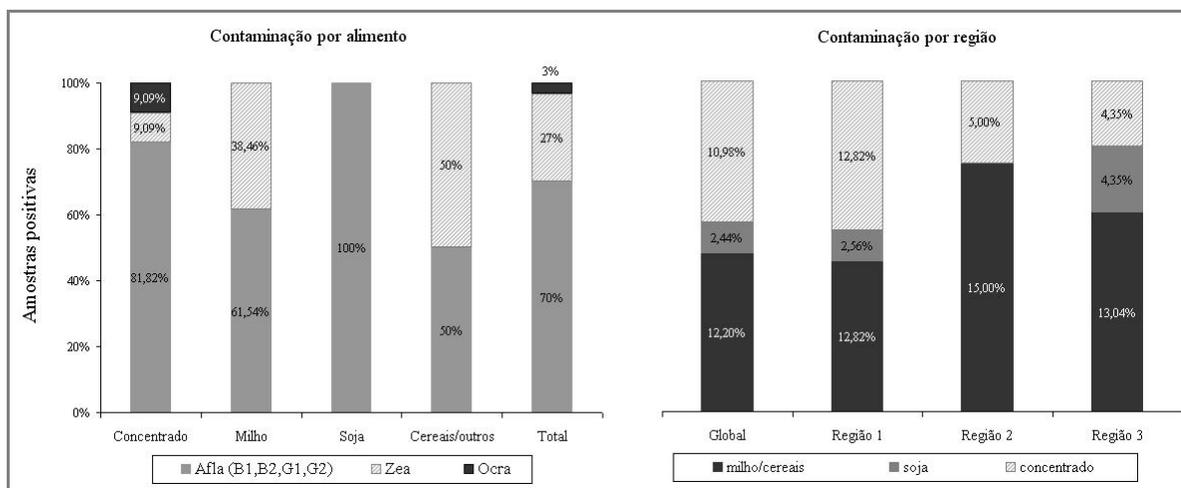


Figura 6 – Contaminação de micotoxinas por fonte alimentar da dieta dos rebanhos para os SPL analisados

As aflatoxinas são os contaminantes mais amplamente distribuídos na amostragem para as 3 regiões (70,0%), o que comprova sua importância quantitativa já descrita em outros trabalhos (RODRÍGUEZ-AMAYA & SABINO, 2002; CALDAS et al., 2002).

A distribuição das micotoxinas está preferencialmente relacionada aos cereais nesta amostragem. Notadamente o milho e os demais cereais¹⁶, que apresentam 12,2% das amostras contaminadas, têm papel de destaque nessa contaminação. Kawashima & Valente Soares (2009) encontraram cerca de 96,0% de contaminação estudando milho e seus derivados, salientando que o limite de detecção para estes autores foi de 1 ppb enquanto o do presente trabalho é de 2ppb. Comparando com Sassahara et al. (2003) analisando 40 propriedades no norte do Paraná a prevalência de contaminação encontrada neste trabalho (12,2%) foi menor que a encontrada por aqueles autores (20%), utilizando o mesmo método analítico do presente trabalho.

A segunda maior fonte de contaminação são os concentrados comerciais, provavelmente por causa (novamente) do milho que é um de seus componentes

¹⁶ A presença de outros cereais como aveia, trigo e centeio foi inferior a 1% da amostra, por isso foram incorporados ao milho.

majoritários. Márcia & Lazzari (2008) demonstraram a prevalência de contaminação sobre o milho, fato este condicionado por sua estocagem e condições físicas dos grãos. Grãos íntegros no processo de colheita sofrem menos com a contaminação por fungos, principalmente os do gênero *Aspergillus*, reponsáveis pelas aflatoxinas (MARQUES et al. 2009).

A amostragem ainda demonstra que as percentagens encontradas para as regiões de Maringá, Arapotí e Mal. Cândido Rondon de 12,82% 15,00% e 13,84%, respectivamente são quantitativamente preocupantes, já que o Estado do Paraná responde por aproximadamente 22,0% da produção nacional de milho (IBGE, 2006) e a contaminação média de 12,2% representaria mais de mil toneladas, sendo a produção total do estado superior a nove mil toneladas.

Para estabelecer a passagem destas micotoxinas para o leite e determinar a contribuição de cada um dos foi conduzida uma análise de trilha (*path analysis*) cujos resultados estão sumarizados pelas Tabelas 6 e 7. Na tabela 6, estão os efeitos das fontes de contaminação sobre os níveis de AFM₁.

Tabela 6 – Estimativas dos efeitos diretos (diagonal em negrito) e indiretos, da soma dos efeitos indiretos (IND), da correlação (COR) e da razão entre os efeitos diretos e indiretos (DIR/IND) das fontes de contaminação por micotoxinas sobre a incidência de aflatoxina M1 para o total da amostragem.

Variável	Efeitos diretos e indiretos									IND	COR	DIR/IND
	AFb1	AFb2	AFg1	AFg2	AFmi	AFcon	AFsj	ZEA	OCRA			
AFb1	0,5107	0,0128	0,2075	-0,052	0,0056	-0,0063	0,0000	-0,0207	-0,0075	0,1393	0,6485**	3,6673
AFb2	-0,0306	-0,2131	0,0236	0,0183	0,0011	0,0009	0,0116	-0,0311	-0,0206	-0,0269	-0,2413	7,912
AFg1	-0,0107	0,2247	0,4716	-0,0731	-0,0106	-0,0126	-0,0549	-0,0601	-0,0244	-0,0216	0,4526*	-21,8258
AFg2	0,0277	0,1890	0,2452	-0,1407	-0,0172	-0,0036	0,0433	-0,0331	0,0094	0,4607	0,3156	-0,3053
AFmi	0,0043	-0,0511	0,0896	-0,0436	-0,0555	-0,0460	-0,0116	0,0083	-0,0244	-0,0745	-0,1321	0,7457
AFcon	0,0021	0,0358	0,0660	-0,0056	-0,0283	-0,0902	0,0433	-0,0062	-0,0169	0,0902	-0,0007	-1,0000
AFsj	0,0085	0,0000	0,0896	0,0211	-0,0022	0,0135	-0,2889	-0,0373	0,0056	0,0989	-0,1910	2,0953
ZEA	0,0320	-0,0511	-0,1368	0,0225	-0,0022	0,0027	0,0520	0,2072	-0,0263	-0,1072	0,0953	-1,9331
OCRA	0,0234	-0,0204	-0,0613	-0,0070	0,0072	0,0081	-0,0087	-0,0290	0,1877	-0,0877	0,1009	-2,1407

* significativo a $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ para a correlação de Pearson

AFB₁ (Aflatoxina B1), AFB₂ (Aflatoxina B2), AFG₁ (Aflatoxina G1), AFG₂ (Aflatoxina G2), AFB_{MI} (Aflatoxina no milho e derivados), AFB_{CON} (Aflatoxina nos concentrados fornecidos), AFB_{SJ} (Aflatoxina na soja e derivados), ZEA (Zearalenona no milho e derivados), OCRA (Ocratoxina nos concentrados). A zearalenona foi encontrada somente no milho e a ocratoxina somente nos cconcentrados.

A análise de trilha é utilizada para identificar as “trilhas causais” ou relações entre as variáveis afetando uma variável dependente de interesse (WOODS et al.2003). Os maiores efeitos diretos se manifestaram pelas variáveis AFB_1 (0,51) e AFG_1 (0,47), demonstrando que essas variáveis contribuem positivamente para o aumento da concentração de AFM_1 . MARTINS & MARTINS (1986) confirma a relação contribuição da AFB_1 para a AFM_1 , como seu metabólito mais tóxico presente no organismo animal. A taxa de transferência de AFB_1 da ração para o leite de vacas está situada entre 1 e 3%, com uma transferência média de 1,7% (OLIVEIRA et al. 2010), embora estes valores possam variar de acordo com vários fatores como o nível de AFB_1 ingerido, produção de leite e sensibilidade individual a aflatoxinas (JOUANY & DIAZ, 2005).

A relação entre efeitos diretos e indiretos, evidenciou a diferença entre a magnitude (~ 4 vezes e ~ 22 vezes, respectivamente) desses efeitos e para ambas (AFB_1 e AFG_1) variáveis, demonstrando que o efeito se manifesta principalmente pela via direta.

Efeitos diretos pequenos ou negativos para as demais variáveis demonstram que sua contribuição para os níveis da AFM_1 foi nula ou negativa. Por contribuição negativa não se entenda descontaminação, mas a possível contaminação por outros metabólitos não específicos para o imunoensaio utilizado neste estudo. Isso se deve principalmente a outros metabólitos que passariam ao leite como por exemplo o α -Zearalenol (PRELUSKY et al. 1990). Para este estudo esse pode ser o caso da AFG_2 , cujo efeito direto foi de - 0,14, mas sua correlação com a AFM_1 não foi significativa.

As aflatoxinas nas fontes alimentares (milho, concentrado e soja) tiveram, nesta análise menores relevâncias na análise, provavelmente pelo fato de que a AFM_1 têm maior relação com o metabólito AFB_1 (Oliveira et al. 2010; Martins & Martins, 1986) do que propriamente com a fonte alimentar deste, já que as aflatoxinas são amplamente distribuídos em grãos, cereais e oleaginosas (Rodríguez-Amaya & Sabino, 2002). A constatação desses autores foi reafirmada neste estudo, sendo as aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) os contaminantes majoritários (70,0%) em todas as fontes alimentares nos SPL analisados.

Na Tabela 7, são mostradas as relações entre os demais metabólitos e a AFB_1 .

Tabela 7– Estimativas dos efeitos diretos (diagonal em negrito) e indiretos, da soma dos efeitos indiretos (IND), da correlação (COR) e da razão entre os efeitos diretos e indiretos (DIR/IND) das fontes de contaminação por micotoxinas sobre a incidência de aflatoxina B1 para o total da amostragem.

Variável	Efeitos diretos e indiretos								IND	COR	DIR/IND
	AFB2	AFG1	AFG2	AFmi	AFcon	AFsj	ZEA	OCRA			
AFB2	-0,0523	0,0484	-0,0031	-0,0265	0,0127	0,0002	-0,0013	0,0019	0,0323	-0,2413	-1,6201
AFG1	-0,0073	0,3457	0,1853	-0,1175	0,0506	0,0031	-0,0026	0,0027	0,1143	0,6485**	3,0239
AFG2	0,0005	0,2074	0,3089	-0,1630	0,0362	-0,0002	0,0005	-0,0003	0,0811	0,4526*	3,8072
AFmi	-0,0037	0,1072	0,1328	-0,3791	0,1049	0,0014	0,0042	0,0022	0,3491	0,3156	-1,0859
AFcon	-0,0037	0,0968	0,0618	-0,2199	0,1809	-0,0005	0,0026	0,0019	-0,0609	-0,1321	-2,9711
AFsj	-0,0010	0,0899	-0,0062	-0,0455	-0,0072	0,0119	-0,0019	0,0000	0,0281	-0,0007	0,4245
ZEA	0,0026	-0,0346	0,0062	-0,0607	0,0181	-0,0008	0,0265	0,0027	-0,0665	-0,1910	-0,3981
OCRA	0,0037	-0,0346	0,0031	0,0303	-0,0127	0,0000	-0,0026	-0,0272	-0,0128	0,0953	2,1241

* significativo a $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ para a correlação de Pearson

AFB₁ (Aflatoxina B1), AFG₁ (Aflatoxina G1), AFG₂ (Aflatoxina G2), AFB_{MI} (Aflatoxina no milho e derivados), AFB_{CON} (Aflatoxina nos concentrados fornecidos), AFB_{SJ} (Aflatoxina na soja e derivados), ZEA (Zearalenona no milho e derivados), OCRA(Ocratoxina nos concentrados). A zearalenona foi encontrada somente no milho e a ocratoxina somente nos cconcentrados

A AFB₁ é a aflatoxina com maior toxidez (MOSS, 1998), por outro lado ela dá origem a AFM₁ que é o metabólito animal de maior relevância e potencial patogênico (Caldas et al., 2002). Neste trabalho a AFB₂ teve o maior efeito direto (0,51) na análise de trilha sobre os níveis de AFM₁, desta forma as relações dos demais metabólitos e a AFB₁ podem ser instrutivos para o entendimento da contaminação no leite por meio dos alimentos.

As aflatoxinas AFG₁ E AFG₂ (Tabela 7) apresentaram os maiores efeitos diretos (0,35 e 0,31) sobre a AFB₁, com correlações positivas ($p < 0,05$; $p < 0,01$). Esse fato aliado à relação entre efeitos diretos e indiretos (DIR/IND) mostra que essas variáveis contribuem para o aumento da ocorrência da AFB₁ nos alimentos amostrados. Esse fato pode ter como causa provável a produção paralela desses metabólitos pela população fúngica que infecta os alimentos. Segundo Farias et al. (2000) o *A. parasiticus* tem a capacidade de produzir os quatro metabólitos ao mesmo tempo o que não explica o efeito direto negativo (- 0,05) da AFB₂, embora a correlação ($p > 0,05$) para esse efeito, bem como a soma dos efeitos indiretos (0,032) seja, tampouco, relevante. Isto demonstra que para as amostras que apresentaram contaminação por esses dois metabólitos, não houve relação aparente. Na Figura 7, está o fluxograma (diagrama de trilha) que representa os principais efeitos e os erros associados às estimativas dos efeitos sobre as variáveis AFM₁ (a) e AFB₁ (b).

Em azul, estimativas para o vetor de erros (ϵ) associados a AFB₁ (0,6860) e a AFM₁ (0,3480)

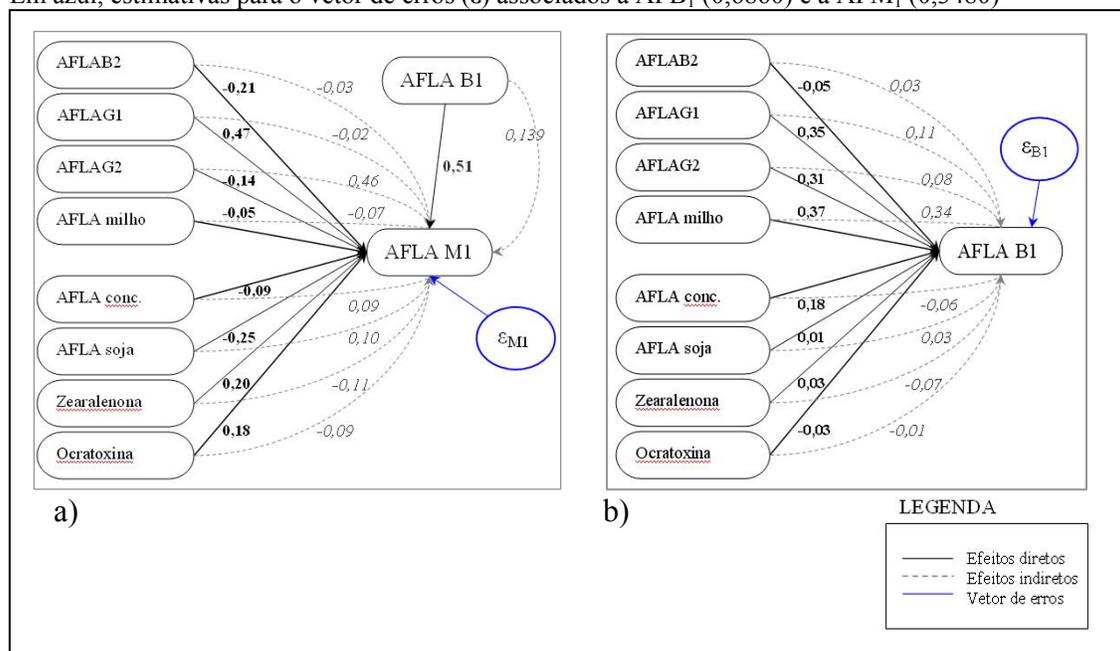


Figura 7 – Diagrama de trilha para os principais efeitos e erros associados às estimativas

Desta forma fica evidenciada a influência das variáveis AFB₁ e AFG₁ (Figura 8) sobre a concentração de AFM₁ e que embora a primeira esteja associada ao metabolismo de formação da AFM₁ (Caldas et al. 2002), a segunda não tem relação aparente com esta. A hipótese mais provável para efeito da AFG₁ seria o metabolismo secundário paralelo ao da AFB₁ produzindo quantidades equivalentes dos dois metabólitos simultaneamente, como foi descrito por Farias et al. (2000).

Os metabólitos de aflatoxina (B1, B2, G1 e G2) foram mais fidedignos como indicadores da presença de AFM₁ no leite do que quando associados aos alimentos (AFLA soja, AFLA milho e AFLA conc.) provavelmente por causa de sua ampla distribuição por todos os alimentos componentes da dieta animal nos SPL.

Conclusão

As Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 foram os contaminantes de maior prevalência sobre os alimentos fornecidos nos SPL. A AFB₁ exerceu o maior efeito direto sobre os níveis de AFM₁ e sua concentração está correlacionada ($p < 0,01$) à AFG₁. Desta forma, esses metabólitos contribuíram para o aumento na contaminação do leite por AFM₁.

Literatura citada

- BENNET, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v.16, n. 3, p. 497-516, 2003.
- FAO. Worldwide regulations for micotoxins in food and in feed in 2003. (FAO. Food and Nutrition Paper, 81). Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e07.htm>>. Acesso em: 2 dez. 2010.
- FREIRE, F.C.O., VIEIRA, I.C.P., GUEDES, M.I.F., MENDES, F.N.P. **Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos 110. 49p. 2007.
- IHESHIULOR, O.O.M., ESONU, B.O., CHUWUCA, O.K., OMEDE, I.C., OKOLI, I.C., OGBUEWU, I.P. Effects of mycotoxins in animal nutrition: a review. **Asian Journal of Animal Sciences**. v.5, n.1, p.19-33, 2011.
- JELINEK, C. F.; POHLAND, A. E.; WOOD, G. E. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds, an update. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 2, p. 223-230, 1989.
- LEUNG, M. C. K.; DIAZ-LLANO, G.; SMITH, T. K. Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9.623-9.635, 2006.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Portaria MA/SNAD/SFA, n ° 07, 09/11/88, Diário Oficial da União – Seção I, pg: 21.968, 1988.
- MOREAU, C. **Molds, toxins and food**. Chichester: John Wiley, 1979. 477 p.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Mycotoxins in foods: implications for human health. In: WAHLQVIST, M. L.; TRUSWELL, A. S. (Ed.). **Recent advances in clinical nutrition**. London: John Libby, 1986. p. 161-168.
- REGO, F.C.A., DAMASCENO, J.C., MARTINS, E.N., CORTES, C., FUKUMOTO, N.M., ROEHSIG, L., SANTOS, G.T. Influência de variáveis químicas e estruturais do dossel sobre a taxa de ingestão instantânea em bovinos manejados em pastagens tropicais. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.35, n.3, p.691-698, 2006.
- MARCIA, B. A.; LAZZARI, F. A. Monitoramento de Fungos em milho em grão, grits e fubá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**., Campinas, v. 18, n. 4, p. 363-367, 1998.
- RODRICKS, J. V.; HESSELTINE, C. W.; MEHLMAN, M. A. (Ed.). **Mycotoxins in human and animal health**. Park Forest South: Pathotox, 1977. p. 37-50.
- WAN NORHASIMA, W.M., ABDULAMIR, A.S., ABU BAKAR, F., SON, R., NORHAFNISA, A. The health and the toxic adverse effects of *Fusarium* fungal mycotoxin, fumonisins, on human population. **American Journal of Infectious Diseases**. v.5, n.4, p.283-291, 2009.

- MACHINSKI JUNIOR, M. . Aflatoxinas: Análise em Amendoim por Cromatografia em Camada Delgada. In: REGINA LÚCIA DE MORAES MOREAU, R. L. M., SIQUEIRA, M. E. P. B. (Org.). **Ciências Farmacêuticas: Toxicologia Analítica**. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2008, p. 194-199.
- PRELUSKY, D.B., SCOTT, P.M., TRENHOLM, H.L. et al. Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**. v.25, n.1, p. 87-103. 1990
- MARQUES, O. J., VIDIGAL FILHO, P. S., DALPASQUALE, V. A., SCAPIM, C. A., PRICINOTTO, L. F., MACHINSKI JÚNIOR, M. Incidência fúngica e contaminações por micotoxinas em grãos de híbridos comerciais de milho em função da umidade de colheita. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá, v. 31, n. 4, p. 667-675, 2009.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Censo Agropecuário 2006**. Rio de Janeiro: IBGE, 2009. 777p.
- WOODS, P. S. A., WYNNE, H. J., PLOEGER, H. W., LEONARD, D. K. Path analysis of subsistence farmers' use of veterinary services in Zimbabwe. **Preventive Veterinary Medicine**. v.61, p.339-358, 2003.
- MARTINS, J. L. S., MARTINS, I. S. Aflatoxina M1 no leite tipo "b" comercializado no município de São Paulo, SP (Brasil). **Revista de Saúde Pública**. v.20, n.4, p.303-308, 1986.
- OLIVEIRA, C. A. F., SEBASTIÃO, L. S., FAGUNDES, H., ROSIM, R. E., FERNANDES, A. M. Determinação de aflatoxina B1 em rações e aflatoxina M1 no leite de propriedades do Estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.30, supl.1, p.221-225, 2010.
- JOUANY, J. P.; DIAZ, D. E. Effects of mycotoxins in ruminants. In: DIAZ, D. E. (Ed.). **The mycotoxin blue book**. Nottingham: Nottingham University Press, 2005. p. 295-321.
- RODRÍGUEZ-AMAYA, D., SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: The last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.33, p.1-11, 2002.
- MOSS, M. O. The environmental factors controlling mycotoxin formation. In: SMITH, J. E.; HENDERSON, R. S. **Mycotoxin and Animal Foods**. Boca Raton: CRC Press, 1991.
- CALDAS, E.D., SILVA, S.C., OLIVEIRA, J.N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**. v.36, n.3, p.319-323, 2002.
- FARIAS, A. X., ROBBS, C. F., BITTENCOURT, A. M., ANDERSEN, P. M., CORRÊA, T. B. S. Contaminação endógena por *Aspergillus spp* em milho pós-colheita no estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.35, n.3, p.617-621, 2000.
- VALEEVA, N. I. et al. Improving food safety at the dairy farm level: farmers' and experts' perceptions. **Review of Agricultural Economics**, v. 27, n. 4, p. 574-592, 2005.

CAPITULO IV

As causas da contaminação química e biológica do leite segundo análise das práticas adotadas nos Sistemas de Produção de Leite.

RESUMO – Objetivando identificar os fatores da gestão zootécnica nos SPL que influenciaram na contaminação do leite por resíduos químicos e micotoxinas foi conduzido um estudo sobre 95 SPL no ano de 2009/2010. Foram colhidas e analisadas amostras de leite para avaliar a contaminação por aflatoxina. A AFM₁ foi quantificada por meio de um kit-imunoensaio ELISA competitivo Ridascren[®] e um questionário guia semiestruturado para identificar as causas junto aos produtores. Os alimentos foram analisados por meio de CCD quanto à presença ou ausência de micotoxinas e os dados analisados via análise de trilha. A ACM apresentou relações entre as práticas de manejo, práticas agrícolas e qualidade da matéria-prima da alimentação para esses contaminantes. As dimensões da ACM acumularam respectivamente 22,2% de variância na primeira e 14,2% na segunda. Houve relação ($p < 0,05$) entre os alimentos conservados e a presença de organofosforados no leite e entre região e presença de aflatoxinas nos alimentos da dieta animal nos SPL. A partir da contaminação por micotoxinas e resíduos químicos foi construída uma tipologia com cinco famílias de SPL em que os indicadores de aplicação de tecnologia ligados aos sistemas de alimentação e a produção de conservados determinaram a incidência e a intensidade da contaminação do produto leite.

Palavras-chave: estratégias de gestão, fontes de contaminação, manejo alimentar, alimentos concentrados

ABSTRACT - To identify the factors in animal production management in the SPL influencing the milk contamination by chemical residues and mycotoxins it was conducted a study in 95 SPL in the years of 2009/2010. There were collected and analyzed milk samples to assess contamination by aflatoxin. The AFM1 was measured using a competitive ELISA immunoassay kit-Ridascren® and a semi-structured guide questionnaire to identify the causes with farmers. The foods were analyzed by TLC for the presence or absence of mycotoxins and the data analyzed through path analysis. The MCA presented relationships between management practices, agricultural practices and quality of raw material feed for these contaminants. The dimensions of the MCA accumulated respectively 22.2% of variance in the first and 14.2% in the second. A correlation was found ($p < 0.05$) between preserved foods and the presence of organophosphates in milk and between region and the presence of aflatoxins in foods of animal diet in the SPL. It was constructed a typology concerning to milk contamination which pointed five groups of dairy farms. At these groups the indicators of technology application were linked with feed management and conserved feed production to incidence of contaminants. The amount and intensity of milk contamination was determined by these factors.

Keywords: management strategies, contamination sources, feeding, concentrate feed.

Introdução

Os sistemas de Produção Leiteiros (SPL) são unidades autônomas de produção que operam sob condições diversas e com estratégias de produção distintas. Essas estratégias podem ser planejadas pelos produtores minuciosamente, focando algum objetivo produtivo, mas muitas vezes o produtor não tem consciência exata de sua estratégia em longo prazo.

Sendo a produção de leite um dos resultados alcançados no SPL, sua quantidade, qualidade e distribuição são dependentes do planejamento anterior que o produtor faz. A comercialização deste produto tem regras institucionais estabelecidas quanto a sua qualidade (MAPA, 2002) e inocuidade (ANVISA, 2001; 2002). As regras que regem quantidade e distribuição estão mais ligadas às condições edafoclimáticas, à gestão zootécnica e às flutuações do mercado.

É possível estabelecer relações causais entre uma característica do leite reconstruindo o “caminho da contaminação”, uma vez que o leite é um resultado das práticas empregadas no SPL (LANDAIS, 1998). Um questionário abordando os pontos chave do fenômeno pode estabelecer uma relação de causa (FODDY, 2003), mas para isso é necessário métodos de análise que possam sumarizar grandes quantidades de variáveis sem perder as relações de causa originais do fenômeno estudado (LEBART et al., 2000; De LEEUW, 1984), no caso a contaminação do leite. Este é o caso em que se aplicam as técnicas multivariadas, notadamente a Análise de Correspondências Múltiplas (ACM).

Desta forma o alimento leite será caracterizado em termos de qualidade e inocuidade quanto ao seu processo de produção primária e transformação industrial (quando há) até o consumidor final. Os contaminantes do leite, em especial os resíduos químicos de agrotóxicos e endectocidas bem como as micotoxinas são fortemente influenciados pela alimentação do rebanho e pelas demais práticas de manejo adotadas nos SPL.

No caso dos agrotóxicos e endectocidas as principais causas de contaminação são o desrespeito de prazos de carência (CALDAS et al. 2000) e a má orientação dos produtores (NERO et al. 2007). Valeeva et al. (2005) classificaram na Holanda os cuidados em procedimentos de produção com relação à contaminação química do leite. O processo de

produção foi o fator mais importante (entre 18 fatores) tendo assim o maior impacto para a segurança alimentar do leite.

Quanto às micotoxinas, a literatura aponta diversas fontes de contaminação (FREIRE et al. 2007), sendo que a qualidade das matérias primas para alimentação animal é um ponto de importante discussão nesse sentido, já que em última instância o consumo dos produtos animais carrega essas toxinas para os humanos (MACHISNKI JUNIOR, 2008).

A legislação, para micotoxinas no país é bastante tolerante permitindo 50ppb¹⁷ ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) nos alimentos (FREIRE et al. 2007) o que dá uma margem de segurança nula, considerando taxas de transferência entre 1,7 e 3,0% em ruminantes para a AFB₁ por exemplo (OLIVEIRA et al. 2010), embora estes valores possam variar de acordo com vários fatores como o nível de AFB₁ ingerido, produção de leite e sensibilidade individual a aflatoxinas (JOUANY & DIAZ, 2005). Segundo Machinski Junior (2008) em torno de 58% dessas toxinas são eliminadas pela secreção biliar, por volta de 35% pela urina e uma fração considerável pelo leite na forma de AFM₁.

Portanto, a análise dos processos de produção do leite, principalmente as práticas de alimentação permitirão determinar pontos de controle eficientes para o problema da gestão da contaminação sobre os produtos de origem animal.

Deste modo, esse estudo objetiva identificar as práticas de manejo que estão ligadas às causas na contaminação por micotoxinas e resíduos químicos nos alimentos e no leite dos SPL estudados.

Material e métodos

O presente estudo foi realizado no ano agrícola de 2009/2010 em três regiões do Estado do Paraná. 1) Região noroeste, delimitada entre: 23°00'' e 23°30'' sul; 51°30'' e 52°30'' oeste; clima tipo Cfa e solo predominantes Latossolo e Nitossolo contando com 38 SPL; 2) Região sudeste, delimitada entre as coordenadas: 24°00'' e 24°30'' sul; 49°30'' e 50°00'' oeste, clima tipo Cfb¹⁸ e solo predominantes Latossolo e Cambissolo¹⁹ contando com 32 Sistemas de Produção Leiteiros – SPL e 3) Região sudoeste, delimitada entre:

¹⁷ MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Portaria MA/SNAD/SFA, n° 07, 09/11/88, Diário Oficial da União – Seção I, pg: 21.968, 1988.

¹⁸ Classificação de Köppen; fonte: Simepar/ITGC-PR 2008.

¹⁹ Fonte: EMBRAPA/EMATER-ITGC-PR 2009.

24°30'' e 25°00'' sul; 53°30'' e 54°06'' oeste; clima tipo Cfa e solo predominantes Latossolo e Nitossolo contando com 25 SPL. Todas as regiões totalizaram 95 SPL. Mapa das regiões no Apêndice.

A colheita dos dados referentes aos sistemas de produção leiteiros foi feita utilizando um questionário guia semi-estruturado (Apêndice B) contendo questões que visam remontar os processos chave da contaminação do leite tanto por micotoxinas quanto por resíduos químicos provenientes de agrotóxicos e endectocidas.

Este questionário foi elaborado por um grupo de pesquisadores e técnicos na área da produção e qualidade utilizando as técnicas para levantamento de dados e pesquisa em SPL (DEDIEU et al., 2008; DAMASCENO et al. 2008; SOLANO et al., 2000). A partir das respostas dos produtores cada uma das questões foi considerada uma variável. Posteriormente se realizou o método de seleção das variáveis, por meio da ACM e da CHA. Foram mantidas as variáveis que obtiveram os maiores escores de contribuição dados em termos de variância explicada (KUBRUSLY, 2001) e ajuste fiel aos dados originais (α de Crombach > 0,75).

Tabela 8 – Relação das variáveis de eleição submetidas à ACM e seus níveis de ocorrência

VARIÁVEIS	
	Níveis de cada variável e descrição
MICOTOXINAS	
Aflatoxina M ₁ - Leite	1. Concentrações de 0,4 e até superiores a 0,5 ppb 2. Concentrações até 0,4 ppb 3. Concentrações acima de 0,2 ppb 4. Concentrações abaixo do limite de detecção (< 0,2 ppb)
Aflatoxina B ₁ - Alimentos	1 = < limite detecção; 2 = > 3 ppb; 3 = entre 10 e 20 ppb; 4 = > 20 ppb.
Aflatoxina B ₂ - Alimentos	1 = < limite detecção; 2 = > 3 ppb; 3 = entre 10 e 20 ppb; 4 = > 20 ppb.
Aflatoxina G ₁ - Alimentos	1 = < limite detecção; 2 = > 3 ppb; 3 = entre 10 e 20 ppb; 4 = > 20 ppb.
Aflatoxina G ₂ - Alimentos	1 = < limite detecção; 2 = > 3 ppb; 3 = entre 10 e 20 ppb; 4 = > 20 ppb.
Ocratoxina - Alimentos	1 = positivo; 2 = negativo.
Zearalenona - Alimentos	1 = positivo; 2 = negativo.
RESÍDUOS QUÍMICOS	
Carbamatos no leite	1 = positivo; 2 = negativo.
Carbamatos nos alimentos	1 = positivo; 2 = negativo.
Organofosforados no leite	1 = positivo; 2 = negativo.
Organofosforados nos alimentos	1 = positivo; 2 = negativo.
Controle de carrapatos	1 = alopático; 2 = homeopático; 3 = não faz controle.
Controle químico de carrapatos em animais lactantes	1 = utiliza; 2 = não utiliza.

PROCESSOS DE PRODUÇÃO	
Uso de silagem	
Tipo de concentrado	1 = concentrado comercial; 2 = feito na propriedade; 3 = usam alimentos.
Armazenamento de concentrados	1 < 30 dias; 2 > 30 dias e < 90 dias; 3 > 90 dias
Concentrados para lactantes	1 = utiliza; 2 = não utiliza.
Uso de adsorventes	1 = utiliza; 2 = não utiliza.
Uso de subprodutos agrícolas (cascas, caroços, polpas, etc.)	1 = utiliza; 2 = não utiliza.
TECNOLOGIA	
Média por animal (L/dia)	1 menor que 120 L/dia 2 entre 120 e 250 L/dia 3 até 500 L/dia e maiores
Porcentagem de lactantes em relação ao total de vacas	1 em torno de 40% lactantes 2 de 60 até menos de 80% de lactantes 3 igual ou superior a 80 % de lactantes
Genética dos animais lactantes	1 = raça pura; 2 = cruzada; 3 = SRD
Região	1 = Maringá; 2 = Arapotí; 3 = Marechal Candido Rondon

Posteriormente foi feita uma ACM com as variáveis eleitas para explicitar as relações de causa (LEBART, 2000) entre as variáveis relativas aos processos e aquelas relativas aos níveis e abrangência de contaminação do leite e dos alimentos.

As colheitas de amostras dos alimentos concentrados, forragens e grãos conservados, subprodutos da agricultura, água e leite foram realizadas no período de maio a agosto de 2009 e subseqüentemente de outubro de 2009 e abril de 2010.

As amostras de alimentos foram refrigeradas logo após a colheita de campo e em seguida congeladas a -20°C em freezer até a realização das análises de contaminantes no laboratório de Toxicologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina, campus sede. As amostras de leite e água foram colhidas e acondicionadas da mesma forma que os alimentos e posteriormente as amostras de leite (em duplicata) foram divididas em dois lotes. As amostras de água e o primeiro lote das amostras de leite foram enviados à UEL, assim como as amostras de alimentos, para a realização das análises de contaminantes. O segundo lote das amostras de leite foi submetido à extração do plasma para a leitura de Aflatoxina M₁ no Laboratório de Alimentos e Nutrição Animal da Universidade Estadual de Maringá.

Para detecção de micotoxinas, utilizou-se a CCD, descrita por Soares e Rodriguez-Amaya (1989) adaptada por Gimeno (1983). Os padrões e concentrações (µg/mL)

utilizados foram AfB1 (2,55), AfB2 (2,62), AfG1 (2,45), AfG2 (4,55) e Ocratoxina A (143,05) (Sigma Inc. - EUA), conforme metodologia da AOAC, (1995). Os limites de detecção do método foram 2 e 5 µg/Kg e os limites de determinação foram de 4 e 10 µg/Kg para aflatoxina e ocratoxina, respectivamente.

Na extração do plasma do leite, os potes plásticos de 20 ml, contendo as amostras, foram descongelados em banho-maria a 40°C por 30 minutos e imediatamente centrifugadas em centrífuga refrigerada Fahren[®] a 10°C durante 10 minutos a uma rotação de 6700 RPM. Posteriormente foram retiradas alíquotas da fase intermediária, depois de removida a matéria graxa sobrenadante, e depositadas com pipeta em recipientes *ependorf* sendo acondicionadas em refrigerador e identificadas para análise subsequente.

As amostras de leite foram analisadas, em duplicata, com o *kit* imunoenzimático ridascreen[®]Fast Aflatoxin M₁, R-biopharm[®]. Este, composto por um suporte para os “poços”, recobertos com anticorpos anti-IgG, cinco soluções-padrão de AFM₁ (de 0, 250, 500, 1000 e 2000ppt), contendo anticorpo IgG policlonal anti-AFM₁, conjugado, cromógeno e solução bloqueadora de acordo com o protocolo descrito no manual.

A leitura foi realizada utilizando espectrofotômetro em comprimento de onda (λ) de 450nm e o resultado expresso pela média dos valores observados para cada duplicata. As absorvâncias foram calculadas para cada observação segundo:

$$A_{\lambda} = \left(\frac{A_i}{A_{0ppt}} \right) * 100$$

Em que::

A = absorvância para λ de 450 nm;

A_{0ppt} = absorvância para o padrão 0 (0 ppt de AFM₁);

A_i = absorvância observada para cada amostra (de i até n).

Os valores de absorvância obtidos (em %) para cada observação foram convertidos em concentração (ppt) pela curva padrão, parametrizada a cada ensaio, fornecida pelo software Softmax-pro[®], versão 5.4. O protocolo de análise desenvolvido foi para ensaios de imunoafinidade competitiva, (ELISA) lidos no “*endpoint*” de cada reação com base no protocolo para melamina (Softmax-pro 5.4).

As análises estatísticas, já descritas, foram realizadas com ajuda do software SPSS 18.0, com os procedimentos de redução de dimensionalidade dos dados (ACM) e classificação de variáveis (CHA).

Resultados e discussão

A seguir as variáveis ligadas à contaminação e suas respectivas contribuições e correlações são representadas na figura 8.

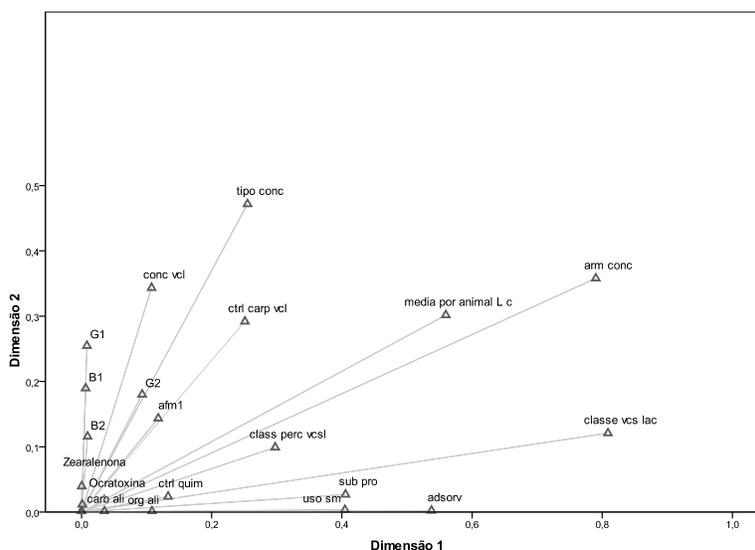


Figura 8 – Representação das variáveis e suas contribuições para a formação das duas primeiras dimensões da ACM.

As variáveis que assumem os maiores valores para cada dimensão são as que mais contribuem para a variância acumulada (BARROSO & ARTES, 2003) sob a forma de inércia. Desta forma, as variáveis que mais contribuíram para a formação da dimensão 1 e a diferenciação dos casos (SPL's) foram: armazenamento de concentrado, número de vacas em lactação, média de produção por animal, uso de adsorventes e uso de subprodutos subprodutos. A mensagem que essas variáveis passam é tipicamente tecnológica, com relação aos sistemas de produção.

Para a dimensão 2 o tipo de concentrado, o controle de carrapatos em lactantes, a incidência de Aflatoxina B1 nos alimentos e o fornecimento de concentrado para as lactantes dão uma interpretação de qualidade do produto leite, principalmente quanto a sua inocuidade/contaminação.

Na tabela 9, estão as saídas da ACM para as correlações não paramétricas entre as variáveis.

Tabela 9a – Correlação entre as variáveis transformadas para a ACM – parte 1

	B1	B2	G1	G2	Zearalenona	Ocratoxina	ORGali	CARBali	afm1	PROD	VLAC	VLAC %
AFB1	1											
AFB2	-0,018	1										
AFG1	-0,016	0,691**	1									
AFG2	0,177	0,294**	0,293**	1								
Zearalenona	-0,042	-0,030	-0,026	0,052	1							
Ocratoxina	-0,018	-0,013	-0,012	0,294*	-0,030	1						
ORGali	-0,073	0,074	0,083	0,090	-0,060	0,074	1					
CARBali	-0,105	0,176	0,090	0,078	0,175	0,176	-0,075	1				
AFM1	0,144	-0,026	-0,033	0,244*	0,061	0,329*	0,224*	-0,017	1			
PROD	0,152	-0,019	-0,041	0,188	0,055	0,107	0,172	-0,079	0,223*	1		
VLAC	-0,055	0,050	0,009	0,155	0,045	0,116	0,214*	0,004	0,236*	0,611*	1	
VLAC %	0,085	-0,056	0,061	0,224*	0,026	0,059	0,162	0,014	0,076	0,446*	0,485	1
Uso silagem	-0,132	0,140	0,046	0,067	0,108	0,140	0,180	0,107	0,194	0,333*	0,646	0,224
UCL	0,213*	-0,039	-0,034	0,243*	0,084	-0,039	0,219*	-0,033	0,023	0,318*	0,238	0,150
TiC	0,179	-0,130	-0,029	0,079	0,019	-0,130	0,129	-0,085	0,083	0,252*	0,402	0,248
SProd	-0,008	0,108	-0,013	0,193	0,039	0,108	0,005	0,164	0,198	0,455*	0,555	0,060
ARMZ	0,135	0,063	0,100	0,262*	-0,055	0,063	0,257*	0,004	0,211*	0,592*	0,815	0,484
UAD	0,111	0,078	0,104	0,191	-0,045	0,078	0,219*	0,022	0,176	0,496*	0,591	0,417
CQrebanho	-0,103	-0,072	-0,111	-0,068	-0,064	0,150	-0,106	-0,003	0,091	0,346*	0,295	0,158
CQlactantes	-0,208*	0,083	0,106	-0,171	-0,125	0,083	0,151	0,019	0,084	0,264*	0,439	0,043

* significativo pelo teste τ de Kendall ($p < 0,05$); ** significativo pelo teste τ de Kendall ($p < 0,01$)

AFB1 = aflatoxina B1; AFB2 = aflatoxina B2; AFG1 = aflatoxina G1; AFG2 = aflatoxina G2; ORGali = resíduos de organofosforados nos alimentos; CARBali= resíduos de carbamatos nos alimentos; AFM1 = aflatoxina M1; VLAC e VLAC% = número de vacas lactantes e percentual de lactantes em relação ao rebanho de fêmeas, respectivamente; CVL = concentrado para vacas lactantes; TiC = tipo de concentrado fornecido; SProd = subprodutos agrícolas; ARMZ = armazenamento dos concentrados; UAD = utilização de adsorventes para micotoxinas; CQrebanho = controle químico de parasitos no rebanho; CQlactantes = controle químico de parasitos nas vacas lactantes; UCL = utilização de concentrados para lactantes; CARB leite = resíduos de carbamatos no leite.

Tabela 9b – Correlação entre as variáveis transformadas para a ACM – continuação

	uso sm	conc vcl	TiC	sub pro	ARMZ	UAD	ctrl quim	CQlactantes
Uso silagem	1							
conc vcl	0,157	1						
tipo conc	0,174	0,204*	1					
sub pro	0,352*	0,067	0,225*	1				
ARMZ	0,478*	0,257*	0,558**	0,512*	1			
UAD	0,389*	0,232*	0,305*	0,503*	0,581*	1		
CQrebanho	0,272*	-0,050	0,051	0,278*	0,214*	0,142	1	
CQlactantes	0,315*	-0,094	0,317*	0,301*	0,455	0,273*	0,416**	1

O controle químico de carrapatos esteve fortemente associado à região (Tabela 8) $P < 0,01$, desta forma se torna uma componente importante na explicação da contaminação. Smith et al.(2002); trabalhando com sistemas de produção leiteiros no Chile identificou, como no presente trabalho, a influência das variáveis tecnológicas na tipologia de SPL.

As práticas que são afetadas pela utilização de tecnologias no processo de produção, via de regra alteram os resultados em termos de qualidade e oferta do produto leite como observado por Bondenmüller et al., (2010) e Damasceno et al. (2008). Essas tecnologias incorporadas às práticas de alimentação têm efeito sobre a contaminação por micotoxinas, como representado pela figura 9.

As variáveis representadas na figura, sua descrição níveis de incidência podem ser visualizados na Tabela 8.

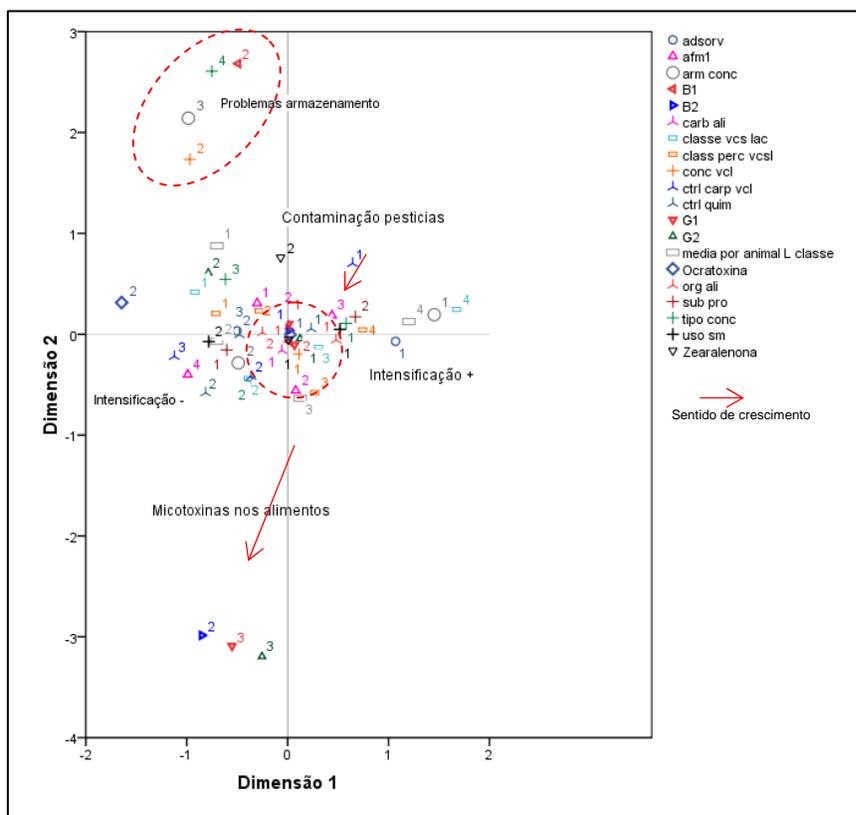


Figura 9 – Representação dos níveis de incidência das variáveis sobre o plano fatorial e interpretação da ACM.

A proximidade entre as representações gráficas da ausência de aflatoxina B2 (ocorrência “2” em laranja) e o fornecimento mínimo ou nulo de concentrado (ocorrência em azul) no quadrante em que as dimensões assumem valores negativos indicando que essas duas variáveis têm alta correlação (LEBART et al. 2000). Isto demonstra uma relação entre a quantidade de concentrados fornecidos e a ocorrência desta micotoxina. Esta afirmação é suportada pelos trabalhos de Márcia & Lazzari (2008) e Kawashima & Valente Soares (2009) estudando a contribuição dos derivados do milho nas contaminações por micotoxinas.

A contaminação foi representada na figura acima como uma tendência central, ou seja, não diferencia os SPL em estudo. Em outras palavras a contaminação por aflatoxinas, bem como por resíduos químicos é uma característica endêmica desses SPL, variando apenas na intensidade e nas suas especificidades.

A intensificação do uso de concentrado nos SPL mais produtivos (lado positivo da dimensão 1) está associado a maiores concentrações ($> 0,4$ ppb) de AFM1 no leite, embora o menor uso de tecnologia esteve relacionado com maior incidência de amostras de leite contaminadas com AFM1, mas concentrações mais baixas de até $0,2$ ppb. Já para os resíduos de organofosforados, estes foram associados ($p < 0,05$) à alimentação dos animais, com relação aos alimentos conservados (Tabela 8).

A distribuição das micotoxinas está preferencialmente relacionada aos cereais e aos concentrados nesta amostragem. Notadamente o milho e os demais cereais²⁰, que apresentam 12,2% das amostras contaminadas, têm papel de destaque nessa contaminação. Kawashima & Valente Soares (2009) encontraram cerca de 96,0% de contaminação estudando milho e seus derivados. O fornecimento de concentrado para as lactantes, por sua vez, esteve associada ($p < 0,05$) à contaminação por AFB₂.

O equilíbrio entre aplicação de tecnologia na produção e contaminação do leite é bastante tênue. No caso das micotoxinas, parece estar relacionado ao armazenamento de concentrado e tratamentos culturais do milho (MARQUES et al. 2009), mas principalmente à qualidade das matérias-primas das rações comerciais. Essas matérias-primas obedecem à legislação determinada pelo Ministério da Agricultura (1988) e a tolerância é alta, $50 \mu\text{g}/\text{Kg}$ para alimentos destinados ao consumo animal, criando assim um problema institucional e prático, já que a contaminação do leite é em função dos alimentos e a cobrança recai sobre o produtor de leite.

A tipologia formou quatro famílias de produtores (G1 a G4) baseados em suas características diante da contaminação do leite.

Utilizando as interpretações funcionais das variáveis (figura 9) podem-se classificar essas famílias de SPL segundo suas características gerais.

O Grupo1 é caracterizado por SPL que se apresentam contaminado por resíduos de AFM1 bem como por pesticidas/agrotóxicos. As concentrações de AFM1 se apresentam variáveis, desde abaixo do limite de detecção em torno de $0,2$ ppm até acima do limite da ANVISA de $0,5$ ppm.

²⁰ A presença de outros cereais como aveia, trigo e centeio foi inferior a 1% da amostra, por isso foram incorporados ao milho.

A distribuição dos SPL segundo a tipologia criada pela ACM, classificados pela ACHA é apresentada na figura 11.

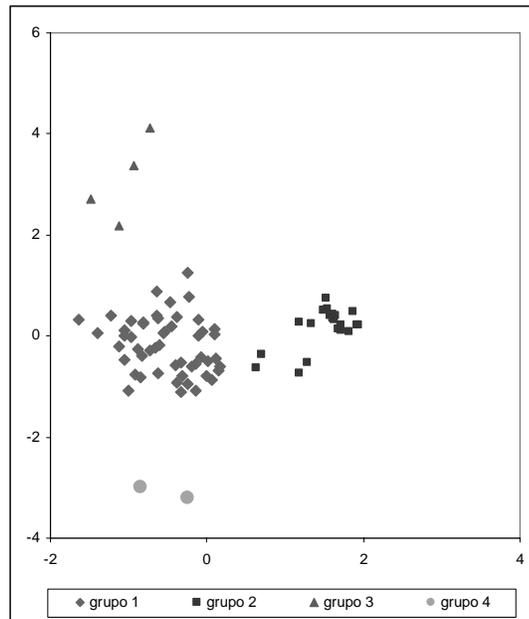


Figura 10 – Representação das tipologias dos SPL sobre o plano fatorial para a ACM.

Quanto à produção de leite caracteriza-se por médias até 250 L/ dia e que confeccionam seu próprio concentrado ou utilizam resíduos da agricultura em seu lugar. Relacionando as características deste grupo com o trabalho de Oliveira et al. (2010) é possível traçar um paralelo entre o fornecimento de resíduos da agricultura, principalmente os oleaginosos ao aumento das concentrações ($\mu\text{g}/\text{L}$) de AFM1. Quantitativamente é o grupo mais importante em número de produtores e, por esse motivo é um perfil de produtor a ser atingido por ações de melhoria das práticas de produção visando à melhoria da qualidade do produto final (DAMASCENO et al. 2008).

O Grupo 2 é um exemplo de maior aplicação de tecnologia na produção e maiores índices produtivos, acima de 250 L/dia até superiores a 500 L de leite/ dia. A contaminação nesse grupo é principalmente ligada aos resíduos de organofosforados na alimentação dos animais, caracterizada por fornecimento de forragens conservadas e proporções mais elevadas de concentrados comerciais com relação aos demais grupos. A contaminação por AFM1, assim como no grupo 1 é importante em termos de proporção dos SPL, mas contaminados com concentrações intermediárias acima de 0,2 até 0,3 ppb. A utilização de maiores proporções de concentrados e de silagens, ambos com presença marcante de milho

que é um veículo de contaminação por Aflatoxinas como observado por Kawashima & Valente Soares (2009).

Os grupos 3 e 4 estão ligados a aspectos específicos, tanto com relação a problemas de armazenamento e ocorrência de AFB1, no caso do grupo 3 quanto por produções medianas e contaminação das matérias-primas por Aflatoxinas no caso do grupo 4. Ambos os grupos conservam um traço interessante de não terem presença de contaminantes provenientes de resíduos de carbamatos e organofosforados. É importante notar que esses grupos são menos representativos em termos de número de SPL contemplados frente aos demais grupos, e embora tenham que melhorar as características de controle de qualidade de seus alimentos, podem ser referências em termos de não contaminação por resíduos de pesticidas e de agrotóxicos.

A determinação desses grupos de SPL, chamados de famílias pela tipologia, têm algumas utilidades mais óbvias: i) tentar minimizar o viés de classificações simplistas (“intensivo”, “extensivo”, etc.) e usuais de SPL e deste modo estabelecer informações válidas do ponto de vista científico para a tomada de decisão e aconselhamento técnico; ii) demonstrar os processos de produção, enquanto práticas definidas de manejo zootécnico dos SPL, determinam a qualidade dos produtos finais, (inclusive o leite) e são distintos entre os grupos de SPL agrupados segundo as suas características técnicas; iii) implementar modelos de ação de ATER, visando boas práticas para evitar contaminação, baseado nos indicadores técnicos que definem a tipologia do SPL.

Essas afirmações de que os SPL são diversos (HOSTIOU et al. 2006) e que necessitam de ações de pesquisa (SMITH et al. 2002) e de ATER compatíveis com suas características funcionais, são a base para a ciência dos sistemas de produção (LANDAIS, 1987; DEDIEU et al. 2008). Portanto para se estudar e intervir sobre qualquer aspecto de um SPL, neste caso a contaminação do leite, é necessário considerar a sua diversidade e as múltiplas interações a que está submetido.

Conclusão

A contaminação dos SPL por AFM1 não foi importante para a distinção dos grupos pela CHA, portanto foi generalizada entre os grupos. A contaminação dos alimentos por aflatoxinas parece estar ligada à presença do milho, como componente da alimentação dos rebanhos. A causa relacionada mais fortemente à presença de resíduos de organofosforados foi à contaminação dos alimentos conservados, provavelmente em razão da sua utilização nas culturas que posteriormente foram conservadas.

LITERATURA CITADA

- BARROSO, L.P.; ARTES, R. Análise Multivariada. In: SIMPÓSIO DE ESTATÍSTICA APLICADA À EXPERIMENTAÇÃO AGRONÔMICA, 2003, Lavras. Anais... Lavras: Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciências Exatas, 2003, 152 p.
- BODENMÜLLER FILHO, A., DAMASCENO, J. C., PREVIDELLI, I. T. S., SANTANA, R. G., RAMOS, C. E. C. O., SANTOS, G. T. Tipologia de sistemas de produção baseada nas características do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.39, n.8, p.1832-1839, 2010.
- BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos: Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos. Portaria n ° 685, de 27 de agosto de 1998
- BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. In: Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo... Diário Oficial da União, Brasília, p.13, 21 set. 2002. Seção 1.
- CALDAS, E.D., SILVA, S.C., OLIVEIRA, J.N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**. v.36, n.3, p319-323, 2002.
- DAMASCENO, J.C., BOUNDERMÜLLER FILHO, A., RAMOS, C. E. C. O., Dos SANTOS, J. C., SANTOS, G. T. O Papel do homem na gestão e controle de qualidade da produção de leite. In: **Inovação tecnológica na cadeia produtiva do leite e a sustentabilidade da pecuária leiteira**. Ed.: SANTOS, G. T., UHLIG, L., BRANCO, A. F., JOBIM, C. C., DAMASCENO, J. C., CECATO, U. Maringá. Eduem,310 p, 2008.
- FAO. Worldwide regulations for micotoxins in food and in feed in 2003. (FAO. Food and Nutrition Paper, 81). Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e07.htm>>. Acesso em: 2 dez. 2010.
- FARIAS, A. X., ROBBS, C. F., BITTENCOURT, A. M., ANDERSEN, P. M., CORRÊA, T. B. S. Contaminação endógena por *Aspergillus spp* em milho pós-colheita no estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.35, n.3, p.617-621, 2000.
- FREIRE, F.C.O., VIEIRA, I.C.P., GUEDES, M.I.F., MENDES, F.N.P. **Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos 110. 49p. 2007.

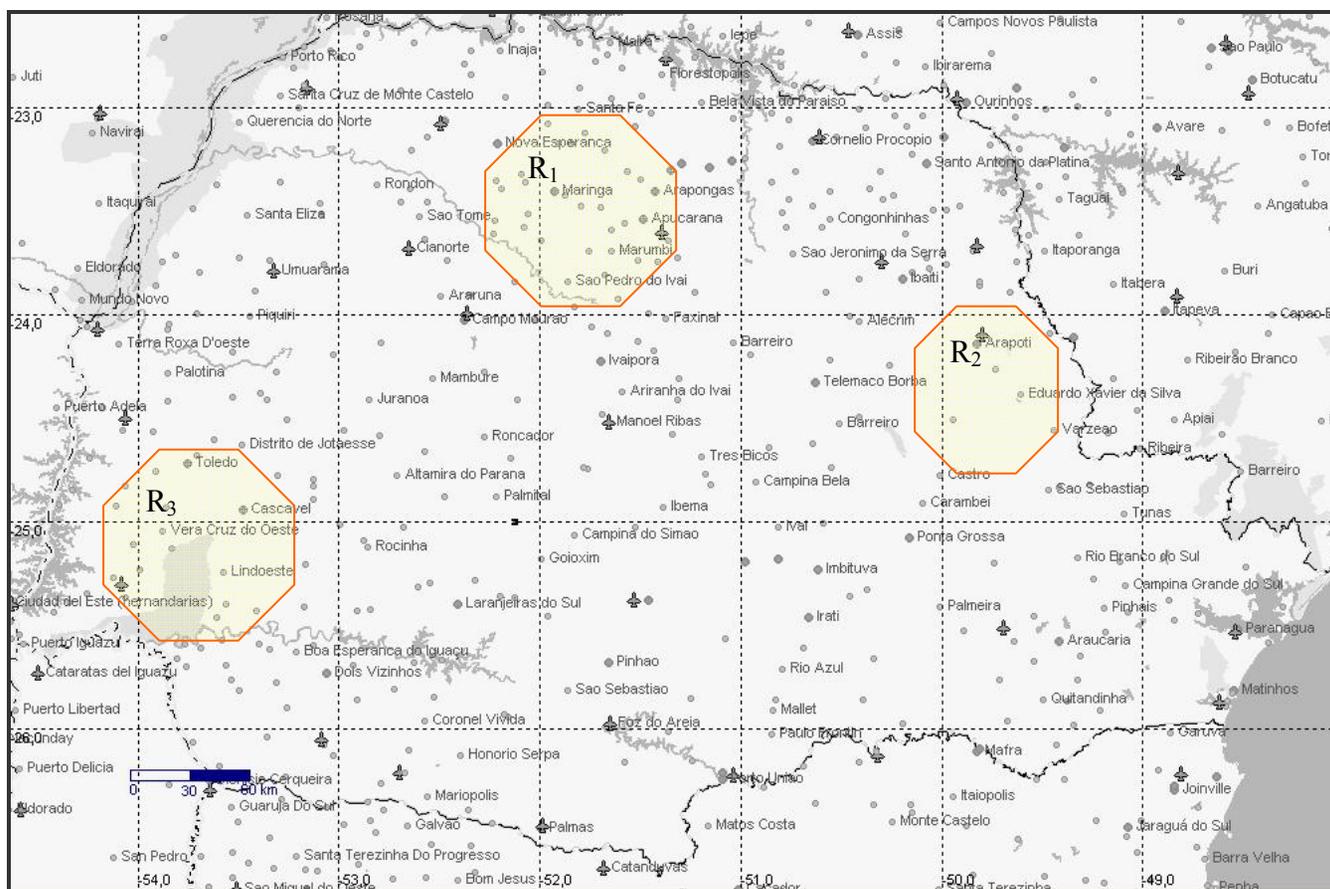
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Censo Agropecuário 2006**. Rio de Janeiro: IBGE, 2009. 777p.
- IHESHIULOR, O.O.M., ESONU, B.O., CHUWUCA, O.K., OMEDE, I.C., OKOLI, I.C., OGBUEWU, I.P. Effects of mycotoxins in animal nutrition: a review. **Asian Journal of Animal Sciences**. v.5, n.1, p.19-33, 2011.
- JELINEK, C. F.; POHLAND, A. E.; WOOD, G. E. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds, an update. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 2, p. 223-230, 1989.
- KUBRUSLY, L. S. Um procedimento para calcular índices a partir de uma base de dados multivariados. **Pesquisa Operacional**. v.21, n.1, p.107-117, 2001.
- LEUNG, M. C. K.; DIAZ-LLANO, G.; SMITH, T. K. Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 9.623-9.635, 2006.
- MACHINSKI JUNIOR, M. . Aflatoxinas: Análise em Amendoim por Cromatografia em Camada Delgada. In: REGINA LÚCIA DE MORAES MOREAU, R. L. M., SIQUEIRA, M. E. P. B. (Org.). **Ciências Farmacêuticas: Toxicologia Analítica**. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2008, p. 194-199.
- MARCIA, B. A.; LAZZARI, F. A. Monitoramento de Fungos em milho em grão, grits e fubá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**., Campinas, v. 18, n. 4, p. 363-367, 1998.
- MARQUES, O. J., VIDIGAL FILHO, P. S., DALPASQUALE, V. A., SCAPIM, C. A., PRICINOTTO, L. F., MACHINSKI JÚNIOR, M. Incidência fúngica e contaminações por micotoxinas em grãos de híbridos comerciais de milho em função da umidade de colheita. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá, v. 31, n. 4, p. 667-675, 2009.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Portaria MA/SNAD/SFA, n ° 07, 09/11/88, Diário Oficial da União – Seção I, pg: 21.968, 1988.
- NERO, L. A., MATTOS, M. R., BELOTI, V., BARROS, M. A. F., PONTES NETTO, D., FRANCO, B. D. G. M. Organofosforados e carbamatos no leite produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e ação sobre *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.27, n.1, p.201-204, 2007.
- OLIVEIRA, C. A. F., SEBASTIÃO, L. S., FAGUNDES, H., ROSIM, R. E., FERNANDES, A. M. Determinação de aflatoxina B1 em rações e aflatoxina M1 no leite de propriedades do Estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.30, supl.1, p.221-225, 2010.
- PRELUSKY, D.B., SCOTT, P.M., TRENHOLM, H.L. et al. Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**. v.25, n.1, p. 87-103. 1990
- RODRICKS, J. V.; HESSELTINE, C. W.; MEHLMAN, M. A. (Ed.). **Mycotoxins in human and animal health**. Park Forest South: Pathotox, 1977. p. 37-50.
- RODRÍGUEZ-AMAYA, D., SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: The last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.33, p.1-11, 2002.

- SMITH, R. R., MOREIRA, V. M., LATRILLE, L. L. Caracterización de sistemas productivos lecheros en la X región de Chile mediante análisis multivariable. *Agricultura Técnica*. v.62, n.3, p.375-395, 2002.
- SOLANO, C., BERNUÉS, A., ROJAS, F., JOAQUÍN, N., FERNANDEZ, W., HERRERO, M. Relationships between management intensity and structural and social variables in dairy and dual-purpose systems in Santa Cruz, Bolivia. ***Agricultural Systems*** v.65, 159-177, 2000.
- VALEEVA, N. I. et al. Improving food safety at the dairy farm level: farmers' and experts' perceptions. ***Review of Agricultural Economics***, v. 27, n. 4, p. 574-592, 2005.
- WAN NORHASIMA, W.M., ABDULAMIR, A.S., ABU BAKAR, F., SON, R., NORHAFNISA, A. The health and the toxic adverse effects of *Fusarium* fungal mycotoxin, fumonisins, on human population. ***American Journal of Infectious Diseases***. v.5, n.4, p.283-291, 2009.

APÊNDICES IV

APÊNDICE A

Quadro 1 - Mapa do Estado do Paraná discriminando as regiões pesquisadas



R1, região de Maringá, composta por 38 Sistemas de Produção Leiteiros – SPL; **R2**, região de Arapoti, composta por 32 SPL e **R3**, região de Marechal Cândido Rondon, composta por 32 SPL.

Fonte:GPS Track maker©, versão 13.7.462

APÊNDICE B

QUESTIONÁRIO TÉCNICO – MAPA/CNPq/UEM

ENTREVISTADOR: _____

DATA DA ENTREVISTA: ____/____/____

I. DADOS CADASTRAIS

Nome do entrevistado: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

II. CARACTERIZAÇÃO DO PROPRIETÁRIO E PROPRIEDADE RURAL:

1. Onde a família reside?
 - a) Propriedade onde trabalha;
 - b) Outra propriedade rural;
 - c) Cidade.

2. Faz anotações da atividade? Quais?

3. Como a decisão é tomada na propriedade?

- [] pelo pai
 [] pelo pai e pela mãe
 [] pela família em conjunto
 [] outra forma: Qual? _____

4. Grau de escolaridade dos membros da família:

- A) Não tem estudos; B) 1º grau incompleto;
 C) 1º grau completo; D) 2º grau incompleto;
 E) 2º grau completo; F) superior incompleto;
 G) superior completo; H) pós graduação

	A	B	C	D	E	F	G	H
Pai	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]
Mãe	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]
Filho	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]
Filho	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]
Filho	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]
outro	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]

Quem é outro?: _____

5. Idade da família (anos)

Pai ____; Mãe ____; Filho ____; Filho; ____;

Filho ____; Outro ____.

6. Há quantos anos trabalha na atividade agropecuária? _____

7. Área total da propriedade rural (em ha) _____
8. Área da propriedade destinada à produção de leite (inclusive para a produção de alimentos) : Pastagem_____ha;
Conservadas/corte_____ha.
9. Quais as principais atividades agropecuárias desenvolvidas na propriedade? (considerar renda como fator classificatório da importância)
- a) _____
- b) _____
- c) _____
- d) _____
- e) Outras? _____

III. CARACTERIZAÇÃO DA PRODUÇÃO LEITEIRA E REBANHO

10. Qual a quantidade de leite produzido (em litros por dia)?
[considerar a média ao longo de 12 meses]_____

Se houver como, precisar melhor à seguir:

Ja	Fe	Ma	Ab	Ma	Ju	Ju	Ag	Se	Ou	No	de

11. Quais as raças leiteiras que o Sr. possui no rebanho?
- a) Holandesa
- b) Pardo suíço

- c) Jersey
- d) Girolando
- e) Gir
- f) Cruzado (2 raças)
- g) SRD (+ de 2 raças)

12. Qual o número total de animais?

Total [____]; lactantes[____]; vacas secas [____];
novilhas [____]; bezerros [____]; garrotes [____]; Touros [____];

IV. MANEJO ALIMENTAR

13. Qual é a base forrageira principal?

[] Pastagem [] pastagem+silagem
[] Pastagem + cana [] pastagem + feno
[] Silagem [] sil.+ feno
[] Outra: Qual? _____

14. Forragem de corte?

[] Milho _____ha [] Capim elefante_____ha
[] Cana _____ha [] aveia_____ha
[] Milheto_____ha
[] Outra: Qual? _____: Área_____ha

15. Como é feito o manejo alimentar das vacas em lactação?

- a) Pastejo;
- b) Estabulado;
- c) Semi-estabulado (pastejo + estábulo).

16. Como é feito o manejo alimentar das vacas secas?

- a) Pastejo;
- b) Estabulado;
- c) Semi-estabulado.

17. Qual a área utilizada para pastagem? (em ha): _____

18. Qual a principal forrageira utilizada?

- a) Brachiaria brizantha;
- b) Brachiaria humidicola;
- c) Grama estrela;
- d) Coast-cross;
- e) Panicum (Tanzânia, Mombaça, etc.)
- f) Outros, quais? _____

19. Qual a principal forragem conservada utilizada?

- a) Silagem de milho;
- b) Silagem de sorgo;
- c) Silagem de cana;
- d) Feno, qual? _____

20. Quando começa e termina aproximadamente o período das águas na sua região? _____ (ex: set-mai)

21. Por quanto tempo, em meses, o Sr. oferecer silagem para as vacas? _____ (ex: janeiro a julho)

22. Qual a quantidade média de silagem oferecida para cada vaca (Kg)? águas _____ seca _____

23. Qual é o critério?

- [] Kg/ litro de leite produzido
- [] Só os melhores animais
- [] Para todos os animais

24. O Sr. utiliza concentrado para vacas em lactação?

[] sim [] não: caso não, por quê?

[] as vezes; quando? _____

Quantidade (Kg) estimada de concentrado consumida.

Ja	Fe	Ma	Ab	Ma	Ju	Ju	Ag	Se	Ou	No	de

25. Que tipo de concentrado o Sr. utiliza?

- a) Mistura comercial;
- b) Preparado na propriedade;
- c) Outro, qual? _____

26. O Sr. possui local de armazenagem de concentrados?

- a) Sim, paiol;
- b) Sim, silo vertical;
- c) Sim, outro local;
- d) Não.

27. Caso armazene o concentrado no paiol ou em outro local, como é feito o armazenamento?

- a) Em sacos diretamente em contato com o piso (solo);
- b) Em sacos sobre jornal, papelão ou plástico;
- c) Em sacos colocados sobre tablado de madeira ou plástico (*pallets*);
- d) Em tambores de ferro ou plástico com tampas;
- e) Em tambores de ferro ou plástico sem tampas;
- f) Outro, qual? _____

28. Por quanto tempo o senhor armazena concentrado em média?

29. O Sr. utiliza sal mineral para a alimentação animal?

- a) Sim;
- b) Não;
- c) Às _____ vezes: _____ Freqüência
? _____

30. O Sr. utiliza subprodutos ou restos de culturas agrícolas na alimentação animal?

- a) Sim, qual (ais)? _____
- b) Algumas vezes, qual (ais)?

c) Não.

31. O Sr. utiliza adsorvente químico para micotoxinas na ração?

- a) Sim;
- b) Não;
- c) Desconheço o produto

V. MANEJO DE ORDENHA

32. Qual o horário das ordenhas? _____

33. Qual o tipo de ordenha o Sr. utiliza?

- a) Ordenha manual com bezerro;
- b) Ordenha manual sem bezerro;
- c) Ordenha mecanizada (balde ao pé);
- d) Ordenha mecanizada com linha de leite;

34. O Sr. alimenta as vacas em períodos próximos à ordenha?

[antes ou após as ordenhas]

- a) Sim, durante a ordenha;
- b) Sim, após a ordenha;
- c) Não.

35. Assinale as práticas de ordenha que são rotinas na propriedade e dê uma nota de 0 a 5 para cada uma, sendo 0 nenhuma importância e 5 muita importância, em sua opinião:

- [] Higieniza os tetos antes da ordenha _____ (nota).
- [] Limpeza do conjunto de teteiras _____;
- [] Descarte dos 3 primeiros jatos de leite _____;
- [] Teste para mastite, caneco _____;
- [] Mãos limpas _____;
- [] Asseio pessoal _____;

36. Como é feito o teste de mastite?

- a) Caneca
- b) CMT
- c) Caneca + CMT
- d) O senhor sabe o que é CMT? [] sim; [] não.

37. Qual a frequência de uso do CMT?

38. Há mastite no rebanho?

	Qual a frequência <i>[número de animais infectados ao longo de 12 meses]</i>	
	<i>Época das águas</i>	<i>Época de seca</i>
a) Sim, muito frequente		
b) Sim, frequente		
c) Sim, pouco frequente		
d) Não		

39. O senhor trata mastite no seu rebanho? [] sim, [] não.

- a. Quantos caso tratou nos últimos 2 anos? _____
- b. Quanto gastou em tratamento nesse período aproximadamente em R\$? _____
- c. Quantos animais teve de descartar por esse motivo nos últimos 5 anos? _____

40. Liste o nome dos medicamentos (antibióticos) que o senhor utiliza na sua propriedade: _____

41. Realiza pré e pós-dipping?

- a) Sim, pré-dipping;
- b) Sim, pós-dipping;
- c) Sim, ambos (pré e pós-dipping);
- d) Não realizo.

42. Há informação sobre contagem de células somáticas (CCS)?

- a) Sim, qual a situação? _____
- b) Não;
- c) Desconheço o que é CCS.

43. Quantos meses, em média, dura a lactação de uma vaca na sua propriedade? _____ meses

44. O Sr. possui resfriador de leite na propriedade?

- a) Sim, qual o tipo? _____
- b) Não, por quê? _____

45. Local que as vacas dormem?

- a) Pasto;
- b) Estábulo.

46. Qual o material da cama das vacas?

- a) colchão;
- b) cepilho;
- c) areia;
- d) outros.

VI. MANEJO REPRODUTIVO

47. O Sr. adota algum critério para a realização da primeira cobertura das novilhas? Qual?

48. Qual a idade média das novilhas à primeira parição em meses? _____

49. Qual técnica de cobertura o Sr. adota?

- a) Monta natural;
- b) Monta controlada (leva a vaca ao touro);
- c) Inseminação artificial;
- d) IA + repasse;
- e) Transferência de embrião.

50. Quantas repetições de cio o senhor aceita no máximo?

- a. Em geral _____
- b. Para um animal mais produtivo _____
- c. Não controla isso

51. Depois disso qual o destino da vaca que não emprenhar?

- a. Descarte
- b. Consulta um técnico para saber
- c. Depende do animal: Explique: _____

52. Em que época do ano ocorre a maior freqüência dos nascimentos? (marque "X" em baixo dos meses, ou se souber, quantidade de nascimentos)

Ja	Fe	Ma	Ab	Ma	Ju	Ju	Ag	Se	Ou	No	de

53. Qual a média de intervalo entre partos? _____ meses.

54. Quanto tempo depois do parto a vaca leva para emprenhar novamente? _____

55. Há ocorrência de: **[podem ser assinaladas mais de uma alternativa]**

- a) Abortos;
- b) Metrite;
- c) Retenção de placenta;
- d) Problemas durante o parto;
- e) Repetição de cio;
- f) Problemas de casco;
- g) Outros: Quais?

VII. CONTROLE SANITÁRIO

56. Já houve recusa ou penalização do seu leite? [] não; [] sim

57. Foi informado o motivo? _____ Qual era? _____

58. Qual é o destino do leite de animais que são tratados com endectocidas ou antibióticos?

59. O Sr. realiza vacinação de (podem ser assinaladas mais de uma alternativa):

- a) Febre aftosa;
- b) Raiva;
- c) Brucelose;
- d) Leptospirose;
- e) BVD;
- f) IBR;
- g) outros, quais? _____

60. Já houve descartes de animais por problemas de doenças? _____ quando? _____
Quantos animais? _____

