UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO CONSUMO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

AFLATOXINAS M1 EM QUEIJOS ARTESANAIS (INFORMAIS) E INDUSTRIALIZADOS PRODUZIDOS NO ESTADO DE PERNAMBUCO

ISABELA MARIA DE MOURA SILVA

Recife, PE

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO CONSUMO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ISABELA MARIA DE MOURA SILVA

AFLATOXINAS M1 EM QUEIJOS ARTESANAIS (INFORMAIS) E INDUSTRIALIZADOS PRODUZIDOS NO ESTADO DE PERNAMBUCO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Barbosa Acioli de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz

Recife, PE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586a Silva, Isabela Maria de Moura
Aflatoxinas M1 em queijos artesanais (informais) e industrializados produzidos no Estado de Pernambuco / Isabela Maria de Moura Silva. - 2023.
102 f. : il.

Orientador: Rodrigo Barbosa Acioli de Oliveira.
Coorientador: Adriano Gomes da Cruz.
Inclui referências, apêndice(s) e anexo(s).

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Recife, 2023.

1. Micotoxina. 2. Boas práticas agropecuárias. 3. Queijo coalho. 4. Queijo mussarela. I. Oliveira, Rodrigo Barbosa Acioli de, orient. II. Cruz, Adriano Gomes da, coorient. III. Título

CDD 664

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO CONSUMO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

AFLATOXINAS M1 EM QUEIJOS ARTESANAIS (INFORMAIS) E INDUSTRIALIZADOS PRODUZIDOS NO ESTADO DE PERNAMBUCO

Por Isabela Maria de Moura Silva

Esta dissertação foi defendida para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em ___/___/___ pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos em sua forma final.

Banca Examinadora:

_____

Prof. Dr. Rodrigo Barbosa Acioli de Oliveira

Orientador (Presidente da banca)

_____

Profª. Drª. Tatiana Souza Porto - membro interno

PGCTA/Universidade Federal Rural de Pernambuco

_____

Profª. Drª. Aurenice Furtado Soares Pontes - membro externo

Universidade Federal da Paraíba

Com muita gratidão, dedico este trabalho aos amores da minha vida: minha mãe Cilene, meu esposo Thiago, minha avó Dite e meu vovô Manoel (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me mostrar esse caminho, muitas vezes árduo, cheio de pedras e turbulências, porém, nada comparado ao prazer que sinto em saber que posso mudar vidas e realidades a partir do que estudo e pesquiso. Obrigada espíritos amigos e mentores espirituais, vocês me dão forças para seguir!

A minha família, por vibrar comigo a cada conquista, pelo acolhimento e amor por mim. Faço tudo por vocês! Obrigada Mainha, por nunca duvidar da minha capacidade, força e nunca soltar minha mão. Seu companheirismo e incentivo me fizeram ir além do que imaginava. A senhora é minha inspiração enquanto professora. Obrigada meu amor Thiago, você é o melhor companheiro que alguém pode ter na vida. Sem você eu não conseguiria! Você foi essencial nessa fase da minha vida, sempre compreendendo todas as minhas fragilidades, renúncias e distância. Dite, nem sei o que falar da srª... sempre positiva! “Você consegue!” “Eu acredito em você!” “Seu avô estaria muito orgulhoso de você!” Essas eram frases ditas a mim sempre que comentava sobre algum momento difícil, né querida?!

Aos meus amigos antigos e conquistados durante o mestrado, obrigada pelo acolhimento e ajuda.

Gratidão ao meu orientador Prof. Rodrigo Acioli, pela ajuda, incentivo e conselhos. Você me mostrou que eu sou capaz! Você é especial para mim, muito obrigada!

Ao professor Adriano Cruz, pelo possibilitar que eu realizasse meu sonho de conhecer, estudar e fazer minhas análises na USP e por todo auxílio.

Obrigada aos estagiários, mestrandos, doutorandos, pós-doutorando, técnica e professores que fazem parte do Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos da Faculdade de Zootecnia e Engenharia dos Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo (USP). Obrigada pelo acolhimento, ajuda e dedicação!

Por fim, agradeço a Universidade Federal Rural de Pernambuco e a CAPES não só pelo incentivo financeiro, mas por toda dedicação a pesquisa.

Encerro com a frase da minha vida: "vida tem mil motivos para sorrir"

Viva a ciência! Viva a educação pública! Viva a pesquisa!

“Tô saindo pra batalha
Pelo pão de cada dia
A fé que trago no peito
É a minha garantia

Deus me livre das maldades
Me guarde onde quer que eu vá
Tô fazendo a minha parte
Um dia eu chego lá

Todo mês eu recebo um salário covarde
No desconto vai quase a metade
E o que sobra mal dá pra comer
Eu sou pobre, criado em comunidade
Lutando com dignidade, tentando sobreviver

Quem sabe o que quer nunca perde a esperança, não
Por mais que a bonança demore a chegar
A dificuldade também nos ensina
A dar a volta por cima e jamais deixar de sonhar”

Compositores: Gilson Bernini De Souza e Flavio da Silva Gonçalves
Interpretação: Diogo Nogueira

RESUMO

O consumo de leite e seus derivados contaminados com aflatoxinas pode representar risco a saúde humana. Dessa forma, foram realizados vários estudos para quantificar os níveis de aflatoxinas nesses produtos em várias Regiões do Brasil. Em virtude disso, não há nenhuma pesquisa voltada para avaliar os níveis de aflatoxinas em queijos produzidos em Pernambuco. Além disso, entender a percepção dos produtores sobre a presença de aflatoxinas e as práticas utilizadas por eles na cadeia produtiva do queijo pode ajudar a produzir alimentos seguros. Diante disso, o objetivo da presente pesquisa foi determinar os níveis e incidência de aflatoxinas M1 (AFM1) nos queijos coalho e mussarela produzidos no Estado de Pernambuco e analisar a percepção dos produtores quanto as boas práticas agropecuárias e aflatoxinas. Foram analisados queijos coalho e mussarela (n=28) produzido de forma industrializada e informal, comercializados em várias cidades do Estado de Pernambuco. A análise de aflatoxina M1 foi realizada através de um método previamente validado internamente utilizando Cromatografia Liquida de Alta Eficiência (HPLC) e coluna de imunoafinidade. Adicionalmente, a percepção dos produtores de leite e queijo quanto as boas práticas agropecuárias e aflatoxinas foi investigada através de um questionário semiestruturado no qual o respondente expressou o grau de concordância com as afirmativas de acordo com a escala *Likert* de cinco pontos. Foi observado que todas as amostras analisadas estavam contaminadas por AFM1, apresentando concentrações de 0,026 a 0,132µg/kg, com os maiores níveis encontrados no queijo mussarela informal. Porém, nenhuma amostra excedeu os limites máximos estabelecidos pela legislação brasileira (2,5µg/Kg). No que diz respeito à percepção, foi observado que a resposta mais frequente quanto ao grau de concordância entre os produtores foi “não concordo, nem discordo”, demonstrando notório desconhecimento dos entrevistados em relação às Boas Práticas Agrícolas e Aflatoxinas, podendo refletir na segurança e quantidade dessas micotoxinas nos seus produtos. Portanto, esses dados indicam a necessidade de capacitação constante dos produtores, além de melhorar as condições da matéria prima utilizada na produção queijos e monitoramento constante dos níveis de aflatoxinas nesses alimentos.

PALAVRAS-CHAVES: Micotoxina. Boas Práticas Agropecuárias. Queijo coalho. Queijo mussarela.

AFLATOXINS M1 IN ARTISAN (INFORMAL) AND INDUSTRIALIZED CHEESES PRODUCED IN THE STATE OF PERNAMBUCO

Abstract:

The consumption of milk and its derivatives contaminated with aflatoxins may pose a risk to human health. Thus, several studies were carried out to quantify the levels of aflatoxins in these products in various regions of Brazil. However, there is no research aimed at evaluating the levels of aflatoxins in cheeses produced in Pernambuco. In addition, understanding the perception of producers about the presence of aflatoxins and the practices used by them in the cheese production chain can help to produce safe foods. Therefore, the objective of this research was to determine the levels and incidence of aflatoxins M1 in coalho and mozzarella cheeses produced in the State of Pernambuco and to analyze the perception of producers regarding good agricultural practices and aflatoxins. Coalho and mozzarella cheeses (n=28) produced in industrialized and informal way, sold in several cities in the State of Pernambuco, were analyzed. Aflatoxin M1 analysis was performed using a method previously validated internally using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and immunoaffinity column. Additionally, the perception of milk and cheese producers regarding good agricultural practices and aflatoxins was investigated through a semi-structured questionnaire in which the respondent expressed the degree of agreement with the statements according to the five-point Likert scale. It was observed that all analyzed samples were contaminated by AFM1, with concentrations from 0.026 to 0.132µg/kg, with the highest levels found in informal mozzarella cheese. However, none of the samples exceeded the maximum limits established by Brazilian legislation (2.5µg/Kg). Regarding perception, it was observed that the most frequent response regarding the degree of agreement between the producers was “I neither agree nor disagree”, demonstrating a notorious lack of knowledge of the interviewees in relation to Good Agricultural Practices and Aflatoxins, which may reflect on the safety and amount of these mycotoxins in their products. Therefore, these data indicate the need for constant training of producers, in addition to improving the conditions of the raw material used in cheese production and constant monitoring of the levels of aflatoxins in these foods.

KEY WORDS: Mycotoxin. Good Agricultural Practices. Coalho cheese. Mozzarella cheese.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma de processamento do Queijo Coalho produzido em Pernambuco, bem como etapa associada ao queijo coalho produzido na região do Sertão do Araripe do Estado.....21

Figura 2: Etapas de processamento do queijo mussarela.....22

Figura 3: Etapas do processamento de queijo mussarela produzido na cidade de Granito, Sertão do Araripe de Pernambuco, Brasil, 2022.....23

Artigo 1 **- Incidence and levels of aflatoxin M1 in artisanal and manufactured cheese in Pernambuco State, Brazil**

Figure 1: Box plots representing statistical comparison of AFM1 level in artisanal mozzarella (AM, n = 7), manufactured mozzarella (MM, n = 7), artisanal coalho (AC, n = 7) and manufactured coalho (MC, n = 7) cheeses. The black line inside each box, representes median.....38

LISTA DE TABELAS

Artigo 1 - Incidence and levels of aflatoxin M1 in artisanal and manufactured cheese in Pernambuco State, Brazil

Table 1: Incidence and level of aflatoxin M1 (AFM1) in cheese manufactured in Pernambuco, Brazil.....37

Table 2: Incidence and level of aflatoxin M1 (AFM1) in different types of cheese manufactured globally.....39

Artigo 2 - Percepção dos produtores de leiteiros sobre a importância das boas práticas agropecuárias na prevenção de aflatoxinas durante a produção de queijo

Tabela 1: Características sociodemográficas dos respondentes.....51

Tabela 2: Pontuações médias de respostas a frases sobre as percepções dos produtores de leite e queijo relacionadas como as Boas Práticas Agrícolas podem prevenir aflatoxinas na produção de queijo.....53

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

ng	Nanograma
µg	Micrograma
µm	Micrometro
AFB_1	Aflatoxina B1
AFB_2	Aflatoxina B2
AFG_1	Aflatoxina G1
AFG_2	Aflatoxina G2
AFM_1	Aflatoxina M1
AFM_2	Aflatoxina M2
AFs	Aflatoxinas
BPA	Boas Práticas Agropecuárias
BPF	Boas Práticas de Fabricação
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
UE	União Europeia
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
IDF	*International Dairy Federation*
IPA	Instituto Agronômico de Pernambuco
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
nm	Nanômetro
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
RTIQQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos
UAT	Ultra Alta Temperatura
USA	Estados Unidos da América
PNR	Prefiro não responder
AF	Análise fatorial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
2 PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE 15
2.1 Problema de pesquisa 15
2.2 Hipótese 15
3 OBJETIVOS 16
4 REVISÃO DA LITERATURA 17
4.1 Queijos 17
4.2 Aflatoxinas 24
4.3 Boas práticas agropecuárias 27
5 MATERIAL E MÉTODOS 31
5.1 Obtenção dos queijos 31
5.2 Determinação de aflatoxinas M1 em queijos 31
5.3 Análise estatística das concentrações de AFM1 32
5.4 Área de estudo da percepção de produtores 32
5.5 Participantes da entrevista 33
5.6 Estruturação do questionário 33
5.7 Obtenção dos dados para análise da percepção dos produtores de leite e queijo sobre as BPA e aflatoxinas 34
5.8 Análise estatística dos dados de percepção 34
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 35
Artigo 1 - Incidence and levels of aflatoxin M1 in artisanal and manufactured cheese in Pernambuco State, Brazil 36
Artigo 2 - Percepção dos produtores leiteiros sobre a importância das boas práticas agropecuárias na prevenção de aflatoxinas durante a produção de queijo 47
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS 62
REFERÊNCIAS 63

1 INTRODUÇÃO

O consumo do leite e seus derivados contaminados por aflatoxinas pode representar um grande risco para a saúde pública devido ao elevado potencial carcinogênico, teratogênico e mutagênico dessas micotoxinas (CLAEYS *et al.*, 2020). As aflatoxinas são metabolitos tóxicos produzidos por fungos do gênero *Aspergillus* que podem prejudicar tanto a saúde humana quanto a animal, por isso, sua presença nos alimentos deve ser monitorada *(*AYENI *et al*., 2021).

A princípio as aflatoxinas B1 crescem em culturas de cereais como milho, trigo, sorgo, grãos, rações, assim como em silagens de milho e trigo e feno de gramíneas que são alimentos amplamente utilizados na dieta dos rebanhos leiteiros e de forma indireta passam para os produtos lácteos (GONÇALVES *et al*., 2020; MAGNOLI; POLONI; CAVAGLIERI, 2019). Entretanto, de forma geral no Nordeste brasileiro, a alimentação dos rebanhos leiteiros é baseada no uso de pastagens, utilizando forrageiras cultivadas e vegetação nativa, principalmente da caatinga, além da utilização da palma forrageira (*Opuntia ficus indica*-Mill) (FERREIRA e URBANO, 2013). Por isso, é mais provável que os níveis de contaminação de aflatoxinas em produtos lácteos produzidos no Nordeste sejam menores quando comparados a outras regiões do Brasil.

De modo geral, o consumo de alimentos contaminados por aflatoxinas pelas vacas leiteiras pode levar a redução da produção e qualidade do leite e consequentes perdas econômicas (XU *et al*., 2021). Inicialmente, a aflatoxina B1 ingerida é parcialmente metabolizada no lúmen intestinal das vacas leiteiras, enquanto outra fração vai sofrer biotransformação hepática e ser eliminada no leite na forma de aflatoxina M1 (AGRIOPOULOU STAMATELOPOULOU; VARZAKAS, 2020; ENESPA e CHANDRA, 2021). Posteriormente, durante o processamento do leite para obtenção do queijo há aumento da concentração das aflatoxinas M1 devido a grande afinidade dessa substância pela caseína, que mesmo após as várias etapas de elaboração de queijos permanecem retidas (KAUR *et al*., 2021). Além disso, as aflatoxinas são altamente resistentes aos tratamentos térmicos convencionais aplicados na indústria de alimentos, incluindo procedimentos de pasteurização e esterilização (CARVAJAL-MORENO *et al*., 2019). Por isso, o consumo de leite e seus derivados representa uma das principais vias de exposição humana às aflatoxinas (JIANG *et al*., 2021).

Em virtude dos problemas enfrentados pela contaminação por aflatoxinas, várias estratégias já foram elaboradas e avaliadas no intuito de eliminar, inativar e/ou reduzir o

impacto dessas substâncias na economia e na saúde pública (JIANG *et al.,* 2021). Segundo GONÇALVES *et al* (2020) atualmente nenhum método aplicado durante o processamento do queijo é capaz de eliminar as aflatoxinas. Contudo, alguns autores relatam que a prevenção e limitação das aflatoxinas por meio da adoção das Boas Práticas Agropecuárias (BPA) é um dos métodos mais eficazes diante da tecnologia e conhecimento científico atual (JIANG *et al*., 2021; MAGNOLI; POLONI; CAVAGLIERI, 2019; OLIVEIRA e CORRASIM, 2014).

Adicionalmente, outros autores evidenciam que a adoção das boas práticas agropecuárias deve ser voltada ao manejo adequado da alimentação do rebanho, iniciando no campo com foco no cultivo e colheita de cereais e grãos, além de cuidados no processamento, distribuição e armazenamento de ração para vacas leiteiras, incluindo o controle de temperatura, umidade e pragas (OWUSU-KWARTENG *et al.*, 2020; FAO e IDF, 2013).

Todavia, a adoção das BPA esbarra na falta de conhecimento dos produtores sobre o tema e na percepção de que sua aplicação não tem efeito na qualidade do produto final (DERETI *et al.*, 2019). Logo, Paraffin; Zindove; Chimonyo (2018) relatam que compreender a percepção dos produtores rurais sobre a presença de aflatoxinas nos produtos lácteos pode contribuir para produção de alimentos seguros. Portanto, o objetivo da presente pesquisa foi determinar os níveis e incidência de aflatoxinas M1 nos queijos coalho e mussarela produzidos no Estado de Pernambuco de forma artesanal e industrializada e analisar a percepção dos produtores quanto ao conhecimento sobre as boas práticas agropecuárias e aflatoxinas.

2 PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE

2.1 Problema de pesquisa

É sabido que a presença de aflatoxinas em alimentos é um problema de saúde pública mundial. Dessa forma, vários países regulamentam seus níveis, dentre eles o Brasil. Sendo assim, já foram realizados vários estudos para quantificar os níveis de aflatoxinas em diversos alimentos produzidos em diversas Regiões do país. Entretanto, não há nenhuma pesquisa voltada para mensurar a incidência e os níveis de aflatoxinas em queijos coalho e mussarela produzidos em Pernambuco. Também não existem estudos que revelem a percepção dos produtores de leite e queijo quanto às boas práticas agropecuárias e aflatoxinas, o que poderia influenciar nos níveis de contaminação desses produtos.

2.2 Hipótese

Tendo em vista que no Nordeste brasileiro é comum o uso da pastagem como alimento para o rebanho leiteiro, supõe-se que a incidência e os níveis de contaminação por aflatoxinas nos queijos são menores nessa localidade quando comparado a regiões que fornecem alimentos volumosos e concentrados como silagens de milho, trigo, sorgo, entre outros. Além disso, a percepção que os produtores têm sobre as boas práticas agropecuárias e aflatoxinas que pode influenciar nas atitudes tomadas durante toda a cadeia produtiva do queijo.

3 OBJETIVOS

Geral

Avaliar os níveis de Aflatoxina M1 em queijos artesanais (informais) e industrializados produzidos em Pernambuco, bem como a percepção dos produtores de leite e queijos.

Específicos

- Determinar a incidência de aflatoxina M1 em queijos produzidos no Estado de Pernambuco.
- Quantificar os teores de aflatoxina M1 nos queijos coalho e mussarela produzido de forma artesanal e industrializado.
- Analisar a percepção de produtores de leite e queijo quanto a importância e conhecimento sobre as Boas Práticas Agropecuárias e aflatoxinas.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Queijos

O mercado de leite e produtos lácteos tem sido um dos setores alimentícios mais dinâmicos, onde a produção, o consumo e o comércio continuam em ascensão. Segundo a FAO e OECD (2021) a produção mundial de leite (aproximadamente 81% de leite de vaca, 15% de leite de búfala e 4% para leite de cabra, ovelha e camelo combinados) aumentou 1,1% em 2021 e em 2022 estava prevista uma produção em cerca de 930 milhões de toneladas, um aumento de 0,6% em relação a 2021. Por sua vez, o queijo é o segundo produto lácteo mais importante e consumido depois dos produtos lácteos frescos. O seu consumo ocorre principalmente na Europa e América do Norte, apresentando uma tendência crescente em ambas as regiões. Dentre os países de maior destaque, o EUA é o maior produtor e consumidor de queijo do mundo, seguido da França e Alemanha (FAO e OECD, 2021).

No Brasil, cerca de 11 bilhões de litros de leite são processados em queijo de forma legalizada, em contrapartida, cerca de 6 bilhões de litros informais são utilizados para produção de queijo (SILVA, 2021). Sendo assim, uma característica do mercado de queijos no Brasil é a presença de muitos laticínios regionais, pequenos e micro laticínios operando fora do âmbito do Serviço de Inspeção. A predominância desses pequenos produtores dificulta a obtenção de informações oficiais sobre a produção total de queijos do Brasil, pois não há registros oficiais do que é produzido por essas queijarias. Segundo projeções de especialistas do setor e da Associação Brasileira da Indústria de Queijos (ABIQ), 40% do total da produção de queijos no Brasil é do mercado informal (SILVA, 2021).

Inquestionavelmente a produção de queijo artesanal no Brasil se espalhou por todo o seu território, representando o modo de vida de famílias de pequenos produtores rurais e as culturas locais e regionais (MARTINS, 2018). Dentre os Estados com destaque na produção de queijos, Minas Gerais é o maior produtor no Brasil, além de ter sido o primeiro a desenvolver uma legislação própria voltada para produção artesanal de queijos utilizando leite cru (ARAÚJO *et al*., 2020).

De forma geral, os queijos artesanais são caracterizados pela produção em pequena escala, utilizando leite cru, seguindo métodos tradicionais, produzidos de forma rudimentar e, muitas vezes, à margem da legislação vigente, consequentemente, não

são submetidos a inspeção pelos órgãos reguladores, além de serem fabricados sem controle de qualidade, sendo comercializados, na maioria das vezes, de maneira informal (AMARAL *et al.*, 2020).

Adicionalmente, o processo de fabricação de queijos artesanais faz parte de uma tradição secular, que é passada de geração em geração e possui grande importância econômica principalmente para os pequenos agricultores visto que são produzidos, em sua maioria, em pequena escala. Além disso, esse modo de produção, muitas vezes empírico, pode levar a padrões de qualidade distintos em uma mesma região de produção (PELEGRINO *et al*., 2020; CIRNE; TUNICK; TROUT, 2019; KAMIMURA *et al*., 2019). Os queijos artesanais produzidos no Brasil apresentam características bem diversas, sendo produzido com leite de diferentes espécies animais, como bovinos, ovinos, bubalinos e caprinos, sendo o leite bovino o mais utilizado no país. Além disso, variam no processamento, maturação, cor, formato, textura, umidade e sabor (CHAVES *et al.,* 2021; SILVA *et al.*, 2021).

Segundo SILVA *et al* (2021) a produção artesanal de alimentos é o oposto dos modelos modernos de processamento de matérias-primas que focam na industrialização e homogeneização extensiva, produzindo alimentos em grandes quantidades, com um trabalho baseado no cumprimento de metas e regulamentos que garantem que a produção de alimentos atenda aos padrões mundiais. Dessa forma, os queijos industrializados, em sua maioria, são produzidos com leite pasteurizado, sendo processados e amadurecidos em larga escala, possuindo textura própria e grande estabilidade (NACEF *et al.*, 2019; CRUZ *et al*., 2017).

Geralmente, as etapas envolvidas na fabricação do queijo são: acidificação, coagulação, retirada do soro, enformagem e salga. A acidificação é a primeira etapa do processo, que promove grandes modificações físico-químicas no leite, e resulta na redução do pH promovendo a proteólise. Na etapa seguinte, a quebra das micelas de caseína com liberação do soro ocasiona a coagulação proteica, formando um gel de coalhada que retém proteína, gordura, lactose, água, além de bactérias ácido lácticas. Por sua vez, o processo de retirada do soro ocorre quando o gel da coalhada é cortado ou quebrado, sendo possível controlar o teor de umidade da massa, assim como o grau de maturação e estabilidade do queijo. No processo de enformagem, a massa é colocada em formas para que ocorra a drenagem do soro e se forme uma massa contínua e homogênea. Finalmente, na etapa de salga, ocorre a adição do cloreto de sódio que

desempenha importantes funções como o controle do desenvolvimento microbiano, sabor, entre outros processos de regulação físico-químicos e bioquímicos (CRUZ *et al.*, 2017; PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009).

Entretanto, durante a fabricação dos queijos, podem existir diferenças que vão refletir nas suas características, como o tipo de leite utilizado (bovino, caprino, bufalino ou ovino), diferenças entre raças de gado, mudanças nas técnicas de fabricação, local onde é fabricado, formato, tamanho, adição de aromatizante ou corante, entre outros (FOX; COGAN; GUINEE, 2017; CRUZ *et al.*, 2017).

Por sua vez, o queijo coalho é um produto cuja tecnologia empregada na fabricação é relativamente simples e não requer equipamentos complexos. Entretanto, embora seja produzido há mais de 100 anos, o seu processo de fabricação não é padronizado, levando a diferenças nos aspectos físico-químicos, tecnológicos e propriedades sensoriais (SOARES *et al.,* 2017). Essa diversidade dos métodos de fabricação do queijo de coalho pode ser observada na produção de diversos fabricantes, nas diferentes regiões dentro de um Estado e em diferentes Estados. Consequentemente, devido à falta de padrões de qualidade das matérias-primas e técnicas de processamento, produtos de baixa qualidade do ponto de vista higiênico entram no mercado (SOARES *et al.,* 2017).

Em uma descrição mais ampla, segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho, o queijo coalho é um produto obtido pela coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, podendo ser complementada pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 dias de fabricação. Além disso, esse queijo deve apresentar de média a alta umidade e um teor de gordura em matéria seca variando de 35,0% a 60,0% (BRASIL, 2001). Além disso, SILVA *et al* (2016) e KAMIMURA *et al* (2019) relatam que as principais caracteristicas do queijo coalho são consistência elástica, textura compacta e macia, cor branco-amarelo uniforme, podendo apresentar algumas olhaduras e uma fina crosta, além de apresentar um sabor levemente salgado e odor levemente ácido.

Historicamente, o queijo coalho é um lácteo típico do Nordeste brasileiro, que foi trazido pelos Europeus há mais de 150 anos, no século XIX, tornando-se, desde então, um elemento de identidade cultural da região Nordeste (KAMIMURA *et al.*, 2019). Desde então, a produção desses queijos possui grande importância socioeconômica, sendo a principal fonte de renda para pequenos produtores de leite e queijo da Região Nordeste,

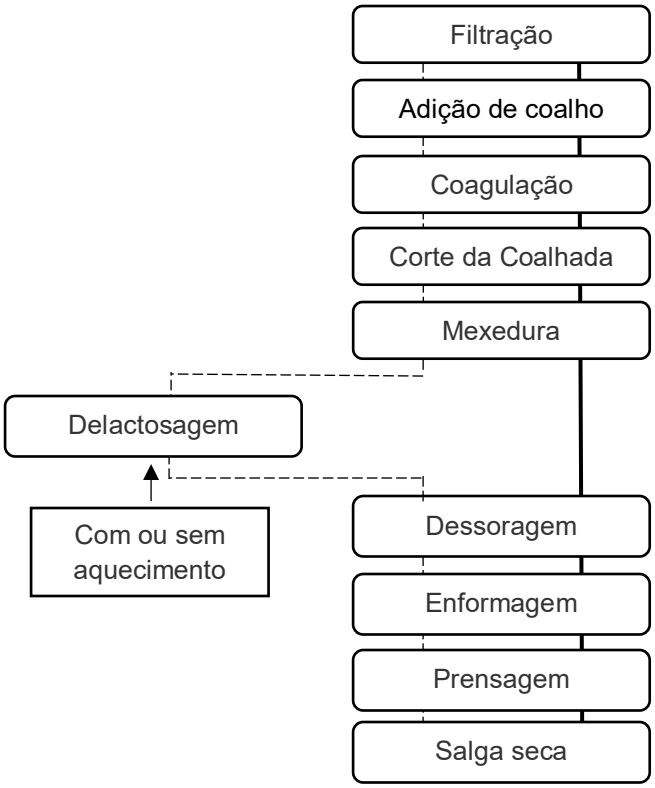
sendo produzido e consumido principalmente nos Estados de Pernambuco, Paraíba, Ceará e Rio Grande do Norte (KAMIMURA *et al*., 2019; QUEIROGA *et al*., 2013). Porém, nos últimos anos, o consumo do queijo coalho tem crescido em outras regiões do Brasil, seja na forma *in natura*, assado ou frito como também utilizado em preparações culinárias (SILVA *et al*., 2012).

Em Pernambuco, cerca de 100 toneladas de queijos são produzidas diariamente, sendo 70% queijo de coalho (IPA, 2020). O queijo coalho pernambucano é produzido com leite cru integral fresco de bovinos, bufalinos, caprinos ou ovinos, beneficiado na propriedade de origem ou em um grupo de propriedades de mesmo nível higiênico sanitário, seguindo o processo de fabricação tradicional e produzido em queijarias artesanais de pequeno porte, estabelecimento agroindustrial rural de pequeno porte ou pequena fábrica de laticínios (PERNAMBUCO, 2018).

O Estado, através da lei nº 13.376, de 20 de dezembro de 2007, determinou o processo de produção do queijo coalho artesanal (Figura 1). Portanto, essa legislação foi alterada (Lei Estadual nº 17.673 de 2022) onde foi adicionado e reconhecido o processo produtivo do queijo coalho artesanal do Araripe, além de estabelecer a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que deve ser cumprido na produção desse queijo típico da Região do Araripe do Estado de Pernambuco (PERNAMBUCO, 2008; PERNAMBUCO, 2022).

A técnica de processamento do queijo coalho do Araripe difere do queijo coalho produzido em outras regiões do Estado, principalmente por ser pré-cozido com água ou o próprio soro retirado da coalhada (delactosagem) (Figura 1). Esse modo de produção faz parte de um processo de fabricação centenário, peculiar do Sertão do Araripe, devido à ausência de refrigeração na época. Através deste processo, obtém-se um queijo de maior consistência, menos umidade e maior durabilidade, afetando diretamente o seu sabor e textura (ALEPE, 2021).

Figura 1: Fluxograma de processamento do Queijo Coalho produzido em Pernambuco, bem como etapa associada ao queijo coalho produzido na região do Sertão do Araripe do Estado

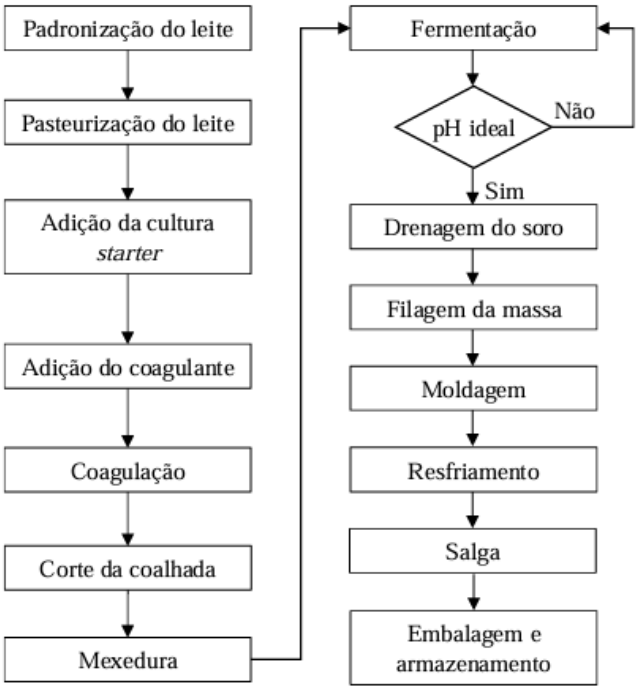


Fonte: elaborado pelo próprio autor (2023)[1]

Por sua vez, durante o processo de fabricação do queijo mussarela há diferenças consideráveis, como uso de leite pasteurizado e processo de filagem da massa, quando comparado a produção do queijo coalho. As etapas envolvidas na produção do queijo mussarela está descrito na Figura 2. De forma geral, o queijo mussarela é um derivado lácteo obtido da filagem de uma massa acidificada (obtida da coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes), podendo ser complementada pela ação de bactérias lácticas especificas. Além disso, esse queijo se enquadra como produto lácteo extra gordo, gordo ou semigordo e apresenta de média a muito alta umidade (BRASIL, 1997). Adicionalmente, algumas características do queijo mussarela como textura maleável, macia, fibrosa e fatiável, possibilita sua utilização no preparo de vários pratos, sendo muito utilizado para produção de *fast food* (MOREIRA, 2018).

[1]Linha tracejada: processamento do queijo coalho artesanal do Araripe; linha continua: processamento do queijo coalho artesanal.

Figura 2: Etapas de processamento do queijo mussarela



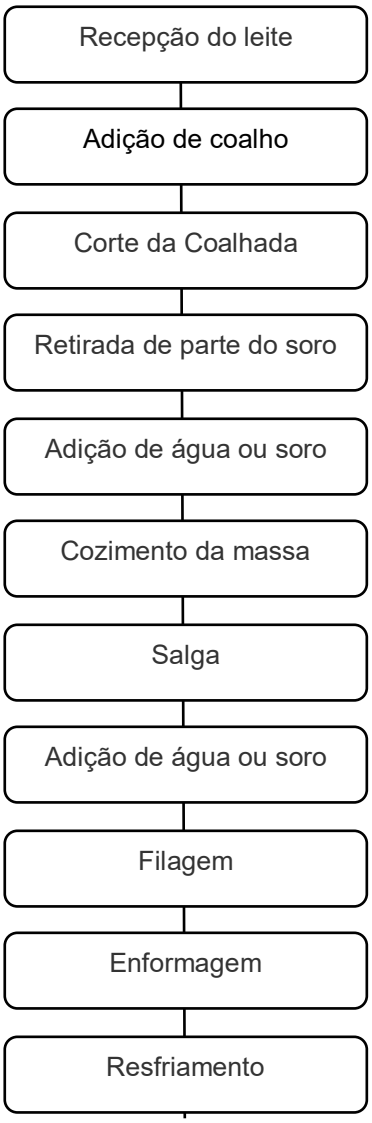
Fonte: SABIONI, 2018.

Primeiramente, a fabricação do queijo mussarela iniciou-se no século XVI no Sul da Itália onde, era produzido exclusivamente com o leite de búfala. Porém com a escassez desta matéria prima ocorreu-se a mistura com o leite de vaca e a partir de então, no Brasil é produzido exclusivamente com leite bovino (MOREIRA, 2018). Além do tipo de leite utilizado, os métodos de processamento do queijo mussarela podem variar muito entre as indústrias devido a uma série de fatores tais como ingredientes utilizados (cultura *starter*, cloreto de cálcio, tipo de coalhada), tecnologia disponível (sistemas automatizados, semiautomatizados ou manuais), produção diária, mão de obra profissional, qualidade do leite, entre outros (MOREIRA, 2018; SABIONI, 2018; MENDES *et al*., 2015).

Diante disso, no sertão do Araripe do Estado de Pernambuco, mais precisamente na Cidade de Granito, a produção de queijo mussarela é realizada de forma artesanal. Durante a nossa pesquisa, foi observado como esses produtores fabricavam seus queijos. De forma geral, o queijo mussarela produzido nesse local é fabricado por pequenos produtores, produzido sem padronização dos teores de gordura e umidade,

além de serem vendidos sem inspeção por órgãos fiscalizadores. As etapas envolvidas na fabricação do queijo mussarela artesanal produzido no Sertão do Araripe está descrita na figura 3.

Figura 3: Etapas do processamento de queijo mussarela produzido na cidade de Granito, Sertão do Araripe de Pernambuco, Brasil



Autor: elaborado pelo autor (2023).

Para produção do queijo mussarela artesanal do Sertão do Araripe, inicialmente é realizada a recepção do leite e realizado o teste de Estabilidade ao Alizarol (um indicador de acidez e estabilidade térmica do leite). Posteriormente, se o leite estiver dentro da normalidade, é adicionado o coalho e espera-se cerca de 30 minutos para o corte da coalhada. Após essa etapa, é retirado parte do soro e adicionado água ou soro fervente. A partir disso, vai haver cozimento da massa durante 1 a 2:30 horas e adição

de sal (cloreto de sódio). Passado esse tempo, adiciona-se novamente o soro ou água fervente e se inicia o processo de filagem da massa. Por fim, o queijo é colocado em formas e resfriado até a venda dos produtos.

Atualmente o mussarela tornou-se um dos queijos mais consumidos no mundo e o mais consumido no Brasil (MOREIRA, 2018). De acordo com o ZACARCHENCO; VAN DENDER; REGO (2020), o mussarela e o queijo Prato são os produtos mais populares entre os consumidores de baixa renda e representam cerca de 60% das vendas de queijos no Brasil, além disso, junto com o requeijão são responsáveis por 68,9% do volume total de queijos produzidos no País.

4.2 Aflatoxinas

Vários tipos de contaminantes (físicos, químicos e microbiológicos) podem afetar a produção de produtos lácteos, entretanto, as aflatoxinas merecem atenção especial devido à sua importância econômica e de saúde pública, podendo prejudicar tanto humanos como animais (CAMPAGNOLLO *et al*., 2016; SANTOS *et al.*, 2014). O consumo e presença de aflatoxinas em leite e seus derivados é uma preocupação mundial, pois essas micotoxinas apresentam efeitos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos, além desses produtos apresentarem alto consumo principalmente por populações mais vulneráveis como as crianças e idosos (CHAVARRIA *et al.*, 2015).

Em humanos, as aflatoxinas têm sido identificadas com fatores associados à etiologia do câncer de fígado, pulmão e gastrointestinais em humanos, além de doenças como a síndrome de Reye e a doença de Kwashiorkor, causado pela ingestão de alimentos contaminados e exposição ao pó de grãos contaminados (MARCHESE *et al*., 2018; OGODO e UGBOGU, 2016). Além disso, a exposição às aflatoxinas pode afetar diretamente o desempenho zootécnico de vários animais. Dentre eles, os ruminantes são geralmente mais resistentes aos efeitos adversos das aflatoxinas quando comparados a outras espécies (GONÇALVES *et al.*, 2020; MAGNOLI; POLONI; CAVAGLIERI, 2019). A exposição desses animais as aflatoxinas acontecem,a principalmente, através do consumo de rações contaminadas que pode levar ao desenvolvimento de problemas hepáticos, inibição do crescimento, supressão imunológica e, consequentemente, redução da produção e qualidade do leite, sendo as vacas leiteiras mais susceptíveis a esses problemas quando comparados a gados de

engorda (AGRIOPOULOU; STAMATELOPOULOU; VARZAKAS, 2020; ENESPA e CHANDRA, 2021; XIONG *et al.,* 2013).

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de fungos, destes o *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* são os mais frequentes e notórios (CAMPAGNOLLO *et al.*, 2016). Atualmente, pelo menos 20 tipos de aflatoxinas foram identificadas, porém as mais importantes do ponto de vista econômico, da saúde pública e da segurança alimentar, consideradas pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) como composto carcinogênico para humanos (Grupo 1) (OSTRY *et al*., 2017), são aquelas de ocorrência natural como a aflatoxina B1 (AFB1) e aflatoxina B1 (AFB2), aflatoxina G1 (AFG1) e aflatoxina G2 (AFG2). Além da aflatoxina M1 (AFM1), frequentemente encontrada em leite e queijos (KUMAR *et al*., 2017; CAMPAGNOLLO *et al*., 2016).

Os fungos do gênero *Aspergillus* são classificados como saprófitos devido ao seu papel na decomposição da matéria orgânica, que ajuda a fertilizar o solo. No entanto, também são considerados importantes fitopatógenos das culturas de cereais, e sua ocorrência e proliferação é estimulada pela presença de alta temperatura e umidade e tempo de armazenamento prolongado. Assim, tais microrganismos possuem grande potencial para produzir aflatoxinas como forma de defesa em espécies como A. *flavus* e A. *parasiticus* (KUMAR *et al*., 2017; CHAVARRIA *et al*., 2015; ABBAS *et al*., 2009).

Segundo a FAO, essa micotoxina contamina cerca de 25% das safras agrícolas em todo o mundo, afetando frequentemente plantações de cereais como milho, amendoim, trigo e sorgo (VALENCIA-QUITANA *et al.*, 2020). Consequentemente, a presença de aflatoxinas em produtos agropecuários como grãos, cereais e rações pode levar a perdas econômicas, uma vez que essa micotoxina ocasiona aumento dos custos de gerenciamento devido a sua alta toxicidade (AYENI *et al*., 2021; CLAEYS *et al.*, 2020; MAGNOLI; POLONI; CAVAGLIERI, 2019).

Geralmente, a ocorrência de contaminação por aflatoxinas em rações ocorre em milho, mileto, farelo de amendoim, farelo de arroz, sorgo, farelo de soja, palha/silagem e trigo/farelo (MIN *et al.*, 2021). Consequentemente, as AFs também podem ser encontradas em produtos lácteos através da contaminação indireta quando animais ingerem ração contaminada com AFB1 que irá passar para o leite como AFM1 (CAMPAGNOLLO *et al*., 2016). Segundo PEÑA-RODAS *et al* (2020) quando o gado se

alimenta com a ração contaminada, estima-se que cerca de 0,5 a 6,4% do conteúdo de AFB1 é biotransformado em AFM1.

Inicialmente, após o consumo de alimentos contaminados pelo rebanho, a aflatoxina B1 pode ser parcialmente metabolizada pela microbiota ruminal, e o restante atinge o intestino onde é rapidamente absorvido e transportado através da corrente sanguínea portal para o fígado para ser metabolizado pelas enzimas do Citocromo P450. Esse processo é complexo e envolve várias etapas como: redução, hidroxilação, desmetilação e epoxidação. Cada via de transformação da aflatoxina B1 leva a diferentes metabólitos: o processo de redução leva a formação do aflatoxicol (composto altamente tóxico); já através da epoxidação há formação de outra substância altamente tóxica (AFB1-8,9-epóxido) que sofre o processo de biodegradação e posteriormente se liga a macromoléculas de RNA, DNA e proteína, levando a efeitos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos. Por sua vez, o processo de hidroxilação produz efeitos altamente tóxicos e mais hidrossolúveis, possibilitando a excreção da AFM1 nos fluidos corporais como o leite, urina e fezes além da formação da aflatoxina Q1 (menos tóxica). Por fim, através da desmetilação há formação da aflatoxina P1 (menos tóxica) (MIN *et al*., 2021).

Posteriormente, durante a fabricação do queijo, a AFM1 é concentrada onde seus níveis podem variar de acordo com o método analítico usado, o tipo e o grau de contaminação do leite e tecnologia empregada na produção (MOUSAVI KHANEGHAH *et al*., 2021). Além disso, a concentração da aflatoxina nos queijos não é distribuída uniformemente entre o coalho e soro de leite, sendo o maior conteúdo encontrado na coalhada devido à baixa afinidade química das AFM1 pelas proteínas do soro do leite e alta afinidade pelas micelas de caseína (MOUSAVI KHANEGHAH *et al*., 2021). Consequentemente, mesmo após as várias etapas de elaboração de queijos, estas substâncias permanecem unidas (KAUR *et al*., 2021; CARVAJAL-MORENO *et al.*, 2019). Além disso, devido a sua estabilidade térmica a AFM1 não é afetada por procedimentos de rotina aplicados ao leite, como pasteurização, esterilização e Ultra Alta Temperatura (UAT), nem durante o procedimento de produção de queijo com condições ácidas. Portanto, o consumo de leite e seus derivados lácteos pode ser uma das principais vias de exposição do homem a AFM1 (MOUSAVI KHANEGHAH *et al*., 2021; CARVAJAL-MORENO *et al.*, 2019).

Em virtude disso, várias estratégias foram desenvolvidas e avaliadas para eliminar, inativar e/ou reduzir o impacto econômico e de saúde pública dessas substâncias. Segundo OLIVEIRA e CORRASSIM (2014) tem se utilizado alguns métodos físicos para tentar descontaminar aflatoxinas em alimentos, como inativação por calor, radiação UV e ionizante. Além disso, processos de separação mecânica ou extração com solventes também já foram avaliados, porém não foram observados resultados satisfatórios. Por outro lado, alguns métodos químicos, como a adição de agentes clorantes, agentes oxidantes ou agentes hidrolisantes, e processos biológicos utilizando fungos, bactérias e leveduras para processos de biodescontaminação têm sido testados sem sucesso efetivo.

De maneira geral, a acessibilidade, a facilidade de uso, além da não alteração das propriedades nutricionais e/ou tecnológicas do leite e produtos lácteos, devem ser consideradas ao se pensar em novos métodos para a remoção de aflatoxinas dos alimentos. Atualmente, não existem métodos físicos e químicos eficazes do ponto de vista da segurança, economia e manutenção da qualidade do produto (nutricional e organoléptica) que possam ser aplicados ao processamento de queijos. Quanto aos métodos biológicos para redução, prevenção ou eliminação de aflatoxinas, pouquíssimas pesquisas foram publicadas sobre o tema, sendo que nenhum dos trabalhos publicados testou o método descrito em queijos (GONÇALVES *et al.,* 2020). No entanto, vários autores relatam que a prevenção e limitação de aflatoxinas por meio da adoção de Boas Práticas Agropecuárias (BPA) é uma das abordagens mais eficazes diante do conhecimento técnico e científico atual (JIANG *et al*., 2021; MAGNOLI; POLONI; CAVAGLIERI, 2019; OLIVEIRA e CORRASIM, 2014).

4.3 Boas práticas agropecuárias

Os processos de implantação das boas práticas têm sido cada vez mais reconhecidos como um pré-requisito essencial para a segurança alimentar do campo ao prato. Por isso, a deficiência na implementação das boas práticas agropecuárias afeta a qualidade dos alimentos, podendo ocasionar contaminações por vários microrganismos e seus metabólitos, como as aflatoxinas, durante toda cadeia produtiva. Nessa perspectiva, alguns autores relatam que as boas práticas agropecuárias podem ser utilizadas como estratégia de gerenciamento da contaminação por aflatoxinas, consequentemente, reduzem os riscos à saúde do consumidor, assim como diminuem

os custos do produtor com descarte de alimentos que possam vir a ser contaminados por esses metabólitos (MAHATO *et al.*, 2019; CODEX ALIMENTARIUS, 2019; FEDDERN *et al.*, 2013; ATANDA *et al.*, 2013).

Segundo a FAO (2016) as Boas Práticas Agropecuárias (BPA) são um conjunto de princípios que devem ser aplicados nos processos de pré e pós-produção na fazenda, gerando alimentos seguros e saudáveis, considerando a sustentabilidade econômica, social e ambiental. Além disso, a Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018 define as boas práticas agropecuárias como:

> Conjunto de atividades, procedimentos e ações adotadas na propriedade rural com a finalidade de obter leite de qualidade e seguro ao consumidor e que englobam desde a organização da propriedade, suas instalações e equipamentos, bem como formação e capacitação dos responsáveis pelas tarefas cotidianas realizadas (BRASIL, 2018).

Sendo assim, essas práticas devem ser realizadas em toda a cadeia produtiva do leite e seus derivados, inicialmente no campo até a produção do produto final, visto que a contaminação dos lácteos por aflatoxinas é realizada de forma indireta através do consumo de cereais, grãos e rações contaminadas pelos animais (CAMPAGNOLLO *et al.*, 2016).

Nessa perspectiva, JIANG *et al* (2021) relatam que no campo, existem vários fatores de risco que predispõem as plantações à contaminação por aflatoxina, como injuria no grão, infestação de insetos, atraso na colheita, danos às plantações ocasionadas pela temperatura e clima. Para prevenir ou reduzir essa contaminação esses fatores de riscos devem ser minimizados através de ações como: rotação de cultura; tilagem e preparo da semente; cuidados na fase de pré-colheita, através de um programa integrado de pragas, controle das ervas daninhas e irrigação adequada. Além disso, na colheita deve-se observar o teor de umidade de grão, evitando colher aqueles que se apresentem com altos teores de umidade, como também deve se evitar os danos mecânicos aos grãos e o contato com o solo. Já na etapa de pós-colheita dos cereais e grãos, os cuidados devem ser tomados no seu transporte e armazenamento, além de atenção nos processos de lavagem, secagem e pós-armazenamento (CODEX ALIMENTARIUS, 2019).

Aliado a essas questões, após o processamento da matéria prima para produção da ração é importante que se adote as BPA com ações que previnam a contaminação por aflatoxinas no armazenamento desses alimentos, através de instalações adequadas,

controle de temperatura e umidade, inspeção e remoção de produtos mofados, separação da ração nova e antiga e controle do tempo de armazenamento (LEDO *et al.*, 2020).

Posteriormente, as boas práticas agropecuárias podem ser aplicadas a produção de leite e fabricação de queijos. Dessa forma, a aplicação das boas práticas agropecuárias ao leite tem a finalidade de produzir leite e produtos lácteos seguros, com qualidade e adequados para o uso a qual se destinam, além da ordenha por animais sadios, utilizando procedimentos sustentáveis sob a perspectiva do bem-estar animal, social, econômico e do ambiente (FAO e IDF, 2013).

No Brasil, através da Instrução Normativa nº 73, de 23 de dezembro de 2019 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2019) é estabelecido o Regulamento Técnico de Boas Práticas Agropecuárias destinadas aos produtores rurais fornecedores de leite para a fabricação de produtos lácteos artesanais. Essa normativa da ênfase ao aspecto sanitário dos rebanhos, além disso, as BPA também estão relacionadas à gestão da propriedade, à higiene pessoal, à saúde das famílias e colaboradores, ao bem-estar animal e à sustentabilidade ambiental.

Dessa forma, algumas medidas sanitárias ligadas às BPA em rebanhos produtores de queijo artesanal são: a prevenção da entrada de doenças na propriedade por meio de exames de animais adquiridos; estabelecimento de um programa efetivo de manejo sanitário no rebanho; utilização de produtos químicos e medicamentos veterinários conforme orientação técnica; garantia de que a rotina de ordenha não lesione os animais ou introduza contaminantes no leite, e de que seja realizada em condições higiênicas; e a manipulação adequada do leite e do queijo artesanal (CHAVES *et al.*, 2021; BRASIL, 2019; FAO e IDF, 2013).

Além disso, as BPA também devem assegurar que os animais estejam livres de sede e fome, desconforto, dor, injúrias, doenças, medo e apresente padrões normais de comportamento. Quanto aos trabalhadores, eles realizar periodicamente exames para avaliação da saúde, de forma a promover a redução de riscos biológicos oriundos de seres humanos, para os animais e/ou para o queijo artesanal. Adicionalmente, as BPA também podem auxiliar na gestão dos riscos sociais e econômicos dessas empresas rurais. Por fim, o manejo deve atender às exigências legais ambientais e expectativas dos consumidores em relação à sustentabilidade ambiental. Por isso, o produtor deve dispor de um sistema apropriado de tratamento de resíduos e procurar reduzir, reutilizar

ou reciclar os resíduos da propriedade e gerenciar o armazenamento e descarte destes para minimizar os impactos ambientais (CHAVES *et al.,* 2021; BRASIL, 2019; FAO e IDF, 2013).

Entretanto, a adoção das boas práticas agropecuárias pode esbarrar no nível de letramento dos produtores, na falta de clareza quanto ao que precisa ser feito para execução das transformações requerida pelos órgãos ou instituições, preço do leite e ausência de políticas de remuneração por qualidade, que tais práticas não são percebidas pelo produtor como fatores de melhora da sua própria condição de vida, além da ausência de diálogo entre a realidade da fazenda, da indústria e dos consumidores (DERETI, 2017). Além disso, o sucesso dos programas de Boas Práticas Agropecuárias esbarra na percepção dos produtores de que essas práticas têm pouco ou nenhum efeito no resultado final do sistema de produção e na qualidade do produto obtido e, como tal, não as incorporam adequadamente (DERETI *et al*., 2019).

É notório que os produtores e manipuladores exercem papéis cruciais na produção de alimentos seguros. Logo, PARAFFIN; ZINDOVE; CHIMONYO (2018) relatam que compreender a percepção dos produtores rurais sobre a qualidade e segurança nos produtos lácteos pode contribuir para produção de alimentos seguros e ajudar instituições formuladores de políticas e as partes interessadas na indústria de laticínios a implementar intervenções para uma produção de leite limpa, segura e lucrativa.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Obtenção dos queijos

Os queijos foram obtidos dos próprios produtores, supermercados, mercearias e mercadinho de várias cidades do Estado de Pernambuco, como Pedra, Sanharó, Venturosa, São Bento do Una, Gravatá, Bom conselho, Granito e Arcoverde. Foram analisadas 28 amostras, sendo 14 de queijo artesanal e 14 de queijo industrializado, tanto do tipo coalho quanto mussarela, produzido no Agreste e Sertão Pernambucano entre os meses de março a maio de 2022. Foram considerados queijos artesanais aqueles produzidos por pequenos produtores e vendidos sem Inspeção Sanitária. Por sua vez, os industrializados foram queijos fabricados por empresas de médio ou grande porte e que possuíam o selo de Inspeção Sanitária municipal, estadual e/ou federal. Foi coletado 500g de amostras, onde foram transportadas em caixas térmicas isolantes a 4ºC, moídas e mantidas congeladas a -18ºC até o dia das análises.

5.2 Determinação de aflatoxinas M1 em queijos

As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos da Faculdade de Zootecnia e Engenharia dos Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo (USP), campus Pirassununga. A determinação de AFM1 foi realizada pelo método proposto por JAGER *et al*. (2013), com pequenas modificações. Primeiramente, uma alíquota de queijo triturado (8g) foi pesada em tubo tipo falcon e adicionada de 2g de cloreto de sódio, 22ml de metanol e 13ml de água ultrapura. A mistura foi homogeneizada em um vórtex por 1 min, seguida de 10 minutos em mesa agitadora e finalmente centrifugada a 6000 rpm por 15 minutos. Em segundo lugar, os sobrenadantes foram filtrados através de um microfiltro de fibra de vidro (Macherey-Nagel, MN GF-1). Em seguida, 20 ml do extrato anterior foram diluídos em 30 ml de água ultrapura e centrifugados novamente, a 6000 rpm por 15 minutos.

Posteriormente, 50 ml do extrato foram passados por coluna de imunoafinidade (Aflatest, Vicam, Watertown, MA, USA) e a qual foi conectada a uma seringa e sistema a vácuo (fluxo de 2-3 ml/min^{-1}). A coluna foi lavada com

20 ml de água ultrapura e o AFM1 foi eluído com 1 ml de metanol (Dinâmica®, São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, o eluato foi evaporado à secura sob fluxo de nitrogênio e o extrato seco foi ressuspenso em 1 ml de metanol/água (50:50, v/v). Por fim, uma curva de calibração de cinco pontos foi preparada diluindo o padrão AFM1 (Sigma®, St Louis, MO, EUA) em acetonitrila a 2,5, 5, 10, 20, 40µg/ml.

A identificação e determinação de AFM1 nas amostras de queijo foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) no Shimadzu 10 VP (Kyoto, Japão) com detector de fluorescência 10 AXL (Excitação em 360nm e emissão acima de 440nm). Foi utilizada uma coluna Kinetex C18 (Phenomenex, Torrance, CA, EUA) 4,6 x 150 mm, tamanho de partícula de 2,6 µm e um filtro em linha de 0,5 µm. A fase móvel isocrática consistiu em metanol/água/acetonitrila (6,4:28,1:10,5, v/v/v) com vazão de 0,50 ml/min^{-1}.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados com base na relação sinal:ruído de 3:1 e 10:1, respectivamente. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) de AFM1 nas amostras de queijo foram 0,017 e 0,055µg/kg, respectivamente.

5.3 Análise estatística das concentrações de AFM1

Todas as leituras no HPLC foram realizadas em triplicata e o valor médio dos dados foi expresso na forma de média±desvio padrão. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e aplicação do teste Tukey ao nível de significância de 5% utilizando o software XLSTAT 2022. O nível de significância aceito foi $p<0,05$. Além disso, foram realizadas análises estatísticas descritivas, software Microsoft Excel e Ri386 4.0.5 para resumir os dados.

5.4 Área de estudo da percepção de produtores

O presente trabalho foi realizado no município de Granito, localizada na microrregião pernambucana do Araripe e se limita ao norte com Exú e Moreilândia, ao sul com Parnamirim, ao leste com Serrita e ao oeste com

Bodocó. Está a 600,1 km da capital do estado, Recife. Possui uma população de 7.566 pessoas, sendo que, em média, 54% residem no meio rural (IBGE, 2021).

Quanto ao aspecto econômico, Granito possue um PIB a preços correntes de 73.774,93 mil reais, sendo que 17.185,48 mil reais são provenientes da agropecuária (IBGE, 2020). A escolha desse município como área de estudo deste trabalho pode ser atribuída ao fato da principal atividade produtiva das famílias ser a pecuária extensiva para produção de leite e derivados, conforme informado pela Secretaria de Agricultura do referente município.

5.5 Participantes da entrevista

Foi aplicado um questionário á produtores de leite e queijo (n=26) residentes na cidade de Granito, localizada na região do Sertão do Araripe, Estado de Pernambuco. Os proprietários e/ou responsáveis pela produção do estabelecimento foram convidados para participar da pesquisa de forma voluntária. Foram incluídos aqueles produtores de leite bovino que destinam o produto para produção de queijos (queijo coalho e mussarela) e produtores de queijo coalho e/ou mussarela. Por sua vez, foram excluídos os produtores de leite caprino, ovino e bubalino; e que destinam seu leite para outras finalidades. A pesquisa foi submetida previamente a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, apresentando protocolo nº 5354.204/2022 CEP-UFRPE (Anexo A).

5.6 Estruturação do questionário

O questionário (Apêndice A) foi composto por questões semiabertas a respeito de dados sociodemográficas, produção da propriedade, conhecimento sobre aflatoxinas e boas práticas agropecuárias. Na primeira seção objetivou-se levantar características sociodemográficas como gênero, idade e escolaridade. Na segunda seção os produtores foram indagados sobre o tempo de atividade agropecuária, tipo de ordenha e/ou tipo de queijo produzido, produção diária, tipo de alimentação das vacas (caso fosse produtor de leite) e se possuía inspeção sanitária. Já a terceira seção teve como objetivo avaliar a percepção dos produtores em relação às Boas Práticas Agropecuárias (BPA) e Aflatoxinas (AF),

a mesma foi dividida em 6 partes (parte 1 - conhecimentos sobre boas práticas agropecuárias; parte 2 - conhecimentos sobre aflatoxinas; parte 3 - manejo sanitária e higienização; parte 4 - manejo alimentar, armazenamento de alimentos e qualidade da água; parte 5 - manejo da ordenha e pós- ordenha; parte 6 - saúde, hábitos e higiene pessoal dos trabalhadores).

5.7 Obtenção dos dados para análise da percepção dos produtores de leite e queijo sobre as BPA e aflatoxinas

A entrevista desenvolveu-se de forma presencial e semiestruturada nas propriedades particulares de cada entrevistado ou em locais pré-estabelecidos com os produtores. Como ponto de partida, foi entregue uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice B) para cada participante e após a leitura e concordância, iniciou-se as entrevistas. O respondente expressou o grau de concordância com as afirmações de acordo com a escala *Likert* de cinco pontos (1=discordo totalmente, 2=discordo parcialmente, 3= nem concordo nem discordo, 4=concordo parcialmente, 5=concordo totalmente).

5.8 Análise estatística dos dados de percepção

As respostas obtidas do questionário foram submetidas à Análise Hierárquica de Agrupamento (HCA) que foi utilizada para determinar os grupos de produtores com base nas similaridades de respostas do questionário; a partir disso, as médias obtidas para cada questão foram comparadas através do teste t independente. Além disso, os dados foram submetidos à Análise Fatorial (AF), onde a confiabilidade interna de cada fator foi avaliada por meio do alfa de *Cronbach*. Por fim, o valor resultante da pontuação para cada fator foi calculado pela respectiva média e desvio padrão. Todas as análises estatísticas foram processadas usando o software XLSTAT 2021.4 (Adinsoft, Paris, França).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão serão apresentados em formato de artigo. O artigo 1 foi publicado na revista *Toxins* e segue abaixo. Por sua vez, o artigo 2 está em processo de submissão para revista *Food Control*.

toxins

MDPI

Article

Incidence and Levels of Aflatoxin M_1 in Artisanal and Manufactured Cheese in Pernambuco State, Brazil

Isabela Maria de Moura Silva [1], Adriano Gomes da Cruz [2], Sher Ali [3], Lucas Gabriel Dionisio Freire [3], Luzianna Macedo Fonseca [4], Roice Eliana Rosim [3], Carlos Humberto Corassin [3], Rodrigo Barbosa Acioli de Oliveira [1,*] and Carlos Augusto Fernandes de Oliveira [3,*]

[1] Department of Consumer Science, Post-graduate program in Food Science and Technology, Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Pernambuco 52171-900, PE, Brazil
[2] Department of Foods, Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio de Janeiro (IFRJ), Rio de Janeiro 20270-021, RJ, Brazil
[3] Department of Food Engineering, Faculty of Animal Science and Food Engineering (FZEA), University of São Paulo (USP), Pirassununga 13635-900, SP, Brazil
[4] Department of Animal Husbandry, Luiz de Quiroz Higher School of Agriculture (ESALQ), University of São Paulo (USP), Piracicaba 13418-900, SP, Brazil
* Correspondence: rodrigo.aoliveira@ufrpe.br (R.B.A.d.O.); carlosaf@usp.br (C.A.F.d.O.); Tel.: +5519-3565-4173 (C.A.F.d.O.)

Abstract: Cheese is one of the most susceptible dairy foods to accumulating aflatoxins due to their high affinity to caseins. The consumption of cheese contaminated with high levels of aflatoxin M_1 (AFM_1) can be highly harmful to humans. The present work, based on high-performance liquid chromatography (HPLC), highlights the frequency and levels of AFM_1 in coalho and mozzarella cheese samples (n = 28) from the main cheese-processing plants in Araripe Sertão and Agreste in the state of Pernambuco, Brazil. Of the evaluated cheeses, 14 samples were artisanal cheeses and the remaining 14 were industrial (manufactured) cheeses. All samples (100%) had detectable levels of AFM_1, with concentrations ranging from 0.026 to 0.132 µg/kg. Higher levels ($p < 0.05$) of AFM_1 were observed in artisanal mozzarella cheeses, but none of the cheese samples exceed the maximum permissible limits (MPLs) of 2.5 µg/kg established for AFM_1 in cheese in Brazil and 0.25 µg/kg in the European countries by the European Union (EU). The high incidence of low levels of AFM_1 found in the evaluated cheeses underscores the need for stringent control measures to prevent this mycotoxin in milk used for cheese production in the study area, with the aim of protecting public health and reducing significant economic losses for producers.

Keywords: cheese; AFM_1; contamination; HPLC

Key Contribution: This is the first evaluation of the occurrence of AFM_1 in coalho and mozzarella cheeses from the Brazilian state of Pernambuco, and it indicates high frequencies of low levels of the mycotoxin in the evaluated products.

check for updates

Citation: Silva, I.M.d.M.; da Cruz, A.G.; Ali, S.; Freire, L.G.D.; Fonseca, L.M.; Rosim, R.E.; Corassin, C.H.; Oliveira, R.B.A.d.; Oliveira, C.A.F.d. Incidence and Levels of Aflatoxin M_1 in Artisanal and Manufactured Cheese in Pernambuco State, Brazil. *Toxins* **2023**, *15*, 182. https://doi.org/10.3390/toxins15030182

Received: 31 January 2023
Revised: 15 February 2023
Accepted: 24 February 2023
Published: 28 February 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Aflatoxins are mycotoxins produced as secondary metabolites by species of the fungal genus *Aspergillus*, mainly *A. flavus*, *A. parasiticus*, and *A. nomius*, during growth on food and feed products [1]. These fungi produce a range of toxic metabolites, but the main compounds produced under natural conditions are aflatoxins B_1 (AFB_1), G_1 (AFG_1), B_2 (AFB_2), and G_2 (AFG_2) [2,3]. All the aflatoxins are highly toxic to humans, causing various effects such as hepatotoxicity, mutagenicity, teratogenicity, immunosuppression, and carcinogenicity, among other effects [1–3]. When animals ingest feed contaminated with the most prominent and highest carcinogenic AFB_1, the compound is biochemically converted in the animal's liver into the hydroxylated aflatoxin M_1 (AFM_1), which is excreted in the

milk and other biological fluids [4]. The occurrence of AFM_1 in milk and milk-derived products is a major concern for public health, as the AFB_1 and AFM_1 metabolites were classified as group 1 (human carcinogens) by the International Agency for Research on Cancer (IARC) [5–8].

Aflatoxin M_1 (AFM_1) binds strongly to casein in milk, resulting in greater levels in dairy products that are high in protein, such as cheeses. Moreover, traditional processes used in milk product manufacture, such pasteurization or sterilization, do not destroy AFM_1 [9]. Previous reports have shown that AFM_1 levels are approximately 4 and 5 times higher in soft and hard cheeses, respectively [9,10]. Soft cheeses are habitually made by coagulating casein with acid, while hard cheeses are ripened after coagulation of the milk proteins with the rennet and culture acids. However, both types of cheeses can accumulate variable levels of AFM_1, depending on the moisture content of the product [11], as shown in previous studies of AFM_1 in cheeses from the states of São Paulo, Amazonas, and Santa Catarina in Brazil [11–13]. At present, there are no available details on AFM_1 level in cheeses from the state of Pernambuco, Brazilian.

The main factors affecting the AFM_1 frequencies and levels include variations in cheese manufacturing practices, changes in milk contamination, cheese ripening conditions, geographical and seasonal changes, and the analytical methods used [14]. Given the potential harm of AFM_1, Brazil has adopted regulatory limits for this mycotoxin, with maximum permissible limits (MPL) of 0.5 µg/L for fluid milk and 2.5 µg/kg for cheese [15]. The occurrence and levels of AFM_1 in milk products have been monitored [14] using several analytical methods, comprising the popular enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [16], high-performance liquid chromatography (HPLC) alone [17], and HPLC combined with tandem mass spectrometry (MS/MS) [18]. In this context, monitoring AFM_1 concentrations in milk and its derived products is an essential aspect of food safety efforts, aimed at protecting consumers' health protection [19]. The aim of the present study was to evaluate the occurrence and levels of AFM_1 in artisanal and industrial cheeses produced in the main dairy plants in the state of Pernambuco, Brazil.

2. Results

This study is the first to evaluate the incidence and levels of AFM_1 in different cheeses from the main production plants in the Araripe Sertão and Agreste regions of Pernambuco state in Brazil. The occurrence and levels of AFM_1 were determined by HPLC, as given in Table 1. The results display a high rate of AFM_1 occurrence in all analyzed cheese samples (100%, $n = 28$). In addition, the levels of AFM_1 were assessed, with artisanal mozzarella cheese (25%, $n = 7$) demonstrating levels ranging from 0.026 µg/kg to 0.093 µg/kg, and the manufactured mozzarella cheese (25%, $n = 7$) indicating levels ranging from 0.037 to 0.132 µg/kg. Similarly, artisanal coalho cheese (25%, $n = 7$) exhibited AFM_1 levels ranging from 0.035 µg/kg to 0.045 µg/kg, whereas the manufactured coalho cheese (25%, $n = 7$) revealed AFM_1 levels ranging from 0.035 µg/kg to 0.046 µg/kg. Throughout the analyzed cheese samples, the mean level of AFM_1 for 25% of the artisanal mozzarella cheeses ($n = 7$) was 0.07 ± 0.02 µg/kg, which was significantly higher ($p < 0.05$) than the remaining artisanal or manufactured coalho cheeses.

Table 1. Incidence and level of aflatoxin M_1 (AFM_1) in cheese manufactured in Pernambuco, Brazil.

Type of Cheese	Positive Samples		Level of AFM_1	
	n	%	Mean ± SD	Range (µg/kg) *
Artisanal mozzarella ($n = 7$)	7	100	0.07 ± 0.02^{a}	0.026–0.093
Manufactured mozzarella ($n = 7$)	7	100	$0.06 \pm 0.03^{a,b}$	0.037–0.132
Artisanal coalho ($n = 7$)	7	100	0.04 ± 0.003^{b}	0.035–0.045
Manufactured coalho ($n = 7$)	7	100	0.04 ± 0.004^{c}	0.035–0.046

[a,b,c] Means with different superscript letters differ significantly at $p < 0.05$. * Minimum and maximum levels of AFM_1 in cheeses. None of the analyzed samples had AFM_1 levels above the Brazilian maximum permissible limit (2.5 µg/kg) [20]. SD, standard deviation.

To support the results, the levels of AFM_1 in cheese samples were further assessed by distributing them into quartiles (Figure 1). In this analysis, the statistical comparison displayed that artisanal mozzarella cheese (AM) had a low concentration range of 0.026 µg/kg. An increased variability was found in the AFM_1 levels, which could be compared with the remaining analyzed cheeses. Overall, AFM_1 values for AM ranged from 0.0423 µg/kg to 0.0889 µg/kg, but some samples had concentrations below or above 0.0262 µg/kg and 0.0935 µg/kg, respectively. The median AFM_1 concentration in AM was 0.068 µg/kg.

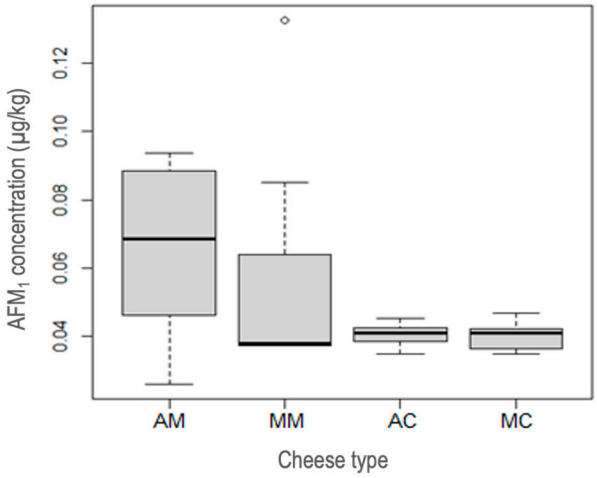


Figure 1. Box plots representing statistical comparison of AFM_1 level in artisanal mozzarella (AM, n = 7), manufactured mozzarella (MM, n = 7), artisanal coalho (AC, n = 7), and manufactured coalho (MC, n = 7) cheeses. The black line inside each box, represents median.

However, the manufactured mozzarella (MM) cheese revealed AFM_1 values ranging from 0.037 µg/kg, which is the minimum limit, to 0.132 µg/kg, which is the maximum limit. Furthermore, 75% of the MM samples had concentrations above 0.0373 µg/kg, and the median concentration was lower compared to the other groups, although there was overlap in quartile 1 with the lower limit.

The analysis of the artisanal coalho (AC) cheese represented AFM_1 levels at a minimum of 0.035 µg/kg and a maximum of 0.045 µg/kg, with a median of 0.04 µg/kg. In turn, the manufactured cheese (MC) revealed AFM_1 levels ranging from 0.035 µg/kg to 0.047 µg/kg, with a median of 0.041 µg/kg. However, the MC had greater variability in the data compared to the AC (Figure 1).

3. Discussion

This study, based on HPLC, evaluated the incidence and levels of AFM_1 in cheeses collected from production plants in Araripe Sertão and Agreste in the state of Pernambuco in Brazil (Table 1). The results demonstrated a high occurrence rate of AFM_1 in all analyzed cheese samples (100%, n = 28) with varying levels (Table 1). None of the analyzed cheeses had AFM_1 levels higher than the Brazilian MPL of 2.5 µg/kg [20] or the EU MPL of 0.25 µg/kg. In exception to the northeastern region, such as Pernambuco, the AFM_1 evaluation has been shown to be present in a large number of studies conducted in various regions and states of Brazil, as described. This study, for the first time, aimed to evaluate the occurrence and levels of AFM_1 in different types of cheeses produced in the northeastern region of Brazil. These results indicate that consuming cheeses in these regions may be potentially harmful, and proper care, evaluation, and strict quality control procedures are necessary. This is because fungi are toxic organisms that naturally cause contamination of foods and feeds. When present, these toxigenic fungi produce mycotoxins, such as AFB_1 and its hydroxylated AFM_1, in foods. The hydroxylated AFM_1 can transfer from one food (milk) to another food (e.g., cheeses) during fabrication, even under strict processing and handling procedures. When the resulting cheese products contain high levels of AFM_1,

they can pose a risk to human health. To reduce this risk exposure and increase awareness in the food industry, the occurrence and levels of AFM_1 are evaluated in various milk products, comprising different cheeses produced in Brazil.

Brazil is a major producer of cheese in the world, fabricating a wide variety of cheeses. According to the recent data reported by the Food and Agriculture Organization (FAO), around 59,543.14 tons of cheeses were produced in Brazil in 2020 [21]. The country is known for its diverse array of artisanal cheeses, many of which are considered national treasures [22]. Recently, public incentives for technological progress and commercial partnerships for cheese production have increased in Brazil [22]. This has led to growing concerns about the quality and reliability of cheese products. In the last few decades, many studies have been conducted to quantify and evaluate the occurrence level of AFM_1 in different types of cheeses produced in various regions of Brazil. The investigation of AFM_1 in this study is in line with previous data demonstrating the incidence of AFM_1 in different types of cheeses produced not only in Brazil, but also in other countries (Table 2).

Table 2. Incidence and level of aflatoxin M_1 (AFM_1) in different types of cheese manufactured globally.

Sampling Year	Cheese Type	Samples (*n*)	Positive *n* (%)	AFM_1 Level (μg/kg)	Ref.
1989–1990	Minas cheese mozzarella Cheddar	12 12 12	0 0 0	ND ND ND	[23]
1996–1998	Minas frescal Canastra Minas standard	7 18 50	4 (57.1) 11 (61.1) 41 (82)	0.03–0.18 0.02–1.70 0.02–6.92	[24]
2000–2001	Prato Parmesan ralado	9 14	9 (100) 13 (92.8)	0.02–0.54 0.04–0.30	[25]
2004	Parmesan	88	40 (45.4)	0.02–0.66	[26]
2008	Minas frescal Minas standard	24 24	6 (25) 7 (29.2)	0.142–0.118 0.118–0.054	[27]
2010	Minas frescal light Minas frescal Minas standard	20 30 8	39 (67.24)	0.01–0.304	[28]
2011	Parmesan ralado	30	18 (60)	50–690	[29]
2011–2012	NG	10	3 (30)	91–300	[30]
NG (Analysis year 2012)	Lebanese (Halloumi, Naboulsi, Feta, Baladi, Akkawi) and Imported white and yellow	111	75 (67.57)	0.00561–0.315	[31]
2014–2015	White cheese	25	10 (40)	0.00246–0.035	[32]
2015–2016	Lighvan, Koozeh, Siahmazgi, Khiki Talesh, and Lactic	360	194 (53.8)	0.0505–0.3087	[33]
2016	Oaxaca	30	17 (57)	1.7 (average)	[34]
2016–2017	Karish cheese	62 56	21 (39.9) 25 (44.6)	1.11–0.632 (mean)	[35]
2017	Coalho, Coalho buffalo, Mozzarella, Mozzarella buffalo, Minas frescal	25	NG	NG	[11]
2017–2018	Various	46	39 (85)	0.1977 (mean)	[36]
2018	Minas frescal	28	8 (28.6)	0.113–0.092	[12]
2018	Serrano artisanal	80	4 (5)	0.505 0.875 0.093 1.030	[13]

Table 2. *Cont.*

Sampling Year	Cheese Type	Samples (*n*)	Positive *n* (%)	AFM_1 Level (μg/kg)	Ref.
2019–2020	Different domestic and imported	60	42 (70)	> 0.025	[37]
2019–2020	Ethiopian Cottage cheese	82	82 (100)	5.58 ± 0.08	[38]
2022	Minas frescal	57	1 (1.7)	0.017–0.695	[17]

ND, not detected, NG, not given.

In accordance with Table 2, Syllos et al. [23] were the first to evaluate the occurrence and levels of AFM_1 in Minas cheese, mozzarella, and cheddar, which were sold in Campinas, São Paulo, Brazil. Unfortunately, their pioneering study did not distinguish AFM_1 in the tested cheese samples, as the evaluation was conducted using thin layer chromatography [23]. Further studies have reported a higher occurrence of AFM_1 in cheese products with varying levels. One of these studies, using HPLC, investigated three types of cheeses, namely Minas frescal (n = 7), canastra (n = 18), and Minas standard (n = 50). The results showed that the entire samples (n = 75) contained AFM_1, with levels ranging from 0.03 to 0.18 μg/kg in Minas frescal (57.1%, n = 4/7), 0.02 to 1.7 μg/kg in canastra (61.1%, n = 11/18), and 0.02 to 6.92 μg/kg in Minas standard (82%, n = 41/50) cheese [24]. In this study, the average concentration of AFM_1 was highest in the Minas standard cheese (0.62 μg/kg), followed by canasta (0.36 μg/kg), and frescal cheese (0.08 μg/kg), as given in Table 2. Furthermore, HPLC-based analysis of 25% (6 out of 24) of Minas frescal and 29.2% (7 out of 24) of Minas standard cheese were found to contain AFM_1 at levels ranging from 0.142 to 0.118 μg/kg and 0.118 to 0.054 μg/kg, respectively [27]. This study also found that Minas frescal cheese had a higher occurrence and level of AFM_1 (0.142–0.118 μg/kg) compared to Minas standard cheese (0.118–0.054 μg/kg) (Table 2). Amongst Minas frescal light (n = 20), Minas frescal (n = 30), and Minas standard (n = 8) cheese, a higher occurrence of AFM_1 was found in 67.2% of the cheese samples, with the levels ranging from 0.01 to 0.304 μg/kg [28]. Likewise, other typical cheeses (n = 23) produced in Brazil, incorporating prato (n = 9) and parmesan ralado (n = 14), were analyzed and showed higher occurrence of AFM_1. The levels of AFM_1 in prato cheese (100%, n = 9/9) and parmesan ralado cheese (92.8%, n = 13/14) were found to be 0.02–0.54 μg/kg and 0.04–0.30 μg/kg [25]. Overall, parmesan ralado cheeses (n = 30), 60% (n = 18) showed AFM_1 positivity at levels ranging from 50 to 690 μg/kg [29]. These parmesan cheeses were commonly sold in the metropolitan region of Rio de Janeiro, Brazil [29]. In contrast, 45.4% (n = 40/88) of parmesan cheese was found to contain AFM_1, with levels ranging from 0.02 to 0.66 μg/kg [26].

Following additional research, a study conducted in Lebanon (Table 2) found that 67.57% (n = 75/111) of the locally fabricated or imported white and yellow cheese types, comprising Halloumi, Naboulsi, Feta, Baladi, and Akkawi, were contaminated with high occurrence of AFM_1 at levels ranging from 0.00561 to 0.315 μg/kg [31]. However, the same study found that the occurrence and levels of AFM_1 tremendously exceeded the EU permissible level of 0.25 μg/kg [31]. Additionally, data from Iran revealed that 53.8% (n = 194/360) of the locally produced Lighvan, Koozeh, Siahmazgi, Khiki Talesh, and Lactic cheeses were contaminated with higher levels of AFM_1 at 0.0505–0.3087 μg/kg [33]. A study carried out in Mexico City found that 57% (n = 17/30) of Oaxaca cheeses tested contained AFM_1 at an average level of 1.7 μg/kg [34]. In addition, it was found that the Oaxaca artisanal cheeses produced in Veracruz contained higher levels of AFM_1 compared to Oaxaca cheeses fabricated in Mexico City [34]. Additional examination revealed 85% (n = 39/46) of various types of cheeses had higher occurrence of AFM_1, with a mean level of 0.1977 μg/kg [36]. A report from Ethiopia found 100% (n = 82/82) of the cottage cheese samples tested positive for AFM_1, with levels recorded at 5.58 ± 0.08 μg/kg [38]. In a recent study, approximately 70% (n = 42/60) of the cheeses produced in Serbia were found to be contaminated with AFM_1 at levels exceeding 0.25 μg/kg [37]. The analysis of white cheese samples (n = 10/25) from Turkey indicated the incidence of AFM_1 at concentrations ranging

from 0.00246 to 0.035 μg/kg (mean: 0.01714 ± 0.0042 μg/kg) [32]. Similarly, a quantifiable range of AFM_1 was detected in 29% (n = 8) of the Minas frescal cheese manufactured in São Paulo State, at levels ranged from 0.113 to 0.092 μg/kg [12]. However, more studies have been conducted to investigate the presence of AFM_1 in Minas frescal cheese marketed in the northeast region of São Paulo, Brazil [27]. The incidence of this mycotoxin in foods has been shown to be dependent on several factors, including the type of food, seasonal variability, geographic location, post-harvest period, cheese-making procedures, analytical method, and cheese maturation [32,39].

The results of the coalho and mozzarella cheeses can be attributed to variations in manufacturing methods and physicochemical characteristics of each product, as described in previous studies [40,41]. The levels of AFM_1 in cheese depend on the type of cheese, the amount of water eliminated, the curd temperature, the pH of the saturated brine, and the duration of cheese pressing. Reports suggest that AFM_1 levels may be higher in hard cheese compared to soft cheese, due the higher amount of the milk proteins, mainly casein, to which AFM_1 has a greater binding affinity [19]. A study in Brazil evaluated the incidence and levels of AFM_1 in a range of milk and milk-derived products, containing several cheese samples (n = 57) [17]. The study found that of the analyzed products, except a high occurrence rate, only one cheese samples represented AFM_1 at a level of 0.695 μg/kg [17]. Moreover, HPLC coupled with fluorescence-detector-based analyses of cheeses (n = 58), incorporating Minas frescal light, Minas frescal, Minas standard, and other type of cheese, found that 67.24% of the cheeses were contaminated with AFM_1 (0.01–0.304 μg/kg), as given in Table 2 [28].

This work from the northeastern state of Pernambuco in Brazil detected lower levels of AFM_1 compared to other studies conducted on almost same cheese samples in northern Brazil [11]. Similarly, the levels of AFM_1 in artisanal and manufactured mozzarella cheeses ranged from 0.026 to 0.093 μg/kg and from 0.037 to 0.132 μg/kg, respectively, while artisanal and manufactured coalho cheeses showed 0.035–0.045 μg/kg and 0.035–0.046 μg/kg, which were comparatively lower than those detected in northern Brazil. In the northern region, especially the state of Amazonas in Brazil, 25 cheese samples (coalho, coalho de buffalo, mozzarella, mozzarella de buffalo, and Minas frescal) were analyzed, and none of the samples exceeded the Brazilian MPL of 2.5 μg/kg for AFM_1 [11]. Moreover, in the southern region of Brazil, AFM_1 was analyzed in Serrano artisanal cheeses at four different maturation periods (14, 21, 28, and 35 days), and it was observed that only four samples had AFM_1 levels of 0.505, 0.875, 0.093, and 1.03 μg/kg [13]. While most of the samples had AFM_1 levels below the Brazilian MPL of 2.5 μg/kg, some exceeded the EU MPL of 0.25 μg/kg. Although seasonal factors were not considered in the current study, the incidence and level of AFM_1 in cheese samples analyzed can also be influenced by different time periods of cheese manufacture. The artisanal and coalho or mozzarella cheeses produced between March and May 2022 (Brazilian autumn) give AFM_1 levels ranging from 0.026 to 0.132 μg/kg (Table 1).

It is important to note that the impact of seasonality on AFM_1 levels in cheeses has already been described [42]. In this study, the levels of total aflatoxins and AFB_1 in roughage, concentrate, and compound feed were low in the autumn, followed by the summer and winter, while spring had the highest level of mycotoxins [42]. This demonstrates that harvesting and proper drying of vegetable crops used for feed during the autumn may be less risky, leading to milk and cheese with lower AFM_1 levels. Another study found a significant difference ($p < 0.05$) in the occurrence and level of AFM_1 in traditional cheese produced in the summer and winter seasons [33]. In regard to the seasonal impact on cheese contaminated with AFM_1, further studies have also been performed. For example, in a study of traditionally produced Egyptian cheeses over two years (2016–2017), the occurrence and concentration of AFM_1 in karish Egyptian cheese was found to range from 1.11 to 0.632 μg/kg [35]. However, a seasonal evaluation exhibited that the karish cheeses were significantly contaminated with AFM_1 at 1.34 μg/kg (2016) and 0.855 μg/kg (2017) only in the winter, compared to the other three seasons [35].

In the current study, none of the analyzed cheese samples exceeded the MPL of 2.5 μg/kg set by Brazil [20]. This limit (2.5 μg/kg) is higher compared to the MPL set by the EU of 0.25 μg/kg for dairy products [9], as well as other countries including Iran, Austria and Switzerland, and Italy, which have set MPLs of 0.25 μg/kg and 0.45 μg/kg [27]. When comparing the results, 25% of the artisanal mozzarella cheese samples showed AFM_1 levels at 0.07 μg/kg that do not exceed any of the described MPLs. Conversely, in a study of parmesan cheese commercially available in Rio de Janeiro, Brazil, overall samples showed AFM_1 levels below the Brazilian MPL of 2.5 μg/kg, but 26.7% samples still exceeded the EU's MPL of 0.25 μg/kg [29]. A study in Ethiopia found that 100% (n = 82) of locally produced and industrialized cheese contained AFM_1 at levels of 5.58 ± 0.08 μg/kg, exceeding the limits set by Egypt, the EU, and Morocco, and 88% of the samples even exceeded the MPL settled by the United States [38].

In a study carried out in Qatar, halloumi and kashkaval cheeses were found to have significantly higher levels of AFM_1 compared to mozzarella, edam, cheddar, cream, and moshalal varieties [36]. The authors attributed the elevated levels of AFM_1 in halloumi and kashkaval cheeses to factors such as maturation time, manufacturing method (industrial or artisanal), milk source, and time of production [36]. The variations in the processing of artisanal cheese were likely due to a lack of standardization, especially in the case of mozzarella cheese, which was observed during the sampling time. Factors contributing to these issues could include the use of poor-quality products, water content, incorrect pH correction, improper cooking, and cooking time of the curdled dough. The production of artisanal cheeses is a traditional method that is passed down from generation to generation and has significant economic importance, especially for small-scale producers. This production is often based on empirical methods, which can result in varying quality standards in the same production region [40,43,44].

4. Conclusions

According to the findings of this study, a high incidence of AFM_1 was detected using HPLC in both artisanal and industrially produced cheeses in Pernambuco, Brazil. The levels of AFM_1 were low and all the samples were found to be below the limit of 2.5 μg/kg established in Brazil and 0.25 μg/kg adopted in the EU. The study found significant differences between the levels of contamination of artisanal mozzarella-type cheese and manufactured coalho cheese. Based on these results, there is a need for strict quality control measure to further reduce the presence of this mycotoxin in the milk used for cheese manufacture in the studied area. Moreover, future studies should also evaluate the cheeses throughout different seasons to determine the incidence and level of AFM_1, as seasonality can have a significant impact on cheese production in the same regions of Pernambuco, Brazil.

5. Materials and Methods

5.1. Sampling Procedures

In this study, a non-probabilistic convenience sampling was employed, which accounted for approximately 70% of the producers in the study area. Participation in the research was voluntary and not all producers agreed to take part. The collection of the samples was performed for the first time in two main cheese-processing plants in the Agreste and Araripe Sertão regions of Pernambuco state, Brazil. A total of 28 samples of mozzarella- and coalho-type cheeses, 14 of which were artisanal and the remaining 14 were industrially produced, were collected between March and May 2022. Individual samples (original package, 500 g) were stored at 4 °C prior to transport to the laboratory for immediate analytical procedures.

5.2. Sample Preparation

The analysis of the cheese samples was performed according to a previously in-house validated analytical method [30]. Individual samples (8 g) were taken in falcon tubes

(15 mL). To each sample was added 2 g of sodium chloride (NaCl), 22 mL of methanol (CH_3OH, Dinâmica®, São Paulo, SP, Brazil), and 13 mL of ultra-pure water (Mili-Q). Individual mixtures after homogenization (1 min), shaking (10 min), and centrifugation (6000 rpm × 15 min) were filtered through membrane filters (0.22 μm) in glass tubes. At this stage, 20 mL of the individual extracts were diluted in 30 mL of ultra-pure water (Mili-Q) and submitted to re-centrifugation (6000 rpm × 15 min). Now the final filtrates were subjected to passing through the immunoaffinity columns (AflaTest, Vicam, Waters, MA, USA) connected to the glass syringes and vacuum system (2–3 mL/min flow rate). The columns were washed with 20 mL ultra-pure water, and targeted AFM_1 in the samples was eluted with 1 mL of methanol. Then, the samples were subjected to dryness on evaporation under the nitrogen flux (MultiVap-54), and the dried extracts were one-by-one reconstituted in a 1 mL solvent mixture of methanol/water (50:50, *v*/*v*).

5.3. Chromatographic Analysis

The determinations of AFM_1 were carried out on a high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Shimadzu 10 VP, Kyoto, Japan) equipped with 10 AXL fluorescence detectors (Excitation at 360 nm and emission above 440 nm). A Kinetex C_{18} column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) 4.6 × 150 mm, 2.6 μm particle size, and an in-line filter of 0.5 μm were used. The isocratic mobile phase consisted of methanol/water/acetonitrile (6.4:28.1:10.5, *v*/*v*/*v*) with a flow rate of 0.50 mL/min.

Calibration curves with five points were prepared by diluting AFM_1 standard (Sigma®, St Louis, MO, USA) in acetonitrile (CH_3CN) at the concentration ranges of 2.5, 5, 10, 20, 40 ng/mL. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated based on the signal-to-noise ratio (S/N) of 3:1 and 10:1. The LOD and LOQ values for AFM_1 in cheese samples under study were 0.017 and 0.055 μg/kg, respectively. All HPLC runs were carried out in triplicate and the data average values were expressed in the form of mean ± standard deviation.

5.4. Data Analysis

The results obtained from the trial were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) to determine differences among the cheese samples and the Tukey 5% test was applied. The significance level was accepted at the probability $p < 0.05$. All analyses were carried out using XLSTAT 2022 software (v.24.2.1300), with descriptive statistics and Microsoft Excel (v.14.0.4760.1000) also being used to summarize the data. Additionally, R version 4.0.5 software was used.

Author Contributions: Conceptualization, A.G.d.C., R.B.A.d.O., C.H.C. and C.A.F.d.O.; methodology, A.G.d.C., R.B.A.d.O. and C.H.C.; software, I.M.d.M.S.; validation, C.H.C. and C.A.F.d.O.; formal analysis, I.M.d.M.S., S.A., L.M.F., L.G.D.F., R.E.R. and L.G.D.F.; investigation, A.G.d.C., R.B.A.d.O. and C.H.C.; resources, A.G.d.C., R.B.A.d.O., C.H.C. and C.A.F.d.O.; data curation, S.A.; writing—original draft preparation, I.M.d.M.S.; writing—review and editing, S.A., L.M.F., L.G.D.F., A.G.d.C., R.B.A.d.O., C.H.C. and C.A.F.d.O.; visualization, S.A., C.H.C. and C.A.F.d.O.; supervision, A.G.d.C., R.B.A.d.O., C.H.C. and C.A.F.d.O.; project administration and funding acquisition, A.G.d.C., R.B.A.d.O., C.H.C. and C.A.F.d.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant number 304262/2021-8), and in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Finance code 001) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo—Brasil (FAPESP; grant numbers 2019/21603-1 and 2022/03952-1).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee for Human Research at UFRPE (CAAE: 5354.204/2022).

Informed Consent Statement: Participants completed a Free and Informed Consent Form (FICF).

Data Availability Statement: The data related to this work are within the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Wochner, K.F.; Becker-Algeri, T.A.; Colla, E.; Badiale-Furlong, E.; Drunkler, D.A. The Action of Probiotic Microorganisms on Chemical Contaminants in Milk. *Crit. Rev. Microbiol.* **2018**, *44*, 112–123. [CrossRef] [PubMed]
2. Kumar, P.; Mahato, D.K.; Kamle, M.; Mohanta, T.K.; Kang, S.G. Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. *Front. Microbiol.* **2017**, *07*, 2170. [CrossRef] [PubMed]
3. Ramadan, N.A.; Al-Ameri, H.A. Aflatoxins. In *Aflatoxins—Occurrence, Detoxification, Determination and Health Risks*; IntechOpen: London, UK, 2022.
4. Min, L.; Fink-Gremmels, J.; Li, D.; Tong, X.; Tang, J.; Nan, X.; Yu, Z.; Chen, W.; Wang, G. An Overview of Aflatoxin B1 Biotransformation and Aflatoxin M1 Secretion in Lactating Dairy Cows. *Anim. Nutr.* **2021**, *7*, 42–48. [CrossRef] [PubMed]
5. Ostry, V.; Malir, F.; Toman, J.; Grosse, Y. Mycotoxins as Human Carcinogens—The IARC Monographs Classification. *Mycotoxin Res.* **2017**, *33*, 65–73. [CrossRef]
6. Marchese, S.; Polo, A.; Ariano, A.; Velotto, S.; Costantini, S.; Severino, L. Aflatoxin B1 and M1: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development. *Toxins* **2018**, *10*, 214. [CrossRef]
7. Schrenk, D.; Bignami, M.; Bodin, L.; Chipman, J.K.; del Mazo, J.; Grasl-Kraupp, B.; Hogstrand, C.; Hoogenboom, L.; Leblanc, J.; Nebbia, C.S.; et al. Risk Assessment of Aflatoxins in Food. *EFSA J.* **2020**, *18*, e06040. [CrossRef]
8. EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain [CONTAM] Related to Aflatoxin B1 as Undesirable Substance in Animal Feed. *EFSA J.* **2004**, *2*, 39. [CrossRef]
9. Peña-Rodas, O.; Martinez-Lopez, R.; Pineda-Rivas, M.; Hernandez-Rauda, R. Aflatoxin M_1 in Nicaraguan and Locally Made Hard White Cheeses Marketed in El Salvador. *Toxicol. Rep.* **2020**, *7*, 1157–1163. [CrossRef]
10. Costamagna, D.; Gaggiotti, M.; Chiericatti, C.A.; Costabel, L.; Audero, G.M.L.; Taverna, M.; Signorini, M.L. Quantification of Aflatoxin M_1 Carry-over Rate from Feed to Soft Cheese. *Toxicol. Rep.* **2019**, *6*, 782–787. [CrossRef]
11. Gonçalves, B.L.; Ulliana, R.D.; Ramos, G.L.P.A.; Cruz, A.G.; Oliveira, C.A.F.; Kamimura, E.S.; Corassin, C.H. Occurrence of Aflatoxin M_1 in Milk and Minas Frescal Cheese Manufactured in Brazilian Dairy Plants. *Int. J. Dairy Technol.* **2021**, *74*, 431–434. [CrossRef]
12. Janaína, S.B.; Ariane, M.K.; Emerson, S.L.; Pedro, H.C.F.; Cibele, D.S.V.; Lawrence, R.X.; Samir, D.C.B.P.; Augusto, K.K. Aflatoxin M_1 in Cheese Samples from the Amazon Region. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* **2019**, *13*, 163–169. [CrossRef]
13. Pereira, M.N.; Freire, Í.S.F.; Escatolin, L.C.; da Silva, J.R.; Caon, S. Qualidade Do Queijo Artesanal Serrano Catarinense Quanto à Contagem Fúngica, Aflatoxina M_1 e Sujidades. *Pubvet* **2018**, *12*, 138. [CrossRef]
14. Darsanaki, R.K.; Club, Y.R.; Branch, L.; Aliabadi, M.A.; Issazadeh, K.; Rokhi, M.L.; Amini, A. Determination of Aflatoxin M_1 Levels in 1 White Cheese Samples by ELISA in Gilan Province, Iran. *Glob. Vet.* **2012**, *9*, 28–31.
15. Negash, D. A Review of Aflatoxin: Occurrence, Prevention, and Gaps in Both Food and Feed Safety. *J. Appl. Microbiol. Res.* **2018**, *1*, 35–43. [CrossRef]
16. Sumon, A.H.; Islam, F.; Mohanto, N.C.; Kathak, R.R.; Molla, N.H.; Rana, S.; Degen, G.H.; Ali, N. The Presence of Aflatoxin M_1 in Milk and Milk Products in Bangladesh. *Toxins* **2021**, *13*, 440. [CrossRef] [PubMed]
17. Corassin, C.H.; Borowsky, A.; Ali, S.; Rosim, R.E.; de Oliveira, C.A.F. Occurrence of Aflatoxin M_1 in Milk and Dairy Products Traded in São Paulo, Brazil: An Update. *Dairy* **2022**, *3*, 842–848. [CrossRef]
18. Panara, A.; Katsa, M.; Kostakis, M.; Bizani, E.; Thomaidis, N.S. Monitoring of Aflatoxin M_1 in Various Origins Greek Milk Samples Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Separations* **2022**, *9*, 58. [CrossRef]
19. Mousavi Khaneghah, A.; Moosavi, M.; Omar, S.S.; Oliveira, C.A.F.; Karimi-Dehkordi, M.; Fakhri, Y.; Huseyn, E.; Nematollahi, A.; Farahani, M.; Sant'Ana, A.S. The Prevalence and Concentration of Aflatoxin M1 among Different Types of Cheeses: A Global Systematic Review, Meta-Analysis, and Meta-Regression. *Food Control* **2021**, *125*, 107960. [CrossRef]
20. Brasil Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Dispõe Sobre Os Limites Máximos Tolerados (LMT) Para Micotoxinas Em Alimentos (Resolução RDC No 7, de 18 de Fevereiro de 2011)*; Diário Oficial [Da] República Federativa Do Brasil (2011); Brasil Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Brasília, Brazil, 2011.
21. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food and Agriculture Data. Available online: https://www.fao.org/faostat/en/#home (accessed on 26 January 2023).
22. Penna, A.L.B.; Gigante, M.L.; Todorov, S.D. Artisanal Brazilian Cheeses—History, Marketing, Technological and Microbiological Aspects. *Foods* **2021**, *10*, 1562. [CrossRef]
23. de Sylos, C.M.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Carvalho, P.R.N. Occurrence of Aflatoxin M_1 in Milk and Dairy Products Commercialized in Campinas, Brazil. *Food Addit. Contam.* **1996**, *13*, 169–172. [CrossRef]
24. Prado, G.; Oliveira, M.S.; Pereira, M.L.; Abrantes, F.M.; Santos, L.G.; Veloso, T. Aflatoxin M_1 in Samples of "Minas" Cheese Commercialized in the City of Belo Horizonte—Minas Gerais/Brazil. *Food Sci. Technol.* **2000**, *20*, 398–400. [CrossRef]
25. Prado, G.; de Oliveira, M.S.; de Carvalho, E.P.; Veloso, T.; de Sousa, L.A.F.; Cristina, A.; Cardoso, F. Aflatoxina M_1 Em Queijo Prato e Parmesão Determinada Por Coluna de Imunoafinidade e Cromatografia Líquida. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **2001**, *60*, 147–151. [CrossRef]
26. Prado, G.; de Oliveira, M.S.; Lima, A.S.; Moreira, A.P.A. Occurrence of Aflatoxin M_1 in Parmesan Cheese Consumed in Minas Gerais, Brazil. *Ciência Agrotecnologia* **2008**, *32*, 1906–1911. [CrossRef]

27. Oliveira, C.A.F.; Franco, R.C.; Rosim, R.E.; Fernandes, A.M. Survey of Aflatoxin M_1 in Cheese from the North-East Region of São Paulo, Brazil. *Food Addit. Contam.* **2011**, *4*, 57–60. [CrossRef] [PubMed]
28. Iha, M.H.; Barbosa, C.B.; Okada, I.A.; Trucksess, M.W. Occurrence of Aflatoxin M_1 in Dairy Products in Brazil. *Food Control* **2011**, *22*, 1971–1974. [CrossRef]
29. Trombete, F.M.; De Castro, I.M.; Teixeira, A.D.S.; Saldanha, T.; Fraga, M.E. Aflatoxin M_1 Contamination in Grated Parmesan Cheese Marketed in Rio de Janeiro—Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2013**, *57*, 269–273. [CrossRef]
30. Jager, A.V.; Tedesco, M.P.; Souto, P.C.M.C.; Oliveira, C.A.F. Assessment of Aflatoxin Intake in São Paulo, Brazil. *Food Control* **2013**, *33*, 87–92. [CrossRef]
31. Elkak, A.; el Atat, O.; Habib, J.; Abbas, M. Occurrence of Aflatoxin M_1 in Cheese Processed and Marketed in Lebanon. *Food Control* **2012**, *25*, 140–143. [CrossRef]
32. Öztürk Yilmaz, S.; Altinci, A. Incidence of Aflatoxin M_1 Contamination in Milk, White Cheese, Kashar and Butter from Sakarya, Turkey. *Food Sci. Technol.* **2019**, *39*, 190–194. [CrossRef]
33. Shahbazi, Y.; Nikousefat, Z.; Karami, N. Occurrence, Seasonal Variation and Risk Assessment of Exposure to Aflatoxin M_1 in Iranian Traditional Cheeses. *Food Control* **2017**, *79*, 356–362. [CrossRef]
34. Carvajal-Moreno, M.; Vargas-Ortiz, M.; Hernández-Camarillo, E.; Ruiz-Velasco, S.; Rojo-Callejas, F. Presence of Unreported Carcinogens, Aflatoxins and Their Hydroxylated Metabolites, in Industrialized Oaxaca Cheese from Mexico City. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *124*, 128–138. [CrossRef] [PubMed]
35. Ismaiel, A.A.; Tharwat, N.A.; Sayed, M.A.; Gameh, S.A. Two-Year Survey on the Seasonal Incidence of Aflatoxin M_1 in Traditional Dairy Products in Egypt. *J. Food Sci. Technol.* **2020**, *57*, 2182–2189. [CrossRef] [PubMed]
36. Hassan, Z.U.; Al-Thani, R.; Atia, F.A.; Almeer, S.; Balmas, V.; Migheli, Q.; Jaoua, S. Evidence of Low Levels of Aflatoxin M_1 in Milk and Dairy Products Marketed in Qatar. *Food Control* **2018**, *92*, 25–29. [CrossRef]
37. Torović, L.; Popov, N.; Živkov-Baloš, M.; Jakšić, S. Risk Estimates of Hepatocellular Carcinoma in Vojvodina (Serbia) Related to Aflatoxin M1 Contaminated Cheese. *J. Food Compos. Anal.* **2021**, *103*, 104122. [CrossRef]
38. Tadesse, S.; Berhanu, T.; Woldegiorgis, A.Z. Aflatoxin M_1 in Milk and Milk Products Marketed by Local and Industrial Producers in Bishoftu Town of Ethiopia. *Food Control* **2020**, *118*, 107386. [CrossRef]
39. Ismail, A.; Riaz, M.; Akhtar, S.; Yoo, S.H.; Park, S.; Abid, M.; Aziz, M.; Ahmad, Z. Seasonal Variation of Aflatoxin B1 Content in Dairy Feed. *J. Anim. Feed Sci.* **2017**, *26*, 33–37. [CrossRef]
40. Kamimura, B.A.; Magnani, M.; Luciano, W.A.; Campagnollo, F.B.; Pimentel, T.C.; Alvarenga, V.O.; Pelegrino, B.O.; Cruz, A.G.; Sant'Ana, A.S. Brazilian Artisanal Cheeses: An Overview of Their Characteristics, Main Types and Regulatory Aspects. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2019**, *18*, 1636–1657. [CrossRef]
41. Nguyen, H.T.H.; Ong, L.; Lopez, C.; Kentish, S.E.; Gras, S.L. Microstructure and Physicochemical Properties Reveal Differences between High Moisture Buffalo and Bovine Mozzarella Cheeses. *Food Res. Int.* **2017**, *102*, 458–467. [CrossRef]
42. Polat, N.; Gül, M. Aflatoxin Levels in Roughage, Concentrates, Compound Feed and Milk Samples from Dairy Farms in Erzurum Province. *Atatürk Üniv. Vet. Bilim. Derg.* **2014**, *9*, 149–156. [CrossRef]
43. Pelegrino, B.O.; Silva, R.; Guimarães, J.T.; Coutinho, N.F.; Pimentel, T.C.; Castro, B.G.; Freitas, M.Q.; Esmerino, E.A.; Sant'Ana, A.S.; Silva, M.C.; et al. Traceability: Perception and Attitudes of Artisanal Cheese Producers in Brazil. *J. Dairy Sci.* **2020**, *103*, 4874–4879. [CrossRef]
44. Cirne, C.T.; Tunick, M.H.; Trout, R.E. The Chemical and Attitudinal Differences between Commercial and Artisanal Products. *NPJ Sci. Food* **2019**, *3*, 19. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

ARTIGO 2 - PERCEPÇÃO DOS PRODUTORES LEITEIROS SOBRE A IMPORTÂNCIA DAS BOAS PRÁTICAS AGROPECUÁRIAS NA PREVENÇÃO DE AFLATOXINAS DURANTE A PRODUÇÃO DE QUEIJO

RESUMO

O produtor exerce papel central na qualidade e segurança alimentar. No entanto, a falta de conhecimento e a má percepção sobre as boas práticas agropecuárias geralmente fazem com que não existam atitudes efetivas importantes para melhorar a qualidade dos produtos lácteos. Esta pesquisa avalia pela primeira vez a percepção de produtores de leite e queijo sobre a importância das boas práticas agropecuárias e aflatoxinas durante a produção de queijo em um município do Sertão do Araripe, Estado de Pernambuco, Brasil. Foram entrevistados 26 produtores de leite por meio de um questionário presencial, composto por 54 frases. Os entrevistados expressaram seu grau de concordância com as afirmações usando uma escala *Likert* de 5 pontos. Além disso, análise hierárquica de cluster, análise fatorial e teste t independente foram realizados. Os resultados mostraram que os entrevistados concordam com as boas práticas agropecuárias, mas não têm conhecimento sobre as aflatoxinas. Eles estavam incertos sobre a relação entre boas práticas agropecuárias e aflatoxinas, fatores para a produção de aflatoxina, impacto na produção de alimentos e na saúde humana ou animal e passagem de aflatoxina da ração para leite e queijo. Algumas evidências desta pesquisa indicam que os produtores têm algumas concepções errôneas sobre a importância das boas práticas agropecuárias na prevenção de aflatoxinas durante a produção de queijo, o que pode influenciar na adoção de medidas, além de aumentar a concentração dessas micotoxinas e, consequentemente, impactar a qualidade dos produtos alimentares. Portanto, ficou claro que é preciso reforçar as ações educativas entre os produtores por meio de cursos apoiados pelo governo.

Palavras-chave: leite; lacticínios; alimento seguro; micotoxina

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os consumidores têm se preocupado cada vez mais com os benefícios à saúde, segurança e qualidade dos alimentos. No entanto, os consumidores de leite e derivados estão constantemente expostos a potenciais ameaças à saúde devido à alta suscetibilidade dessa matéria-prima à contaminação. Além disso, vários tipos de contaminantes (físicos, químicos e microbiológicos) podem afetar a produção desses produtos. No entanto, as aflatoxinas merecem atenção devido à sua importância econômica e de saúde pública (CAMPAGNOLLO *et al*., 2016; SANTOS *et al*., 2014).

As aflatoxinas são substâncias tóxicas que podem afetar a saúde humana e animal. Os fungos do gênero *Aspergillus* são os microrganismos responsáveis pela produção dessas micotoxinas em cereais, grãos e rações normalmente utilizadas na alimentação de rebanhos leiteiros (GONÇALVES *et al.,* 2020). São classificados como fungos saprófitos, pois atuam na decomposição da matéria orgânica, que ajuda a fertilizar o solo. No entanto, também são considerados importantes fitopatógenos de culturas de cereais, estimulando sua ocorrência e proliferação pela presença de alta temperatura e umidade e pelo maior tempo de armazenamento. Portanto, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* têm um grande potencial para produzir aflatoxinas (KUMAR *et al*., 2017; CHAVARRIA *et al*., 2015)

Milho e sorgo são culturas vegetais susceptíveis ao ataque de cepas micotoxigênicas desde a produção no campo, processamento e, posteriormente, durante o período de armazenamento. A extensão da contaminação é imprevisível e pode variar de acordo com as práticas agrícolas adotadas (OLIVEIRA e CORRASSIN, 2014). Por sua vez, as aflatoxinas ingeridas na alimentação do gado podem ser parcialmente metabolizadas no lúmen intestinal, enquanto outra fração é eliminada pela urina, fezes e leite. Consequentemente, o consumo de leite e seus derivados pode representar um grande risco à saúde pública, dado o alto potencial carcinogênico, teratogênico e mutagênico das aflatoxinas (CLAEYS *et al*., 2020).

Além disso, devido à alta afinidade das aflatoxinas pela caseína, o processamento do leite para obtenção do queijo pode aumentar a concentração de micotoxinas, representando um risco potencial (JIANG *et al.*, 2021). Portanto, várias estratégias já foram desenvolvidas e avaliadas para eliminar, inativar e/ou reduzir o impacto dessas substâncias na economia e na saúde pública. No entanto, a prevenção por meio da

adoção de Boas Práticas agropecuárias (BPA) ainda está entre as estratégias mais eficazes diante do conhecimento técnico-científico atual (JIANG *et al*., 2021).

As Boas Práticas Agropecuárias são princípios, padrões e técnicas que podem aumentar a produção de alimentos e produtos agrícolas mais seguros e saudáveis quando aplicados sistematicamente nas fazendas. A BPA pode proporcionar um melhor desenvolvimento social, econômico e ambiental em toda a sua região implantada. Essas recomendações se aplicam à produção, processamento e transporte de alimentos e visam cuidar da saúde humana, melhorar as condições dos trabalhadores e suas famílias e proteger o meio ambiente (FAO e IDF, 2013; FAO, 2016).

Dessa forma, os produtores têm um papel central na aplicação dessas práticas. No entanto, uma má percepção das BPA combinada com baixos níveis de conhecimento podem ser fatores limitantes para o cumprimento das regras. Portanto, esta pesquisa tem como objetivo avaliar a percepção dos produtores de leite do Nordeste do Brasil sobre a importância das BPA na prevenção de aflatoxinas durante a produção de queijo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Participantes

A amostragem não probabilística (amostragem por conveniência) foi utilizada no presente estudo por ser simples, rápida e barata (STRATTON, 2021). Todos os participantes (n= 26) eram produtores de leite e queijo residentes no Sertão do Araripe do Estado de Pernambuco, Brasil. Os produtores foram selecionados pelo interesse e disponibilidade em participar do estudo. Eles também confirmaram que tinham 18 anos ou mais e sabiam que os dados seriam coletados para fins científicos. Foram realizadas entrevistas face a face em diferentes propriedades produtoras de leite entre março e abril de 2022. O Comitê de Ética da UFRPE aprovou a pesquisa (CAAE: 5354.204/2022), e os participantes preencheram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

2.2 Questionário

O questionário foi dividido em duas seções para serem respondidas pessoalmente. A primeira seção teve como objetivo levantar características sociodemográficas como sexo, idade e escolaridade. A segunda parte teve como objetivo estudar a percepção dos produtores de leite sobre a importância do GAP na

prevenção de aflatoxinas durante a produção de queijo. Foi dividido em seis partes (parte 1 - conhecimento sobre GAP; parte 2 - conhecimento sobre aflatoxinas; parte 3 - manejo sanitário e higiene; parte 4 - manejo alimentar, armazenamento de alimentos e qualidade da água; parte 5 - ordenha e pós-ordenha gestão; e parte 6 - saúde, hábitos e higiene pessoal dos trabalhadores). Os respondentes expressaram um grau de concordância com as afirmações (n = 54) de acordo com a escala *Likert* bipolar de cinco pontos (1=discordo totalmente, 2=discordo parcialmente, 3=nem concordo nem discordo, 4=concordo parcialmente, 5=concordo totalmente concordar).

2.3 Análise de dados

Todas as análises estatísticas foram processadas usando o software XLSTAT 2021.4 (Adinsoft, Paris, França). Primeiramente, os dados do questionário foram submetidos à Análise Hierárquica de Cluster (HCA), que foi utilizada para determinar grupos com semelhanças ou diferenças nos critérios de resposta do questionário. Em seguida, as médias obtidas para a questão foram comparadas com um teste t independente. Além disso, os dados foram submetidos à Análise Fatorial (AF), onde a confiabilidade interna de cada fator foi avaliada por meio do alfa de Cronbach. Por fim, o valor resultante da pontuação para cada fator foi calculado pela respectiva média e desvio padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta as características sociodemográficas dos entrevistados, incluindo sexo, idade, escolaridade e tempo de atividade leiteira. Sabran *et al.* (2012) demonstraram que fatores sociodemográficos e socioeconômicos afetaram o conhecimento dos entrevistados sobre a contaminação por fungos e aflatoxinas em suas dietas. Dos 26 respondentes, a maioria era do sexo masculino (80,77%). Embora haja uma forte tradição masculina na atividade leiteira e indique uma menor contribuição do papel da mulher na população agrícola, isso não significa que a população feminina não tenha influenciado as decisões de adoção de práticas agrícolas. Apesar das atividades agrícolas, as mulheres são limitadas por outras responsabilidades, principalmente relacionadas a atividades domésticas ou outras atividades rurais (PATTNALK e LAHIRI-DUTT, 2020).

Tabela 1: Características sociodemográficas dos respondentes

Características	N	%
Sexo		
Feminino	5	19.23
Masculino	21	80.77
Idade (anos)		
18 a 35	4	15.38
36 a 55	14	53.84
56 a >60	9	34.61
Escolaridade		
Sem escolaridade	2	7.69
Ensino fundamental incompleto	9	34.61
Ensino fundamental completo	3	11.53
Ensino médio incomplete	1	3.84
Ensino médio completo	6	23.07
Ensino superior incompleto	1	3.84
Ensino superior completo	2	7.69
Pós-Graduação	1	3.84
Anos de produção leiteira		
<5 anos	1	3.84
5-10 anos	1	3.84
>10 anos	24	92.30

A maioria dos produtores leiteiros tinha idade entre 36 e 55 anos, representando 53,84% dos entrevistados, seguido do grupo de 56 a >60 anos, correspondendo a aproximadamente 34,61% dos entrevistados. Ainda, quanto à escolaridade, nove entrevistados não concluíram o ensino fundamental (34,61%). Em contrapartida, seis (23,07%) participantes concluíram o ensino médio. Além disso, cerca de 92% dos entrevistados tinham mais de dez anos de produção de leite. Concordando com esses dados, o Censo Agropecuário realizado no Brasil pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) divulgado em 2017 constatou 5 milhões de proprietários rurais, sendo 28% analfabetos ou com ensino fundamental incompleto, com os maiores índices de não alfabetização concentrada nos municípios das regiões Norte e Nordeste do país (IBGE, 2017). Segundo Tatis Diaz *et al*. (2021), o nível de conhecimento é um aspecto fundamental para a adoção de práticas agrícolas sustentáveis e seguras. Portanto, a baixa escolaridade costuma estar associada a fatores de risco, pois os agricultores têm medo de encontrar novas alternativas de trabalho.

As afirmações do questionário foram verificadas de acordo com o coeficiente alfa de Cronbach para analisar a consistência interna e confiabilidade das respostas, obtendo-se o valor de 0,81, o que indica que a escala pode ser considerada de boa consistência (PENNA *et al.,* 2021). No entanto, o valor do alfa de Cronbach varia de zero

a um, com valores mais altos mostrando redundância ou duplicação, o que pode significar que vários itens medem o mesmo elemento estrutural. Pelo contrário, se o valor do alfa for baixo (próximo de 0, abaixo de 0,70), alguns ou todos os itens não estão correlacionados (BUJANG; OMAR; BAHARUM, 2018).

Com base nas respostas dos participantes, uma Análise Hierárquica de Agrupamento foi realizada para obter uma projeção da similaridade ou dissimilaridade dos dados adquiridos. Dessa forma, foram observados dois grupos distintos de respondentes, cada um composto por 13 produtores. Entre as diferenças encontradas entre os dois grupos, destaca-se que o grupo 1 tinha cerca de dez anos a menos (36 a 45 anos) do que o grupo 2 (46 e 55 anos). Em contrapartida, o grupo 1 apresentou maior volume de produção de leite e queijo.

Os produtores foram solicitados a mencionar os fatores que favorecem o aparecimento de aflatoxinas e os impactos das aflatoxinas na produção de alimentos. A maioria não soube citar nenhum fator (88,50%) e apenas alguns responderam que os fatores seriam a alimentação do gado, práticas de ordenha não higiênicas e cuidados com os animais e ordenha. Quanto aos impactos, os produtores citaram perda na produção, morte do animal e aumento do custo. Os resultados sugerem que a maioria dos produtores possui conhecimento limitado sobre as aflatoxinas. Outros estudos relataram que baixa conscientização e conceitos pouco claros sobre aflatoxinas são comuns (AYO *et al.,* 2018; KAMALA *et al.,* 2016; LOREEN e MOSES, 2015). Essa condição pode levar a altos níveis de exposição à aflatoxina, o que representa riscos à saúde de animais e humanos.

A Tabela 2 apresenta as médias e desvios-padrão das respostas dos produtores de lácteos para cada item do questionário. No geral, de todas as afirmações do questionário, houve uma diferença estatística na resposta de apenas 23 sentenças (42,60%) entre os dois grupos.

De acordo com a primeira parte do questionário, que aborda conhecimentos relacionadas às BPA, observou-se que não houve diferença estatística entre as respostas dos dois grupos ($p > 0,05$). Por outro lado, quando questionados sobre o uso das BPA para reduzir perdas de alimentos causadas por aflatoxinas, observou-se que os produtores estavam indecisos; consequentemente, eles nem concordaram nem discordaram da afirmação. O conhecimento das BPA para que os produtores de queijo previnam o aparecimento de aflatoxinas é de extrema importância, pois, segundo alguns,

o GAP pode ser utilizado como estratégia para o manejo da contaminação por aflatoxinas, além de diminuir os riscos à saúde dos consumidores e manipuladores de alimentos, como além de reduzir os custos do produtor com o descarte de alimentos que podem ser contaminados por aflatoxinas (MAHATO *et al.,* 2019; CODEX ALIMENTARIUS, 2019; ATANDA *et al.,* 2013; FEDDERN *et al.,* 2013).

Tabela 2: Pontuações médias de respostas a frases sobre as percepções dos produtores de leite e queijo relacionadas como as Boas Práticas Agrícolas podem prevenir aflatoxinas na produção de queijo[1]

Lista de sentenças	Grupo 1	Grupo 2	p-value
	Média (±SD)	Média (±SD)	
PARTE 1 - CONHECIMENTO SOBRE BOAS PRÁTICAS AGROPECUÁRIAS			
As boas práticas agropecuárias devem ser aplicadas nos processos de pré e pós-produção na fazenda	4.53±0.75	4.08±1	0.211
Implantar as boas práticas agropecuárias produz alimentos seguros	4.69±0.72	4.31±0.82	0.235
As boas práticas agropecuárias diminuem os riscos a saúde do consumidor e manipulador de alimentos	4.53±1.15	4.23±0.80	0.454
A implantação das boas práticas agropecuárias diminui as perdas de alimentos causadas por aflatoxinas	3.08±1.14	3.54±1.22	0.347
PARTE 2 - CONHECIMENTO SOBRE AFLATOXINAS			
Aflatoxinas são produzidas por fungos	2.85±0.53	3±0	0.327
As Aflatoxinas são prejudiciais à saúde do homem e dos animais	3.46±0.84	3±0	0.07
Os alimentos fornecidos aos animais devem ser livres de aflatoxinas	3.69±0.82	3±0	0.007*
Aflatoxina pode ser encontrada na ração para os animais	3.31±1.07	3±0	0.327
O preparo e armazenamento adequado das rações previne a contaminação por aflatoxinas	3.38±0.92	3±0	0.162
Para prevenir a contaminação das rações por aflatoxinas deve-se realizar o controle de temperatura e umidade durante o armazenamento	3.69±0.91	3±0	0.015*
Separar a ração nova da antiga e remover as rações mofadas previne as aflatoxinas	3.54±0.84	3±0	0.037*
O consumo de rações contaminadas por aflatoxinas reduz a produção e qualidade do leite	3.15±1.23	3±0	0.669
A aflatoxina passa da ração para o leite e depois para o queijo	3.77±0.97	3±0	0.011*
A aflatoxina pode contaminar o queijo	3.69±0.91	3±0	0.015*
O tratamento térmico reduz a quantidade de aflatoxina no queijo	3.77±0.97	3±0	0.011*
O consumo de alimentos contaminados por aflatoxinas pode levar a câncer de fígado	3.77±0.97	3.00	0.011*
PARTE 3 - MANEJO SANITÁRIO E HIGIENIZAÇÃO			
É importante identificar individualmente os animais do nascimento até a morte	2.69±1.90	1.60±1.15	0.105
É obrigatório vacinar todos os animais periodicamente	5±0	5±0	1

É necessário realizar exames periódicos para brucelose e tuberculose	4.85±0.36	4.38±0.62	0.036*
Quando comprar novos animais, deve deixá-los separado por um período	3.77±1.67	2.62±1.5	0.087
Deve-se evitar o acúmulo de fezes e urina nos estábulos, realizando a limpeza frequente desses locais	4±1.41	2.77±1.48	0.048*
É necessário realizar o controle de pragas	3.69±1.43	1.69±0.91	0*
Ratos, moscas, baratas, pássaros, gatos ou outros animais ameaçam a segurança do leite e queijos	3.69±1.49	2±1.11	0.004*
Todos os equipamentos e utensílios, utilizados na ordenha e armazenamento do leite, devem ser higienizados adequadamente	4.92±0.27	4.84±0.36	0.558
Após a limpeza, os utensílios e equipamentos devem ser guardados em local limpo e seco, protegidos de poeira e insetos	4.384±1	3.46±0.93	0.028*
PARTE 4 - MANEJO ALIMENTAR, ARMAZENAMENTO DE ALIMENTOS E QUALIDADE DA ÁGUA			
Os alimentos e água fornecida aos animais devem ser livres de contaminantes	4.77±0.58	4.61±0.62	0.536
Fontes de água devem ter qualidade e serem livres de contaminação	4.77±0.58	4.77±0.42	1
Os poços e nascentes devem ser cercados para evitar a entrada de animais e mantidos limpos ao seu redor	4.92±0.27	4.38±0.84	0.044*
Os poços devem ficar tampados e ter uma pequena calçada de cimento com valetas ao redor	5±0	4.54±0.75	0.042*
As caixas d'água e cisternas devem estar tampadas, sem rachaduras, infiltrações ou vazamentos	4.85±0.53	4.54±0.75	0.256
A higienização dos reservatórios deve ser feita frequentemente	4.92±0.27	3.77±1.25	0.005*
Os ingredientes utilizados na formulação das dietas devem ser adquiridos de fornecedores aprovados pelo Ministério da Agricultura	3.85±1.56	3.69±0.72	0.759
A área de armazenamento das rações deve ser limpa, com ventilação adequada, livre de pragas	4.08±1.44	4.08±1.14	1
A ração deve ser armazenada em local seco e arejado	4.08±1.44	4.46±0.75	0.419
Os sacos de ração podem ser colocados diretamente sobre o chão	2.92±1.86	3.08±1.77	0.837
É importante verificar o estado de conservação da ração antes de fornecer aos animais	4.31±1.32	4.23±1.48	0.894
PARTE 5 - MANEJO DA ORDENHA E PÓS-ORDENHA			
Deve se evitar práticas de ordenha que possam causar injúrias aos animais	4.69±0.72	5±0	0.153
O ordenhador deve lavar bem as mãos antes e após cada ordenha	4.38±0.92	4.77±0.58	0.233
O local de ordenha influencia na qualidade do leite	4.77±0.58	3.92±1.54	0.088
A desinfecção do úbere do animal é uma etapa obrigatória antes e após ordenhar o leite	4.38±0.84	2.23±1.62	0*
O equipamento de ordenha deve ser limpo e desinfetado após cada ordenha	4.31±1.20	4.15±1.23	0.759
A ordenha dos animais doentes deve ser feita após dos animais sadios	5±0	5±0	1
O leite obtido de animais doentes ou em tratamento devem ser separados para descarte adequado	4.15±1.56	4.69±1.07	0.334
Não é necessário desprezar os primeiros jatos	3.38±1.82	3.54±1.69	0.832
Realizar o teste da caneca de fundo preto é um procedimento importante	4.31±1.14	1±0	<0.0001*
A refrigeração do leite deve ser feita imediatamente após a ordenha	2.77±1.37	1.54±1.15	0.025*

PARTE 6 - SAÚDE, HÁBITOS E HIGIENE PESSOAL DOS TRABALHADORES			
Os ordenhadores não podem apresentar feridas nas mãos, braços ou antebraços	4.08±1.69	4.62±0.74	0.321
Deve-se afastar da função o ordenhador que apresentar febre, diarreia, tuberculose, otites e faringites	4.85±0.53	4.85±0.36	1
Os trabalhadores devem realizar exames, pelo menos, uma vez por ano	3.46±1.34	3.77±1.37	0.582
Todos os funcionários que lidam com os animais devem se vacinar contra zoonoses	3.15±1.87	4.85±0.53	0.006*
É indispensável o trabalhador realizar a higiene pessoal, como tomar banho diariamente, unhas curtas e limpas, cabelo cortado e barba aparada no caso de homens	4.62±0.74	3.77±1.12	0.039*
É proibido o uso de anéis, relógios, fitas, cordões, que possam cair nos vasilhames com leite	3.77±1.62	4.15±1.17	0.512
Os funcionários devem usar farda limpa, botas de borracha e avental	4.38±0.74	3.54±1.01	0.028*
Durante a ordenha os funcionários não devem fumar, comer, cuspir, assoar nariz, enxugar o suor com as mãos, passar a mão sobre os pelos dos animais	4.69±0.61	3.62±1.08	0.006*

[1]Os resultados foram expressos como média ± Desvio Padrão com base na escala *Likert*: 1=discordo totalmente, 2=discordo parcialmente, 3= nem concordo nem discordo, 4=concordo parcialmente, 5=concordo totalmente

*O valor-p calculado é inferior ao nível de significância alfa=0,05, portanto, a hipótese nula H0 deve ser rejeitada e a hipótese alternativa Ha deve ser aceita.

Em outra frase, os produtores nem concordaram nem discordaram que as aflatoxinas prejudicam a saúde humana e animal. Esse resultado é preocupante, pois, segundo OLIVEIRA e CORRASSIN (2014), a exposição crônica às aflatoxinas pode causar problemas na saúde humana e animal, uma vez que essas micotoxinas são substâncias tóxicas produzidas por fungos do gênero Aspergillus que possuem efeitos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos. Udomkum *et al.* (2018) indicaram que, embora os agricultores tivessem pouco conhecimento sobre o impacto negativo da contaminação por aflatoxinas na saúde humana e animal, 73% estavam cientes da importância das BPA para prevenir essas micotoxinas.

Geralmente, os produtos lácteos são muito afetados pela aplicação das BPA devido à sua suscetibilidade à contaminação durante todo o processo de produção e armazenamento, principalmente quando produzidos de forma artesanal (PELEGRINO *et al.,* 2020; MAGNOLI; POLONI; CAVAGLIERI, 2019). Dito isto, produtores e manipuladores desempenham papéis cruciais na produção de alimentos seguros. Dereti *et al.* (2019) relatam que aliado ao desconhecimento, o sucesso dos programas de BPA esbarra na percepção dos produtores de que essas práticas têm pouco ou nenhum efeito

no resultado final do sistema de produção e na qualidade do produto obtido e, como tal, não os incorpore adequadamente.

Em seguida, na segunda parte do questionário, que aborda frases sobre o conhecimento das aflatoxinas, foram observadas diferenças entre os dois grupos ($p < 0,05$). Quando questionados se os fungos produzem aflatoxinas, os respondentes do Grupo 2 afirmaram não concordar nem discordar da questão, enquanto a maioria do Grupo 1 discordou parcialmente da frase. Observou-se durante as entrevistas que a maioria dos entrevistados achavam que a aflatoxina era produzida por bactérias. No entanto, de acordo com os princípios da microbiologia, a produção de aflatoxinas está relacionada a fungos. Portanto, a percepção correta seria concordar com a frase. Udomkum *et al.* (2018) analisaram a percepção de 150 agricultores no leste da República Democrática do Congo e observaram que 85% dos entrevistados conheciam as aflatoxinas; no entanto, 41% dos agricultores não sabiam que as aflatoxinas são causadas por fungos, sugerindo que os agricultores sabiam da ocorrência, mas não do organismo causador da contaminação.

Ainda na parte 2 do questionário, uma série de proposições foram feitas para avaliar a percepção dos produtores sobre a relação entre ração e aflatoxina. Cerca de 50% dos produtores entrevistados ficaram indecisos (grupo 2), e outra parte (grupo 1) tendeu a concordar quando questionados sobre o controle de temperatura e umidade durante o armazenamento dos alimentos para evitar a contaminação por aflatoxinas e quando questionados sobre o fornecimento de ração livre de aflatoxinas. Provavelmente por falta de conhecimento sobre aflatoxinas e suas formas de prevenção, os produtores não têm opinião formada sobre o assunto. Portanto, não concordam ou discordam das práticas voltadas para a produção de alimentos seguros e prevenção de aflatoxinas continuando a educação dos produtores. Ayo *et al.* (2018) relataram que a conscientização sobre a contaminação de alimentos por aflatoxina entre os criadores de gado no distrito de Meru, na Tanzânia, é geralmente baixa, especialmente entre os agricultores com baixa escolaridade.

Segundo Gonçalves *et al.* (2020), alimentos e rações fornecidos a rebanhos leiteiros são suscetíveis à invasão por cepas aflatoxigênicas em qualquer estágio de produção, processamento ou armazenamento, e sua extensão não é previsível. Além disso, pode variar com as práticas agrícolas e a suscetibilidade do produto à invasão de fungos. Portanto, o Codex Alimentarius (2019) relata algumas ações que podem prevenir o aparecimento dessas micotoxinas em toda a cadeia produtiva: rotação de culturas;

preparação de sementes; programa abrangente de controle de pragas, doenças e ervas daninhas; e irrigação adequada. Posteriormente, durante a colheita, observe a umidade do grão, evitando colheitas com alta umidade, danos mecânicos ao grão e contato com o solo (CODEX ALIMENTARIUS, 2019). Além disso, durante o armazenamento, é importante tomar medidas para evitar a contaminação por aflatoxinas nas rações por meio de instalações de armazenamento adequadas, controle de temperatura e umidade, inspeção e remoção de produtos mofados, separação de rações novas e velhas, armazenamento e registros de práticas (LEDO *et al.*, 2020).

Depois, os produtores de leite e queijo foram questionados sobre a relação entre aflatoxinas e produtos lácteos. Em geral, o grupo 1 apresentou médias mais altas (escores 3 e 4 na escala de *Likert*), indicando que tendem a concordar parcialmente com as afirmações; por outro lado, os entrevistados do grupo 2 não concordaram nem discordaram que as aflatoxinas podem contaminar o queijo e que as micotoxinas podem passar da ração para o leite e depois para o queijo. O desconhecimento por parte dos produtores quanto à contaminação por aflatoxinas nos alimentos que produzem é um fato preocupante devido à importância dessa micotoxina na saúde pública e na cadeia produtiva, podendo acarretar perdas econômicas consideráveis. Colaborando com este estudo, as percepções encontradas por AYO *et al.* (2018), que observaram uma alta proporção de entrevistados (76%) afirmaram que as toxinas fúngicas presentes na ração não poderiam ser transferidas para o alimento de origem animal. No entanto, Yunus *et al.* (2022) observaram que apenas 40,6% dos produtores de leite estavam cientes da transferência de toxinas da ração para o leite. Portanto, de acordo com Kuisa; Kimatu; Kanui (2017), é importante investir em informações para os produtores rurais tentarem reduzir ou erradicar a produção de aflatoxinas em toda a cadeia produtiva de alimentos. Em contraste, aumentar o conhecimento pode não mudar significativamente as atitudes dos agricultores em relação à mitigação da aflatoxina.

Além disso, erroneamente, o grupo 1 tende a concordar parcialmente que o tratamento térmico reduz a quantidade de aflatoxina no queijo, enquanto o grupo 2 não concorda nem discorda da afirmação. Essa percepção pode ser decorrente do conhecimento errôneo da população quanto ao uso de altas temperaturas para matar todos os tipos de microrganismos e seus produtos. No entanto, Mousavi Khaneghah *et al.* (2021) relatam que a aflatoxina é um composto termoestável que não é afetado durante o processamento de rotina aplicado ao leite, incluindo pasteurização e esterilização, nem durante o procedimento de produção de queijo em condições ácidas.

Por sua vez, a parte 3 do questionário está relacionada com práticas de gestão de saúde e higiene importantes para a implementação das BPA. Constatou-se que todos concordam (notas 4 e 5 na escala de *Likert*) com a obrigatoriedade da vacinação periódica dos animais e exames periódicos para brucelose e tuberculose. A vacinação é uma ferramenta importante para a prevenção de doenças; portanto, deve ser utilizado para melhorar a saúde e o bem-estar dos animais, melhorar a eficiência da produção de alimentos e atuar na saúde pública ao prevenir a transmissão de zoonoses e doenças transmitidas por alimentos. Entre as medidas sugeridas por Fao & Idf (2013) para cumprir as BPA para o leite está a vacinação de todos os animais conforme recomendado ou exigido pelas autoridades locais de saúde animal.

Ainda, na parte 3, houve diferenças estatísticas entre os grupos de respondentes ($p>0,05$) quando questionados sobre a limpeza frequente de fezes e urina nos estábulos, a necessidade de realizar o controle de pragas e a presença de pragas como ratos, moscas, baratas, pássaros, gatos ou outros animais ameaçam a segurança do leite e do queijo. Portanto, observa-se que o grupo 1 obteve médias superiores (entre 3 e 4 na escala *Likert*), e o grupo 2 erroneamente apresentou médias entre 1 e 2 na escala *Likert*, discordando das questões. Além disso, os produtores de ambos os grupos concordam que todos os equipamentos e utensílios utilizados na ordenha e armazenamento do leite devem ser higienizados. No entanto, o grupo 2 ficou indeciso se, após a limpeza, os equipamentos e utensílios deveriam ser guardados em local limpo e seco, protegido de poeira e insetos. Para garantir a segurança e a qualidade dos produtos lácteos, deve-se realizar a higiene adequada dos animais, ordenhadores, instalações e equipamentos. Esse achado indica uma diferença entre os grupos de agricultores, principalmente aqueles pertencentes ao grupo 2, que provavelmente não priorizam a limpeza de seu espaço de trabalho.

Na parte 4 do questionário, que trata do manejo alimentar, armazenamento dos alimentos e qualidade da água fornecida ao gado, os produtores foram questionados sobre a presença de contaminantes na água e na alimentação do gado. Durante as entrevistas, foi relatado pelos produtores que a alimentação dos rebanhos leiteiros é baseada no uso de pastagens, utilizando forrageiras cultivadas e vegetação nativa principalmente da Caatinga (bioma exclusivamente brasileiro), além da palma forrageira (*Opuntia ficus indica* - Moinho). Atualmente, não existem estudos que relatem a contaminação de pastagens e palmitos por aflatoxinas. Portanto, os níveis de contaminação por aflatoxinas em produtos lácteos produzidos com leite de vacas

alimentadas neste sistema são provavelmente menores quando comparados a bovinos alimentados com dietas à base de milho, sorgo, trigo e outros grãos e cereais frequentemente contaminados por aflatoxinas.

Ainda na parte 4, observa-se que as médias dos dois grupos foram muito próximas, onde ambos concordaram que tanto a água quanto a ração devem ser isentas de contaminantes. A água, assim como o alimento, tem papel fundamental na saúde animal, por isso deve ser potável, isenta de microrganismos e com padrões de qualidade físico-química. Embora, quando se trata de produção animal, pouca atenção seja dada à qualidade da água fornecida aos animais, essa pouca importância por parte dos produtores vai na contramão da busca pelo melhor desempenho produtivo dos bovinos, principalmente do rebanho leiteiro. A água utilizada no consumo das vacas leiteiras e nos currais para limpeza do ambiente e higiene dos equipamentos influencia diretamente na qualidade final do produto. Pode se tornar uma fonte potencial de contaminação quando não tratada adequadamente. Segundo Raza & Kim (2018), muitas vezes os produtores de leite desconhecem a importância da água potável para a qualidade do produto final. Consequentemente, essa negligência aumenta o risco à saúde animal, aos produtores e ao consumidor final, além de prejuízos econômicos.

A penúltima parte do questionário (parte 5) traz a percepção dos produtores de leite quanto ao manejo da ordenha e pós-ordenha. Os entrevistados foram questionados se o local onde é realizada a ordenha poderia influenciar na qualidade do leite e seus derivados. Observou-se que o grupo 1 concordou (média de 4,77) com a afirmativa. Já o grupo 2 obteve média inferior (3,92); erroneamente, alguns participantes deste grupo nem concordaram nem discordaram. A ordenha é uma atividade central na pecuária leiteira. Portanto, de acordo com Nyokabi *et al.* (2021), a contaminação do leite pode ser decorrente de manejo inadequado, más condições de higiene e saneamento no ambiente de ordenha. Nesse sentido, o manejo da ordenha visa minimizar microbianos e produtos químicos. Por outro lado, a contaminação física, além de todos os aspectos da obtenção rápida e eficiente do leite de um animal, garante a saúde e a qualidade do animal. Portanto, uma parte importante da BPA na pecuária leiteira é a aplicação constante de procedimentos de ordenha (FAO e IDf, 2013).

Posteriormente, verificou-se que houve diferenças estatísticas entre os grupos respondentes ($p<0,05$) quando questionados sobre a desinfecção do úbere do animal antes e após a ordenha. Embora houvesse discrepância entre os grupos, o grupo 1 concordou com a proposição. Por outro lado, parte do grupo 2 discordou da afirmação

(média: 2,23±1,62). Esses dados demonstram o desconhecimento, principalmente do grupo 2, da importância dessas práticas para a produção de alimentos seguros. Morril *et al.* (2019) relatam que a limpeza e desinfecção dos tetos antes e após a ordenha é uma prática de manejo muito utilizada na pecuária leiteira para prevenir e controlar patógenos no momento da ordenha. Diante disso, a desinfecção da pele do teto antes da ordenha (pré-dipping) é fundamental para reduzir o risco de expor a abertura do teto a patógenos ambientais durante a ordenha que possam contaminar o leite. Por sua vez, a limpeza dos tetos pós-ordenha (pós-dipping) é importante para eliminar quaisquer patógenos expostos à vaca durante a ordenha do úbere (MORRIL *et al*., 2019; RUEGG, 2012).

Além disso, os dois grupos de produtores discordam que o resfriamento do leite deva ser feito imediatamente após a ordenha. Essa percepção incorreta dos entrevistados pode decorrer da falta de equipamentos observada e relatada durante as entrevistas. No entanto, a refrigeração do leite desempenha um papel fundamental na manutenção da carga microbiana do leite. Portanto, torna-se essencial para a segurança alimentar. Korale-Gedara; Weerahewa; Roy (2023) concorda que seguir boas práticas de armazenamento e transporte do leite e ter práticas higiênicas de ordenha, como usar utensílios limpos, cuidar da saúde animal e manter um ambiente higiênico, pode reduzir significativamente a probabilidade de contaminação ao longo da cadeia de abastecimento.

Por fim, na parte 6 do questionário, que trata da saúde, hábitos e higiene dos trabalhadores, houve diferença estatisticamente significativa quando os trabalhadores foram questionados sobre higiene pessoal diária, como tomar banho, manter as unhas curtas e limpos, manter o cabelo cortado e a barba aparada para os homens, bem como o uso de uniforme limpo, botas de borracha e avental ($p<0,05$). O grupo 1 concordou que é fundamental que os trabalhadores mantenham esses hábitos de higiene, enquanto o grupo 2 apresentou média inferior, correspondendo ao grau 3 da escala. Ou seja, não concordam nem discordam da prerrogativa. Em um estudo realizado no Quênia por Nyokabi *et al.* (2021) ao investigar conhecimentos, atitudes e práticas de pequenos produtores de leite, constatou-se que a maioria dos produtores adotava medidas sanitárias e higiênicas, como lavagem das mãos e limpeza do úbere. No entanto, ambientes de ordenha insalubres, recipientes de plástico, uso de água não tratada e falta de imersão do teto comprometeram a qualidade e a segurança do leite. Por sua vez, Júnior *et al.* (2011) constataram que os ordenhadores não têm o hábito de manter as unhas limpas e aparadas, além de geralmente apresentarem feridas abertas nas mãos,

não usarem luvas, usarem roupas sujas e não realizarem exames médicos periódicos. Os autores também relatam que essas atitudes podem decorrer do desconhecimento da importância das práticas de higiene.

4. Conclusão

Os resultados deste estudo indicam que os produtores de leite possuem percepções errôneas quanto à importância das Boas Práticas Agropecuárias na prevenção das aflatoxinas na cadeia produtiva do queijo, o que pode refletir no aumento da concentração dessas micotoxinas e na qualidade de seus produtos. Além disso, a falta de informação dos produtores sobre a importância das boas práticas agropecuárias, aliada ao desconhecimento sobre as aflatoxinas e suas consequências na economia e na saúde humana e animal, pode ser o principal impedimento para a adoção de medidas preventivas eficazes no campo. Portanto, para reduzir os efeitos negativos da exposição e contaminação sobre produtores e consumidores, os produtores devem receber treinamento sobre as causas, controle e consequências das aflatoxinas e colocar seus conhecimentos em prática, pois aumentar o conhecimento pode melhorar sua conscientização e compreensão do problema das aflatoxinas. Além disso, instituições governamentais, organizações privadas e não governamentais e redes nacionais de mídia precisam aumentar a conscientização sobre o impacto das aflatoxinas na saúde pública.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com as descobertas desse estudo, constatou-se uma elevada incidência de AFM1 nos queijos coalho e mussarela produzidos no Estado de Pernambuco. Entretanto, foram encontradas baixas concentrações dessa micotoxina e todas as amostras encontravam-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira e União Europeia. Além disso, foi observado que os produtores de leite e queijo possuíam percepções inadequadas quanto ao conhecimento sobre as aflatoxinas e a importância das boas práticas agropecuárias na sua prevenção na cadeia produtiva. Todavia, como provável reflexo da percepção inadequada dos produtores foi constatada uma elevada incidência da AFM1 nos queijos, entretanto, os níveis analíticos dessas micotoxinas foram baixas, provavelmente, devido as condições climáticas da época da coleta, alimentação dos animais e diferenças entre os processamentos dos queijos. Diante dos resultados, recomenda-se realizar o monitoramento continuo desses e de outros produtos lácteos. Como também deve-se estimular a educação continuada referente as boas práticas agropecuárias e aflatoxinas.

Por fim, destaco que ao final desse trabalho, além do artigo apresentado anteriormente foi possível gerar as seguintes publicações:

- Artigo de revisão: Boas práticas agropecuárias como ferramenta chave na prevenção de Aflatoxinas M1 em queijos (Revista Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente do Instituto Federal do Rio de Janeiro) – Anexo B;
- Resumo expandido: Aflatoxinas M1: percepção de produtores de queijo artesanal (Anais do IX Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite) – Anexo C;
- Resumo expandido: Incidência e níveis de contaminação por Aflatoxina M1 em queijos produzidos em Pernambuco, 2022 (Anais do IX Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite) – Anexo D.

REFERÊNCIAS

ABBAS, H. K. *et al.* Ecology of Aspergillus flavus, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. **Toxin reviews**, v. 28, n. 2-3, p. 142-153, 2009.

AGRIOPOULOU, Sofia; STAMATELOPOULOU, Eygenia; VARZAKAS, Theodoros. Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: Prevention and detoxification in foods. **Foods**, v. 9, n. 2, p. 137, 2020.

ALEPE. Projeto de lei ordinária 2651/2021. Disponível em: https://www.alepe.pe.gov.br/proposicaotextocompleto/?docid=7987&tipoprop=p#:~:text=Historicamente%20o%20Queijo%20de%20Coalh,vista%20que%20se%20faz%20antes. Acesso em: 6 jan. 2022.

ALIABADI, Morteza Azizollahi *et al.* Determination of aflatoxin M1 levels in 1 white cheese samples by ELISA in Gilan province, Iran. **Global Veterinaria**, v. 9, n. 1, p. 28-31, 2012.

AMARAL, J. W. *et al.* Avaliação da qualidade de queijos de produção informal. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 27, p. e020016, 2020.

ARAÚJO, J. P. A. *et al.* Uma análise histórico-crítica sobre o desenvolvimento das normas brasileiras relacionadas a queijos artesanais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 5, p. 1845–1860, set. 2020.

ATANDA, Olusegun *et al.* Fungal and mycotoxin contamination of Nigerian foods and feeds. **Mycotoxin and food safety in developing countries**, v. 68, p. 1455-1458, 2013.

AYENI, Kolawole I. *et al*. Present status and future perspectives of grain drying and storage practices as a means to reduce mycotoxin exposure in Nigeria. **Food Control**, v. 126, p. 108074, 2021.

AYO, E. M. *et al*. Socioeconomic Characteristics Influencing Level of Awareness of Aflatoxin Contamination of Feeds among Livestock Farmers in Meru District of Tanzania. **Scientifica**, v. 2018, 2018.

BRASIL. Decreto nº 11.099, de 21 de junho de 2022. Regulamenta o art. 10-A da Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019, para dispor sobre a elaboração e a comercialização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. 2022. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2022/decreto/D11099.htm#:~:text=DECRETO%20N%C2%BA%2011.099%2C%20DE%2021,animal%20produzidos%20de%20forma%20artesanal. Acesso em: 20 out 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. 2001. Disponível em: https://wp.ufpel.edu.br/inspleite/files/2016/03/Instru%C3%A7%C3%A3o-normativa-n%C2%B0-30-de-26-de-junho-de-2001.pdf. Acesso em: 26 out. 2021.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018. Estabelece os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no Serviço de Inspeção Oficial. 2018. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750141/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-77-de-26-de-novembro-de-2018-52749887. Acesso em: 5 ago. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 73, de 23 de dezembro de 2019. Estabelecer, em todo o território nacional, o Regulamento Técnico de Boas Práticas Agropecuárias destinadas aos produtores rurais fornecedores de leite para a fabricação de produtos lácteos artesanais, necessárias à concessão do selo ARTE, na forma desta Instrução Normativa e do seu Anexo. 2019. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/selo-arte-selo-queijo-artesanal/legislacao/INSTRUONORMATIVAN73DE23DEDEZEMBRODE2019INSTRUONORMATIVAN73DE23DEDEZEMBRODE2019DOUImprensaNacional.pdf/view. Acesso em: 20 out 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. RDC nº 07, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre os limites máximo tolerados (LMT) pata micotoxinas em alimentos. 2011. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html. Acesso em: 23 nov. 2022.

BRASIL. Portaria nº 364, de 04 de setembro de 1997. Aprovar o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Mozzarela (Muzzarella ou Mussarela). 1997. Disponível em: https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=08/09/1997&jornal=1&pagina=46&totalArquivos=160. Acesso em: 5 ago. 2022.

BUJANG, M. A.; OMAR, E. D.; BAHARUM, N. A. A review on sample size determination for cronbach's alpha test: A simple guide for researchers. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, v. 25, n. 6, p. 85–99, 2018.

CAMPAGNOLLO, Fernanda Bovo *et al*. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: A review. **Food control**, v. 68, p. 310-329, 2016.

CARVAJAL-MORENO, Magda *et al*. Presence of unreported carcinogens, Aflatoxins and their hydroxylated metabolites, in industrialized Oaxaca cheese from Mexico City. **Food and chemical toxicology**, v. 124, p. 128-138, 2019.

CHAVARRÍA, G. *et al.* Detection of aflatoxin M1 in milk, cheese and sour cream samples from Costa Rica using enzyme-assisted extraction and HPLC. **Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance**, v. 8, n. 2, p. 128–135, 2015.

CHAVES, A. C. S. D. *et al*. Queijos artesanais brasileiros. EMBRAPA, 2021. Disponível em: https://www.embrapa.br/documents/10180/46878777/Guia+de+Neg%C3%B3cio+-+Queijos+Artesanais/ab459918-fb72-123a-a460-c30b56e3b7c9. Acesso em: 6 dez. 2022.

CIRNE, C. T.; TUNICK, M. H.; TROUT, R. E. The chemical and attitudinal differences between commercial and artisanal products. **Science of Food**, v. 3, n. 1, 2019.

CLAEYS, L. *et al*. Mycotoxin exposure and human cancer risk: A systematic review of epidemiological studies. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 4, p. 1449–1464, 2020.

CODEX ALIMENTARIUS. General standard for contaminants and toxins in food and feed (Codex STAN 193-1995). 2019. Disponível em: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B193-1995%252FCXS_193e.pdf. Acesso em: 03 fev. 2023.

CORASSIN, C. H. *et al*. Occurrence of Aflatoxin M1 in Milk and Dairy Products Traded in São Paulo, Brazil: An Update. **Dairy**, v. 3, n. 4, p. 842–848, 2022.

COSTAMAGNA, D. *et al*. Quantification of aflatoxin M1 carry-over rate from feed to soft cheese. **Toxicology Reports**, v. 6, p. 782–787, 2019.

CRUZ, Adriano Gomes *et al*. Processamento de produtos lácteos: queijos, leites fermentados, bebidas lácteas, sorvete, manteiga, creme de leite, doce de leite, soro em pó e lácteos funcionais. 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

PAULA, Junior César Jacinto; CARVALHO, Antônio Fernandes; FURTADO, Mauro Mansur. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 367, p. 19-25, 2009.

DERETI, R. M. *et al.* Good agricultural practices for milk production: Diagnosis and non-compliances adjustment. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 71, n. 6, p. 2075–2084, 2019.

DERETI, Rogerio Morcelles. Diagnóstico de boas práticas agropecuárias e ajuste de não-conformidades em sistemas de produção leiteira. Orientador: Dr. Jorge Schafhäuser Júnior. 2017. 100 f. Tese (Doutorado) – Ciências, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

ELKAK, A. *et al.* Occurrence of aflatoxin M1 in cheese processed and marketed in Lebanon. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 140–143, 2012.

ENESPA; CHANDRA, Prem. Aflatoxins: Food Safety, Human Health Hazards and Their Prevention. In: **Aflatoxins-Occurrence, Detoxification, Determination and Health Risks**. IntechOpen, 2021.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. **EFSA Journal**, v. 2, n. 3, p. 39, 2004.

FAO. A Scheme and Training Manual on Good Agricultural Practices (GAP) for Fruits and Vegetables. 2016. Disponível em: https://www.fao.org/publications/card/en/c/8d86249d-b36c-44db-9a2e-426012d509c0/. Acesso em: 8 fev 2022.

FAO; IDF. Guide to good dairy farming practice. **Animal Production and Health Guidelines**, n. 8, 2013. Disponível em: https://www.fao.org/3/ba0027e/ba0027e00.pdf. Acesso em: 26 março. 2022.

FAO; OECD. OECD-FAO Agricultural Outlook 2021–2030. OECD Publishing, p. 163-177, 2021.

FAOSTAT. Food and Agriculture Data Available. Disponível em: https://www.fao.org/faostat/en/#home. Acesso em: 26 jan. 2023.

FEDDERN, Vivian *et al*. Aflatoxins importance on animal nutrition. Em: Aflatoxins: recent advances and future prospects. **Intech**, p. 171-195, 2013.

FERREIRA, M. A.; URBANO, S. A. Novas Tecnologias para Alimentação de Bovinos Leiteiros na Seca. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 15, n. 1, p. 42–52, 2013.

FOX, Patrick F.; COGAN, Timothy M.; GUINEE, Timothy P. Factors that affect the quality of cheese. em: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. **Elsevier**, p. 617-641, 2017.

GONÇALVES, Bruna Leonel *et al*. Aflatoxin M 1: biological decontamination methods in milk and cheese. **Food Science and Technology**, 2020.

GONÇALVES, Bruna Leonel *et al*. Effects of different sources of Saccharomyces cerevisiae biomass on milk production, composition, and aflatoxin M1 excretion in milk from dairy cows fed aflatoxin B1. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 7, p. 5701-5708, 2017.

GONÇALVES, Bruna L. *et al*. Occurrence of aflatoxin M1 in milk and Minas Frescal cheese manufactured in Brazilian dairy plants. **International Journal of Dairy Technology**, v. 74, n. 2, p. 431-434, 2021.

HASSAN, Z. U. *et al.* Evidence of low levels of aflatoxin M1 in milk and dairy products marketed in Qatar. **Food Control**, v. 92, p. 25–29, 2018.

IBGE. Censo Agropecuário 2017. Disponível em: https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/pdf/genero.pdf Acesso em: 02 fev. 2023.

IBGE. Produto Interno Bruto dos Municípios. 2020. Disponível em: https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/contas-nacionais/9088-produto-interno-bruto-dos-municipios.html?t=pib-por-municipio&c=2606309. Acesso em: 1 dez. 2022.

IHA, Maria Helena *et al.* Occurrence of aflatoxin M1 in dairy products in Brazil. **Food Control**, v. 22, n. 12, p. 1971-1974, 2011.

IPA. Selo Arte fortalece competitividade da bacia leiteira de PE. 2020. Disponível em: http://www.ipa.br/novo/noticia?n=2341. Acesso em: 5 jan. 2022.

ISMAIEL, A. A. *et al.* Two-year survey on the seasonal incidence of aflatoxin M1 in traditional dairy products in Egypt. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 6, p. 2182–2189, 2020.

ISMAIL, A. *et al.* Seasonal variation of aflatoxin B1 content in dairy feed. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 26, n. 1, p. 33–37, 2017.

JAGER, A. V. *et al.* Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. **Food Control**, v. 33, n. 1, p. 87–92, 2013.

JANAÍNA, S. B. *et al.* Aflatoxin M1 in cheese samples from the Amazon Region. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 13, n. 13, p. 163–169, 2019.

JIANG, Y. *et al*. Aflatoxin in dairy cows: Toxicity, occurrence in feedstuffs and milk and dietary mitigation strategies. **Toxins**, v. 13, n. 4, 2021.

JÚNIOR, B. R. C. L. *et al*. Aplicação das boas práticas agropecuárias no processo de ordenha em uma propriedade rural do município de Rio Pomba, Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 380, p. 31-39, 2011.

KAMALA, A. *et al.* Local post-harvest practices associated with aflatoxin and fumonisin contamination of maize in three agro ecological zones of Tanzania. **Food Additives and Contaminants - Part A**, v. 33, n. 3, p. 551–559, 2016.

KAMIMURA, Bruna A. *et al*. Brazilian artisanal cheeses: an overview of their characteristics, main types and regulatory aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 5, p. 1636-1657, 2019.

KAUR, S. *et al*. Exposure assessment and risk characterization of aflatoxin M1 through consumption of market milk and milk products in Ludhiana, Punjab. **Food Control**, v. 126, 2021.

KHANEGHAH, Amin Mousavi *et al*. The prevalence and concentration of aflatoxin M1 among different types of cheeses: A global systematic review, meta-analysis, and meta-regression. **Food Control**, v. 125, p. 107960, 2021.

KORALE-GEDARA, P.; WEERAHEWA, J.; ROY, D. Food safety in milk: Adoption of food safety practices by small-scale dairy farmers in Sri Lanka and their determinants. **Food Control**, v. 143, 2023.

KUISA, Rhoda N.; KIMATU, Josphert N.; KANUI, Titus I. Farmers Perception and the Highlights ofthe Sources of the Chronic Aflatoxin Contamination amongst the Inhabitants of the South-Eastern Region inKenya. **Journal of Advances Agriculture**, v. 7, n. 1, 2017.

KUMAR, Pradeep *et al*. Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2170, 2017.

LEDO, J. *et al.* Implications of differences in safety and hygiene control practices for microbial safety and aflatoxin M1 in an emerging dairy chain: The case of Tanzania. **Food Control**, v. 118, 2020.

MAGNOLI, Alejandra Paola; POLONI, Valeria Lorena; CAVAGLIERI, Lilia. Impact of mycotoxin contamination in the animal feed industry. **Current Opinion in Food Science**, v. 29, p. 99-108, 2019.

MAHATO, Dipendra K. *et al*. Aflatoxins in food and feed: an overview on prevalence, detection and control strategies. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2266, 2019.

MARCHESE, Silvia *et al*. Aflatoxin B1 and M1: Biological properties and their involvement in cancer development. **Toxins**, v. 10, n. 6, p. 214, 2018.

MARTINS, Maria Das Graças Gonzaga. **Patógenos em queijos artesanais e os fatores de risco para sua ocorrência.** Orientador: Ricardo Souza Dias. 2018. 46 f. Trabalho de conclusão (Pós-Graduação) – Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/ICBB-BD9TZR/1/corre__o_monog_cd.pdf. Acesso em: 25 jan 2022.

MENDES, Bruno Gomes *et al.* Qualidade e rendimento da musssarela em tempos de armazenamento sob refrigeração da massa acidificada. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 9, n. 1, 2015.

MIN, Li *et al*. An overview of aflatoxin B1 biotransformation and aflatoxin M1 secretion in lactating dairy cows. **Animal Nutrition**, v. 7, n. 1, p. 42-48, 2021.

MOREIRA, Gisela de Magalhães Machado. **Queijos gorgonzola, prato, parmesão e mussarela: influência do tempo de maturação no perfil de aminas bioativas, aminoácidos livres, textura e características físico-químicas e microbiológicas.** Orientador: Drª. Maria Beatriz Abreu Glória. 2018. 174 f. Tese (Doutorado) – Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-BB6JVR/1/tese___gisela__doutorado_ppgca.fafar.ufmg__2018.pdf. Acesso em: 30 jan 2022.

MORRILL, K. M. *et al.* Evaluation of powdered 0.5% chlorhexidine acetate-based postmilking teat dip compared with a foamed 1% iodine-based postmilking teat dip under cold weather conditions in northern New York. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 3, p. 2507–2514, 2019.

NACEF, M. *et al.* Artisanal and industrial Maroilles cheeses: Are they different? Comparison using sensory, physico-chemical and microbiological approaches. **International Dairy Journal**, v. 89, p. 42–52, 2019.

NEGASH, D. A review of aflatoxin: occurrence, prevention, and gaps in both food and feed safety. **Journal of Nutritional Health & Food Engineering**, v. 8, n. 2, 2018.

NGUYEN, H. T. H. *et al*. Microstructure and physicochemical properties reveal differences between high moisture buffalo and bovine Mozzarella cheeses. **Food Research International**, v. 102, p. 458–467, 2017.

NYOKABI, S. *et al*. Milk quality and hygiene: Knowledge, attitudes and practices of smallholder dairy farmers in central Kenya. **Food Control**, v. 130, 2021.

OGODO, Alloysius Chibuike; UGBOGU, Ositadinma Chinyere. Public health significance of aflatoxin in food industry—A review. **European Journal of Clinical and Biomedical Sciences**, v. 2, n. 5, p. 51-58, 2016.

OLIVEIRA, C. A. F. *et al.* Survey of aflatoxin M1 in cheese from the North-east region of São Paulo, Brazil. **Food Additives and Contaminants: Part B**, v. 4, n. 1, p. 57–60, 2011.

OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H. Aflatoxins. **Future Science**, p. 6-19, 2014.

OSTRY, V. *et al*. Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. **Mycotoxin Research**, v. 33, n. 1, p. 65–73, 2017.

OWUSU-KWARTENG, J. *et al.* Microbial safety of milk production and fermented dairy products in africa. **Microorganisms**, v. 8, n. 5, 2020.

ÖZTÜRK YILMAZ, S.; ALTINCI, A. Incidence of aflatoxin m1 contamination in milk, white cheese, kashar and butter from Sakarya, Turkey. **Food Science and Technology (Brazil)**, v. 39, p. 190–194, 2019.

PARAFFIN, A. S.; ZINDOVE, T. J.; CHIMONYO, M. Perceptions of Factors Affecting Milk Quality and Safety among Large-and Small-Scale Dairy Farmers in Zimbabwe. **Journal of Food Quality**, v. 2018, 2018.

PATTNAIK, Itishree; LAHIRI-DUTT, Kuntala. What determines women's agricultural participation? A comparative study of landholding households in rural India. **Journal of Rural Studies**, v. 76, p. 25-39, 2020.

PELEGRINO, B. O. *et al*. Traceability: Perception and attitudes of artisanal cheese producers in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 5, p. 4874–4879, 2020.

PEÑA-RODAS, O. *et al.* Aflatoxin M1 in Nicaraguan and locally made hard white cheeses marketed in El Salvador. **Toxicology Reports**, v. 7, p. 1157–1163, 2020.

PENNA, A. C. G. *et al*. Impact of food choice and consumption profile on the perception of food coloring on kefir labels: Insights of the projective technique of Product Personality Profiling. **Food Research International**, v. 150, 2021.

PEREIRA, M. N. *et al.* Qualidade do queijo artesanal serrano catarinense quanto à contagem fúngica, aflatoxina M1 e sujidades. **Pubvet**, v. 12, n. 7, p. 1–8, jul. 2018.

PERNAMBUCO. Lei nº 13.376, de 20 de dezembro de 2007. Dispõe sobre o processo de Produção Artesanal do Queijo Coalho e outros produtos derivados do leite. 2008. Disponível em: https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=149693. Acesso em: 21 dez. 2022.

PERNAMBUCO. Lei nº 16.312, de 11 de janeiro de 2018. Altera a Lei nº 13.376, de 20 de dezembro de 2007, que dispõe sobre o processo de Produção do Queijo Artesanal e dá outras providências, a fim de incluir o queijo de manteiga, a manteiga de garrafa e o doce de leite no processo de produção artesanal. 2018. Disponível em: https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=355402#:~:text=Altera%20a%20Lei%20n%C2%BA%2013.376,no%20processo%20de%20produ%C3%A7%C3%A3o%20artesanal. Acesso em: 21 dez. 2022.

PERNAMBUCO. Lei nº 17.673, de 10 de janeiro de 2022. Altera a Lei nº 13.376, de 20 de dezembro de 2007, que dispõe sobre o processo de Produção Artesanal do Queijo Coalho e outros produtos derivados do leite, originada de Projeto de Lei de autoria do Deputado Claudiano Martins, a fim de dispor sobre a produção artesanal do queijo

coalho do Araripe. 2022. Disponível em: https://legis.alepe.pe.gov.br/texto.aspx?id=61425#:~:text=LEI%20N%C2%BA%2017.673%2C%20DE%2010%20DE%20JANEIRO%20DE%202022.&text=O%20PRESIDENTE%20DA%20ASSEMBLEIA%20LEGISLATIVA,Art. Acesso em: 16 nov. 2022.

POLAT, Nebahat; MEHMET, G. Ü. L. Aflatoxin Levels in roughage, concentrates, compound feed and milk samples from dairy farms in Erzurum Province. **Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi**, v. 9, n. 3, p. 149-156, 2014.

PRADO, G. *et al*. Aflatoxin M sub (1) in soft and parmesan cheese by immunoaffinity column and liquid chromatography. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 2, p. 147-151, 2001.

PRADO, Guilherme *et al*. Aflatoxin M1 in samples of "minas" cheese commercialized in the city of Belo Horizonte-Minas Gerais/Brazil. **Food Science and Technology**, v. 20, p. 398-400, 2000.

PRADO, Guilherme *et al.* Occurrence of aflatoxin M1 in parmesan cheese consumed in Minas Gerais, Brazil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 1906-1911, 2008.

QUEIROGA, R. C. R. E. *et al*. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. **LWT**, v. 50, n. 2, p. 538–544, 2013.

RAMADAN, N.; A. AL-AMERI, H. Aflatoxins. Em: Aflatoxins - Occurrence, Detoxification, Determination and Health Risks. **IntechOpen**, 2022.

RAZA, Nadeem; KIM, Ki-Hyun. Quantification techniques for important environmental contaminants in milk and dairy products. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 98, p. 79-94, 2018.

RUEGG, P. L. New Perspectives in Udder Health Management. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, pág. 149-163, 2012.

SABIONI, Rachel Campos. **Otimização de um Processo Industrial de Filagem: uma Comparação entre Métodos Multiobjetivo.** Orientador: Dr. Pedro Paulo Balestrassi. 2018. 111 f. Dissertação (Mestrado) – Ciências em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2018. Disponível em: https://repositorio.unifei.edu.br/jspui/bitstream/123456789/1125/1/dissertacao_sabioni_2018.pdf. Acesso em: 18 fev 2022.

SABRAN *et al*. Socio-demographic and socio-economic determinants of adults' knowledge on fungal and aflatoxin contamination in the diets. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, 2012.

SANTOS, J. S. *et al.* Aflatoxina M1 em produtos lácteos e uso de bactérias ácido láticas para biocontrole em leite. **Uniciências**, v. 18, n. 1, 2014.

SCHRENK, D. *et al.* Risk assessment of aflatoxins in food. **EFSA Journal**, v. 18, n. 3, 2020.

SHAHBAZI, Y.; NIKOUSEFAT, Z.; KARAMI, N. Occurrence, seasonal variation and risk assessment of exposure to aflatoxin M1 in Iranian traditional cheeses. **Food Control**, v. 79, p. 356–362, 2017.

SILVA, Luiz Felipe Pires. **Queijos artesanais: processos e regulamentação**. Orientador: Dr. Fernando Elias Rodrigues da Silva. 2021. 37 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso Bacharel Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural da Amazonas, Belém do Pará, 2021. Disponível em: http://www.bdta.ufra.edu.br/jspui/bitstream/123456789/1996/1/Queijos%20artesanais%20-%20Processos%20e%20regulamenta%C3%A7%C3%A3o.pdf. Acesso em: 14 fev. 2022.

SILVA, R. A. *et al*. Can artisanal "coalho" cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1533–1538, 2012.

SILVA, R. A. *et al*. Proteomic and peptidomic profiling of Brazilian artisanal "Coalho" cheese. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 96, n. 13, p. 4337–4344, 2016.

SOARES, E. K. B. *et al*. What are the cultural effects on consumers' perceptions? A case study covering coalho cheese in the Brazilian northeast and southeast area using word association. **Food Research International**, v. 102, p. 553–558, 2017.

STRATTON, Samuel J. Population research: convenience sampling strategies. **Prehospital and disaster Medicine**, v. 36, n. 4, p. 373-374, 2021.

SYLOS, Célia Maria; RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B.; CARVALHO, Paulo RN. Occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil. **Food Additives & Contaminants**, v. 13, n. 2, p. 169-172, 1996.

TADESSE, S.; BERHANU, T.; WOLDEGIORGIS, A. Z. Aflatoxin M1 in milk and milk products marketed by local and industrial producers in Bishoftu town of Ethiopia. **Food Control**, v. 118, 1 dez. 2020.

TATIS DIAZ, R. *et al*. Socioeconomic determinants that influence the agricultural practices of small farm families in northern Colombia. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 21, n. 7, p. 440–451, 2022.

TOROVIĆ, L. *et al*. Risk estimates of hepatocellular carcinoma in Vojvodina (Serbia) related to aflatoxin M1 contaminated cheese. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 103, 2021.

TROMBETE, Felipe Machado *et al*. Aflatoxin M1 contamination in grated parmesan cheese marketed in Rio de Janeiro-Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, p. 269-273, 2014.

UDOMKUN, P. *et al*. Incidence and farmers' knowledge of aflatoxin contamination and control in Eastern Democratic Republic of Congo. **Food Science and Nutrition**, v. 6, n. 6, p. 1607–1620, 2018.

VALENCIA-QUINTANA, Rafael *et al*. Environment changes, aflatoxins, and health issues, a review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 21, p. 7850, 2020.

WOCHNER, Katia Francine *et al*. The action of probiotic microorganisms on chemical contaminants in milk. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 112-123, 2018.

XIONG, J. L. *et al.* Seasonal variation of aflatoxin M1 in raw milk from the Yangtze River Delta region of China. **Food Control**, v. 34, n. 2, p. 703–706, 2013.

XU, N. *et al*. Occurrence of aflatoxin B1 in total mixed rations and aflatoxin M1 in raw and commercial dairy milk in northern China during winter season. **Food Control**, v. 124, 2021.

YUNUS, A. W. *et al*. Farmer's knowledge and suggested approaches for controlling aflatoxin contamination of raw milk in Pakistan. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.

ZACARCHENCO, P. B.; VAN DENDER, A. G. F.; REGO, Raul Amaral. Brasil dairy trends 2020: tendências do mercado de produtos lácteos. **Campinas: ITAL**, 2017.

APÊNDICE A – FORMULÁRIO SOBRE A PERCEPÇÃO DOS PRODUTORES DE LEITE E QUEIJO QUANTO AS BPA E AF

DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS

Nome:_____

1. Nome da propriedade_____
2. Telefone: ( )
3. Município: _____

4. Qual a sua idade?	<18	18 a 25	26 a 35	36 a 45	>60

5. Sexo	Feminino	Masculino	PNR

6. Grau de escolaridade	Sem escolaridade	Ensino Fundamental Incompleto	Ensino Fundamental Completo	Ensino Médio Incompleto	Ensino Médio Completo	Ensino Superior Incompleto	Ensino Superior Completo	Pós Graduação

PRODUÇÃO DE LEITE

7. Tempo de atividade leiteira	Menos que 1 ano	De 1 a 2 anos	De 2 a 4 anos	De 5 a 7 anos	De 8 a 10 anos	Mais de 10 anos

8. Qual tipo de ordenha realizado na propriedade?	Manual	Mecânica	As duas

9. Quantos litros de leite são ordenhados diariamente? _____
10. Qual ração é dada às vacas leiteiras? _____
11. Possui Inspeção Sanitária? Se sim, qual?

☐ Sim Qual? _____

☐ Não

PRODUÇÃO DE QUEIJO

12. A quanto tempo produz queijo?	Menos que 1 ano	De 1 a 4 anos	De 5 a 10 anos	De 11 a 15 anos	De 16 a 20 anos	Mais de 20 anos

13. Tipo de queijo produzido	Coalho	Manteiga	Mussarela	Provolone

14. Quantos quilos de queijo são produzidos diariamente? _____
15. Possui Inspeção Sanitária? Se sim, qual?

☐ Sim Qual? _____

☐ Não

PARTE 1 - CONHECIMENTO SOBRE BOAS PRÁTICAS AGROPECUÁRIAS	Discordo totalmente	Discordo parcialmente	Não concordo, nem discordo	Concordo parcialmente	Concordo totalmente
16. As boas práticas agropecuárias devem ser aplicadas nos processos de pré e pós-produção na fazenda					
17. Implantar as boas práticas agropecuárias produz alimentos seguros					
18. As boas práticas agropecuárias diminuem os riscos a saúde do consumidor e manipulador de alimentos					
19. A implantação das boas práticas agropecuárias diminui as perdas de alimentos causadas por aflatoxinas					

PARTE 2 - CONHECIMENTO SOBRE AFLATOXINAS	Discordo totalmente	Discordo parcialmente	Não concordo, nem discordo	Concordo parcialmente	Concordo totalmente
20. Indique quais os fatores que favorecem o surgimento das aflatoxinas.					
21. Quais os impactos que as aflatoxinas podem ter na sua produção?					
22. Aflatoxinas são produzidas por fungos					
23. As Aflatoxinas são prejudiciais à saúde do homem e dos animais					
24. Os alimentos fornecidos aos animais devem ser livres de aflatoxinas					
25. Aflatoxina pode ser encontrada na ração para os animais					
26. O preparo e armazenamento adequado das rações previne a contaminação por aflatoxinas					
27. Para prevenir a contaminação das rações por aflatoxinas deve-se realizar o controle de temperatura e umidade durante o armazenamento					
28. Separar a ração nova da antiga e remover as rações mofadas previne as aflatoxinas					
29. O consumo de rações contaminadas por aflatoxinas reduz a produção e qualidade do leite					
30. A aflatoxina passa da ração para o leite e depois para o queijo					
31. A aflatoxina pode contaminar o queijo					
32. O tratamento térmico reduz a quantidade de aflatoxina no queijo					
33. O armazenamento correto dos					

queijos previne a contaminação por aflatoxinas					
34. O consumo de alimentos contaminados por aflatoxinas pode levar a câncer de fígado					

PARTE 3 - MANEJO SANITÁRIO E HIGIENIZAÇÃO	Discordo totalmente	Discordo parcialmente	Não concordo, nem discordo	Concordo parcialmente	Concordo totalmente
35. É importante identificar individualmente os animais do nascimento até a morte					
36. É obrigatório vacinar todos os animais periodicamente					
37. É necessário realizar exames periódicos para brucelose e tuberculose					
38. Quando comprar novos animais, deve deixa-los separado por um período					
39. Deve-se evitar o acúmulo de fezes e urina nos estábulos, realizando a limpeza frequente desses locais.					
40. É necessário realizar o controle de pragas					
41. Ratos, moscas, baratas, pássaros, gatos ou outros animais ameaçam a segurança do leite e queijos					
42. Todos os equipamentos e utensílios, utilizados na ordenha e armazenamento do leite, devem ser higienizados adequadamente					
43. Após a limpeza, os utensílios e equipamentos devem ser guardados em local limpo e seco, protegidos de poeira e insetos.					

PARTE 4 - MANEJO ALIMENTAR, ARMAZENAMENTO DE ALIMENTOS e QUALIDADE DA ÁGUA	Discordo totalmente	Discordo parcialmente	Não concordo, nem discordo	Concordo parcialmente	Concordo totalmente
44. Os alimentos e água fornecida aos animais devem ser livres de contaminantes					
45. Fontes de água devem ter qualidade e serem livres de contaminação.					
46. Os poços e nascentes devem ser cercados para evitar a entrada de animais e mantidos limpos ao seu redor.					
47. Os poços devem ficar tampados e ter uma pequena calçada de cimento com valetas ao redor					
48. As caixas d'água e cisternas devem estar tampadas, sem rachaduras, infiltrações ou vazamentos					

49. A higienização dos reservatórios deve ser feita frequentemente					
50. Os ingredientes utilizados na formulação das dietas devem ser adquiridos de fornecedores aprovados pelo Ministério da Agricultura					
51. A área de armazenamento das rações deve ser limpa, com ventilação adequada, livre de pragas					
52. A ração deve ser armazenada em local seco e arejado					
53. Os sacos de ração podem ser colocados diretamente sobre o chão					
54. É importante verificar o estado de conservação da ração antes de fornecer aos animais					

PARTE 5 - MANEJO DA ORDENHA E PÓS-ORDENHA	Discordo totalmente	Discordo parcialmente	Não concordo, nem discordo	Concordo parcialmente	Concordo totalmente
55. Deve se evitar práticas de ordenha que possam causar injúrias aos animais					
56. O ordenhador deve lavar bem as mãos antes e após cada ordenha					
57. O local de ordenha influencia na qualidade do leite					
58. A desinfecção do úbere do animal é uma etapa obrigatória antes e após ordenhar o leite.					
59. O equipamento de ordenha deve ser limpo e desinfetado após cada ordenha					
60. A ordenha dos animais doentes deve ser feita após dos animais sadios					
61. O leite obtido de animais doentes ou em tratamento devem ser separados para descarte adequado					
62. Não é necessário desprezar os primeiros jatos					
63. Realizar o teste da caneca de fundo preto é um procedimento importante					
64. A refrigeração do leite deve ser feita imediatamente após a ordenha					

PARTE 6 - SAÚDE, HÁBITOS E HIGIENE PESSOAL DOS TRABALHADORES	Discordo totalmente	Discordo parcialmente	Não concordo, nem discordo	Concordo parcialmente	Concordo totalmente
65. Os ordenhadores não podem apresentar feridas nas mãos, braços ou antebraços					

66. Deve-se afastar da função o ordenhador que apresentar febre, diarreia, tuberculose, otites e faringites					
67. Os trabalhadores devem realizar exames, pelo menos, uma vez por ano.					
68. Todos os funcionários que lidam com os animais devem se vacinar contra zoonoses					
69. É indispensável o trabalhador realizar a higiene pessoal, como tomar banho diariamente, unhas curtas e limpas, cabelo cortado e barba aparada no caso de homens.					
70. É Proibido o uso de anéis, relógios, fitas, cordões, que possam cair nos vasilhames com leite.					
71. Os funcionários devem usar farda limpa, botas de borracha e avental.					
72. Durante a ordenha os funcionários não devem fumar, comer, cuspir, assoar nariz, enxugar o suor com as mãos, passar a mão sobre os pelos dos animais					

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENT

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **BOAS PRÁTICAS AGROPECUÁRIAS COMO FERRAMENTA DE PREVENÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE QUEIJOS ARTESANAIS POR AFLATOXINAS**, que está sob a responsabilidade do (a) pesquisador (a) Isabela Maria de Moura Silva, residente na rua Vila Maria do Socorro, Nº 83, São Vicente de Paulo, Vitória de Santo Antão, CEP 55604-210, telefone: (081) 98439-3376, e-mail: belammoura0@gmail.com. A presente pesquisa está sob a orientação de: Dr. Rodrigo Barbosa Acioli de Oliveira, Telefone: (081) 99991-8181, e-mail: rodrigo.aoliveira@ufrpe.br.

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- **Descrição da pesquisa:** A presença e a concentração de aflatoxinas em alimentos é um importante atributo de qualidade, tendo em vista sua importância para saúde pública e para economia. A pesquisa tem como objetivo analisar como a percepção dos produtores e a adoção das BPA podem influenciar na contaminação de queijos artesanais por aflatoxinas. Será aplicado um questionário aos responsáveis técnicos ou proprietários da fazenda. O questionário será composto por questões sociodemográficas, produção da propriedade, conhecimento sobre aflatoxinas e conhecimento sobre boas práticas agropecuárias. Os fatores sociodemográficos investigados serão idade, sexo e escolaridade. No que diz

respeito aos conhecimentos sobre aflatoxinas e boas práticas agropecuárias foram elaborados vários enunciados com base na revisão da literatura.

- **Esclarecimento do período de participação do voluntário na pesquisa, início, término e número de visitas para a pesquisa:** Serão realizadas 2 visitas a propriedade com o intuito de recolher as informações necessárias para o questionário e as amostras para análises. A pesquisa será iniciada após aprovação do comitê de ética pelo Sistema CEP-CONEP. A partir desse momento a mesma terá duração de 18 meses.
- **RISCOS diretos para o voluntário:** A pesquisa pode apresentar riscos aos entrevistados como constrangimento, desconforto ao se expor, alterações de comportamento na hora do preenchimento dos dados e possibilidade de transmissão do COVID-19. Para minimizar esses riscos, os pesquisadores estarão atentos a sinais verbais e não verbais de desconforto, garantirão confidencialidade e privacidade, proteção de imagem e não estigmatização, e garantirão que as informações não sejam utilizadas para prejudicar indivíduos e/ou comunidades, inclusive nos termos de autoestima, prestígio e/ou situação financeira, além disso, os pesquisadores assumiram a responsabilidade de prestar assistência integral às complicações e danos decorrentes dos riscos previstos.
- **BENEFÍCIOS diretos e indiretos para os voluntários:** Dentre os benefícios trazidos pela pesquisa, podemos destacar, entender como as boas práticas agropecuárias podem contribuir positivamente para a empresa, aplicar os conhecimentos e assim minimizar as consequências da contaminação dos queijos por aflatoxinas tanto para o produtor como para os seus consumidores; alertar a população sobre a compra de produtos contaminados com essas micotoxinas e a importância de se consumir alimentos seguros.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (questionário e análises), ficarão armazenados em computador pessoal, sob a responsabilidade do Dr. Rodrigo Barbosa Acioli de Oliveira, no endereço acima informado, pelo período mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação), assim como será oferecida assistência integral, imediata e gratuita, pelo tempo que for necessário em caso de danos decorrentes desta pesquisa.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFRPE no endereço: Rua Manoel de Medeiros, S/N Dois Irmãos – CEP: 52171-900 Telefone: (81) 3320.6638 / e-mail: cep@ufrpe.br (1º andar do Prédio Central da Reitoria da UFRPE, ao lado da Secretaria Geral dos Conselhos Superiores). Site: www.cep.ufrpe.br.

Isabela Maria de M Silva

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu,_____
_, CPF _____, abaixo assinado pela pessoa por mim designada, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar da pesquisa: **BOAS PRÁTICAS AGROPECUÁRIAS COMO FERRAMENTA DE PREVENÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE QUEIJOS ARTESANAIS POR AFLATOXINAS** como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Por solicitação de _____, que é (deficiente visual ou está impossibilitado de assinar), eu _____ assino o presente documento que autoriza a sua participação neste estudo.

Local e data _____

_____

Assinatura do participante/responsável legal

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO - UFRPE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: BOAS PRÁTICAS AGROPECUÁRIAS COMO FERRAMENTA DE PREVENÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE QUEIJOS ARTESANAIS POR AFLATOXINAS

Pesquisador: ISABELA MARIA DE MOURA SILVA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 55245522.1.0000.9547

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO- UFRPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.354.204

Apresentação do Projeto:

Retirado do arquivo PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1880455.pdf, 01/04/2022 10:08:15

As aflatoxinas (AF) são metabolitos secundários produzidos pelos fungos do gênero Aspergillus spp. Sua presença em alimentos ocasionar problemas de saúde pública pois pode apresentar efeitos carcinogênicos, mutagênicos, e levar ao desenvolvimento de malformações em humanos e animais; e econômicos, visto que leva a grandes perdas ao produtor. Uma das formas de se realizar o gerenciamento da contaminação desses fungos e das AF é através das boas práticas agropecuárias. Nesse contexto, para a prevenção da contaminação de queijos artesanais, é necessário a implantação dessas práticas desde o campo, no plantio das matérias primas que serão utilizadas posteriormente para rações bovinas. Isso se deve pela transferência da toxina em toda cadeia produtiva do queijo.

Objetivo da Pesquisa:

Retirado do arquivo PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1880455.pdf, 01/04/2022 10:08:15

Objetivo Primário:

Analisar como a percepção dos produtores e a adoção das BPA podem influenciar na contaminação de queijos artesanais por aflatoxinas.

Objetivo Secundário:
•Avaliar os níveis de contaminação por aflatoxinas B1 dos alimentos fornecidos para vacas leiteiras;•Avaliar a percepção dos fornecedores de leite para queijarias artesanais de Pernambuco quanto a importância da adoção das Boas Práticas Agropecuárias para obtenção de leite com qualidade;
•Detectar os teores de aflatoxinas M1 dos leites utilizadas para fabricação dos queijos artesanais;•Quantificar os teores de aflatoxinas M1 dos queijos coalho e manteiga produzidos em Pernambuco;
•Correlacionar a percepção dos produtores a respeito das aflatoxinas e BPA com os teores de aflatoxinas presentes nas rações fornecidas as vacas, leite e queijos coalho e manteiga.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Retirado do arquivo PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1880455.pdf, 01/04/2022 10:08:15
- Riscos:
A pesquisa pode apresentar riscos aos entrevistados como constrangimento, desconforto ao se expor, alterações de comportamento na hora do preenchimento dos dados e possibilidade de transmissão do COVID-19. Para minimizar esses riscos, os pesquisadores estarão atentos a sinais verbais e não verbais de desconforto, garantirão confidencialidade e privacidade, proteção de imagem e não estigmatização, e garantirão que as informações não sejam utilizadas para prejudicar indivíduos e/ou comunidades, inclusive nos termos de autoestima, prestígio e/ou situação financeira, além disso, os pesquisadores assumiram a responsabilidade de prestar assistência integral às complicações e danos decorrentes dos riscos previstos.

- Benefícios:
Dentre os benefícios trazidos pela pesquisa, podemos destacar, entender como as boas práticas agropecuárias podem contribuir positivamente para a empresa, aplicar os conhecimentos e assim minimizar as consequências da contaminação dos queijos por aflatoxinas tanto para o produtor como para os seus consumidores; alertar a população sobre a compra de produtos contaminados com essas micotoxinas e a importância de se consumir alimentos seguros.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Trata-se de um estudo que propõe a intersecção da aplicação de boas práticas agropecuárias e níveis de contaminação de queijos artesanais por aflatoxinas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide item conclusões ou pendências e lista de inadequações.

Recomendações:

- Ajustar a palavra "bufalino" para "bubalino";
- Retirar o marcador amarelo do arquivo "PROJETO_isabela.docx, 01/04/2022 10:06:21".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Considerando o contexto da pandemia de COVID-19, a pesquisa deve seguir as ORIENTAÇÕES PARA CONDUÇÃO DE PESQUISAS E ATIVIDADE DOS CEP DURANTE A PANDEMIA PROVOCADA PELO CORONAVÍRUS SARS-COV-2 (COVID-19), do Conselho Nacional de Saúde, presente em https://drive.google.com/file/d/1apmEkc-0fe8AYwt37oQAIX90pIvOja3Z/view

Ressalta-se que cabe ao pesquisador responsável encaminhar o relatório da pesquisa, por meio da Plataforma Brasil, via notificação do tipo "relatório" para que seja devidamente apreciada no CEP, conforme resolução CNS 466/12, Item XI.2.D e Resolução CNS n. 510/16, Art. 28, item V.

Cabe ao pesquisador "manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa", conforme Resolução CNS 466/2012, item XI f.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1880455.pdf	01/04/2022 10:08:15		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	tcl_isabela.doc	01/04/2022 10:07:40	ISABELA MARIA DE MOURA SILVA	Aceito

Ausência	tcl_isabela.doc	01/04/2022 10:07:40	ISABELA MARIA DE MOURA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_isabela.docx	01/04/2022 10:06:21	ISABELA MARIA DE MOURA SILVA	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA.docx	01/04/2022 10:04:55	ISABELA MARIA DE MOURA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	10/01/2022 19:53:24	ISABELA MARIA DE MOURA SILVA	Aceito
Outros	Carta_de_anuencia.pdf	04/01/2022 11:57:21	ISABELA MARIA DE MOURA SILVA	Aceito
Outros	termo_de_compromisso_e_confiencialidade.jpg	04/01/2022 11:55:40	ISABELA MARIA DE MOURA SILVA	Aceito
Outros	Rodrigo.pdf	04/01/2022 11:54:28	ISABELA MARIA DE MOURA SILVA	Aceito
Outros	Adriano.pdf	04/01/2022 11:54:02	ISABELA MARIA DE MOURA SILVA	Aceito
Outros	isabelamaria.pdf	04/01/2022 11:50:23	ISABELA MARIA DE MOURA SILVA	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RECIFE, 18 de Abril de 2022

Assinado por:
ANNA CAROLINA SOARES ALMEIDA
(Coordenador(a))

BOAS PRÁTICAS AGROPECUÁRIAS COMO FERRAMENTA CHAVE NA PREVENÇÃO DE AFLATOXINAS M1 EM QUEIJOS

Isabela Maria de Moura Silva[a], Adriano Gomes da Cruz[b], Rodrigo Barbosa Acioli de Oliveira[a]

[a] Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

[b] Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Departamento de Alimentos.

RESUMO

Dentre os diversos derivados lácteos, o queijo se caracteriza como um dos mais susceptíveis ao acúmulo de aflatoxinas devido à elevada afinidade desses metabólitos tóxicos as micelas de caseína. Quando ingeridas, essas substâncias podem provocar danos diretos ao fígado, assim como originar problemas de imunidade e/ou congênitos e, em último caso, até a morte dos indivíduos, constituindo um grave problema de saúde pública. Adicionalmente, grandes perdas econômicas podem ser contabilizadas através dos prejuízos a saúde dos rebanhos e grandes reduções na produtividade leiteira. Entraves na comercialização do leite e derivados lácteos também podem ocorrer como consequência de sanções de ordem sanitária devido à presença de aflatoxinas M1 acima dos limites permitidos pela legislação. Todavia, diante do atual conhecimento científico, que reconhece que não é possível impedir completamente o desenvolvimento de fungos micotoxigênicos nas plantações de cereais, e que esses alimentos são extensivamente utilizados na composição das rações dos rebanhos leiteiros, pode-se afirmar que estas toxinas constituem um grave problema da cadeia produtiva do leite, pois mesmo os animais apresentando a capacidade de eliminar parte desses compostos pelas fezes e urina, outra fração sofre biotransformação hepática sendo eliminada pelo leite. Portanto, essa revisão teve como objetivo demonstrar a importância das Boas Práticas Agropecuárias como uma ferramenta chave para prevenir o aparecimento de aflatoxinas do tipo M1 em queijos.

Palavras-chave: Queijos, Aflatoxinas, Boas Práticas Agropecuárias.

1. INTRODUÇÃO

Produzir queijos com a garantia da isenção de substâncias tóxicas constitui um grande desafio para a indústria de alimentos, tendo em vista que envolve esforços em toda cadeia produtiva. Diversos tipos de contaminantes (físicos, químicos e microbiológicos) podem afetar a produção destes derivados lácteos, no entanto, convém destacar as aflatoxinas devido sua importância econômica e para a saúde pública (CAMPAGNOLLO *et* al, 2016; SANTOS *et* al., 2014).

As aflatoxinas são substâncias tóxicas que podem afetar tanto a saúde humana quanto a animal, sendo produzidas por algumas espécies de fungos do gênero *Aspergillus*. Esses microrganismos se desenvolvem comumente nas plantações de cereais como milho, trigo e sorgo. Estes vegetais, por sua vez, têm uma grande participação na composição da dieta dos rebanhos leiteiros, mas que quando contaminados por estas micotoxinas, podem afetar diretamente o desempenho zootécnico dos animais através da redução da conversão alimentar na produção de leite, bem como na sua saúde através do desenvolvimento de problemas hepáticos, redução da imunidade, entre outros. Adicionalmente, esses animais podem eliminar parte desta contaminação via urina e fezes, porém outra parcela pode sofrer bioconversão hepática, sendo eliminada através da glândula mamária pelo leite (AGRIOPOULOU *et* al, 2020; ENESPA; CHANDRA, 2021)

O leite é um produto de origem animal que possui grande relevância nutricional, apresenta grande participação na dieta humana em todas as fases da vida. O queijo, por sua vez, é um derivado lácteo que além das propriedades nutricionais é bastante apreciado pelas suas características sensoriais, sendo obtido pela separação parcial do soro, concentrando a fração proteica da caseína (CRUZ *et* al, 2017). Todavia, devido a grande afinidade das aflatoxinas pela caseína, o processamento do leite para obtenção do queijo pode aumentar a concentração das micotoxinas representando uma potencialização de risco (JIANG *et* al, 2021). Atualmente, nenhum método aplicado durante o

processamento do queijo é capaz de eliminar as aflatoxinas, portanto, esta revisão de literatura teve o objetivo de apresentar a importância das Boas Práticas Agrícolas como ferramenta chave na prevenção de micotoxinas em queijos.

2. ORIGEM DAS AFLATOXINAS NA CADEIA PRODUTIVA DO QUEIJO

Para desempenhar suas funções vitais, produtivas e reprodutivas, os rebanhos leiteiros precisam consumir nutrientes em quantidade e qualidade compatíveis com seu peso corporal, estado fisiológico, nível de produção, bem como os fatores ambientais aos quais estão expostos. Dentre os ruminantes, a vaca em lactação é a categoria que possui maior exigência nutricional, o que significa que quanto maior a produção de leite, maior será sua demanda energética e proteica, a qual deverá será suprida pelo fornecimento de alimentos volumosos e concentrados (SANTOS *et* al, 2014; GONÇALVES *et* al, 2009).

Silagens de milho e sorgo, assim como feno de gramíneas são alimentos extensivamente utilizadas na dieta dos rebanhos leiteiros. No entanto, várias culturas de cereais são susceptíveis à contaminação por fungos micotoxigênicos, os quais podem contaminar as plantações através do solo, água ou ar (GONÇALVES *et* al, 2020; SANTOS *et* al, 2014).

Os fungos micotoxigênicos de maior importância para cadeia produtiva do queijo pertencem ao gênero *Aspergillus.* Eles são classificados como fungos saprófitas, tendo em vista que atuam na decomposição de matéria orgânica, o que ajuda a fertilizar o solo. Entretanto, também são considerados importantes fitopatógenos das culturas de cereais, tendo sua ocorrência e proliferação estimulada pela presença de temperatura e umidade elevada e pelo maior tempo de armazenamento. Sendo assim, tais micro-organismos apresentam um grande potencial para produzir aflatoxinas os quais são considerados metabólitos secundários produzidos como uma forma de defesa de espécies

como *Aspergillus Flavus e Aspergillus parasiticus* (KUMAR *et* al, 2017; CHAVARRIA *et* al, 2015; ABBAS *et* al, 2009).

Há indícios que as aflatoxinas são produzidas quando os metabólitos primários estão acumulados, sendo assim, a produção destas micotoxinas representa uma forma de redução deste acúmulo. Os estímulos que resultam na produção destas substâncias pelos fungos não estão totalmente elucidados, podendo ser influenciados por alterações nos fatores ambientais como umidade, temperatura, pH e luz (CARCERES *et* al., 2020; TOLEDO, 2018).

Pertencem ao grupo das aflatoxinas mais de 20 tipos de metabólitos, porém as mais importantes do ponto de vista econômico e de saúde pública são aquelas de ocorrência natural como a B1 e B2 produzidas pelo A. *Flavus* e G1 e G2 produzidas pelo A. *parasiticus*. Por sua vez, as AFM1 e AFM2 que são encontradas no queijo derivam das aflatoxinas B (KUMAR *et* al, 2017).

Os alimentos e rações fornecidos aos rebanhos leiteiros são suscetíveis à invasão por cepas aflatoxigênicas em qualquer estágio de produção, processamento ou armazenamento e sua extensão não é previsível, podendo variar com as práticas agropecuárias e a susceptibilidade do produto a invasão fúngica (OLIVEIRA; CORRASSIM, 2014). Consequentemente, o consumo de derivados lácteos contendo aflatoxinas pode levar a uma série de efeitos adversos para a saúde pública, visto que são consideradas substâncias carcinogênicas e teratogênicas, ocasionando principalmente o desenvolvimento de câncer hepático, tanto em humanos como em animais (AYENI *et* al., 2021; CLAEYS *et* al, 2020; KUMAR *et* al, 2017).

A economia também pode sofrer os efeitos negativos causados pela presença destas substâncias, afinal o sistema imunológico dos animais é prejudicado provocando a redução da produção do leite pelas vacas leiteiras, gerando perda de renda para os produtores (AYENI *et* al., 2021; CLAEYS *et* al, 2020; KUMAR *et* al, 2017; XIONG *et* al, 2013).

O consumo de ração contendo a aflatoxina do tipo B1 é metabolizada no fígado das vacas leiteiras através de enzimas do citocromo P450 que as

transformam em aflatoxina do tipo M1. Esse processo de biotransformação é complexo, envolvendo várias reações, com destaque para epoxidação e hidroxilação. Através da epoxidação ocorre a formação do composto AFB1-8,9,epóxido que pode reagir com macromoléculas de RNA, DNA e proteína, a partir disso podem surgir os efeitos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos. Por outro lado, o processo de hidroxilação produz efeitos menos tóxicos, tendo em vista a produção de substâncias hidrossolúveis que podem ser excretadas mais facilmente pelos fluidos corporais dos animais como a urina, fezes e o leite (CARÃO, 2016).

3. PROCESSAMENTO DOS QUEIJOS E AFLATOXINAS

O queijo é um derivado lácteo obtido pela separação parcial do soro obtido após a coagulação do leite, podendo ser um produto fresco ou maturado. Dessa forma, este alimento pode ser considerado como uma massa de caseína, gordura, entre outros componentes do leite, no qual podem ser acrescentados fermentos, corantes, sal e outras substâncias permitidas (CRUZ *et* al, 2017; PAULA *et* al, 2009).

As principais etapas envolvidas na fabricação do queijo são: acidificação, coagulação, retirada do soro, enformagem e salga. O aumento da acidez na primeira etapa do processo promove grandes modificações físico-químicas no leite, que resultam na redução do pH promovendo a proteólise. Na etapa seguinte, a quebra das micelas de caseína com liberação do soro resultou na coagulação proteica formando um gel de coalhada que retém proteína, gordura, lactose, água, além de bactérias ácido lácticas. Por sua vez, o processo de retirada do soro ocorre quando o gel da coalhada é cortado ou quebrado, sendo possível controlar o teor de umidade da massa, assim como o grau de maturação e estabilidade do queijo. No processo de enformagem, a massa é colocada em formas para que ocorra a drenagem do soro e se forme uma massa contínua e homogênea. Finalmente, na etapa de salga, a adição do cloreto de sódio desempenha importantes funções como o controle do

desenvolvimento microbiano, sabor, entre outros processos de regulação físico-químicos e bioquímicos (CRUZ *et* al, 2017; PAULA *et* al, 2009).

Devido a elevada afinidade das aflatoxinas pela caseína do leite, mesmo após as várias etapas do fluxograma de elaboração de queijos, estas substâncias permanecem retidas durante todo o processamento. Sendo assim, a concentração de aflatoxinas M1 é comumente maior em queijos, quando comparados a outros produtos lácteos. A AFM1 é classificada como uma molécula de polaridade intermediária, que possui baixa afinidade química pelas proteínas do soro do leite e alta afinidade pela caseína (KAUR *et* al, 2021; CARVAJAL-MORENO *et* al, 2019).

É importante destacar que a aplicação de calor utilizada comumente no processamento dos produtos lácteos como a pasteurização, esterilização e Ultra Alta Temperatura (UAT) não eliminam a aflatoxina M1, visto que a mesma é bastante estável e resistente a temperaturas elevadas. Portanto, o consumo de leite e seus derivados lácteos pode ser uma das principais vias de exposição do homem a AFM1 (KHANEGHAH *et* al, 2021; CARVAJAL-MORENO *et* al, 2019; IHA *et* al, 2013).

Várias estratégias já foram elaboradas e avaliadas no intuito de eliminar, inativar e/ou reduzir o impacto dessas substâncias na economia e na saúde pública, entretanto, a prevenção através da adoção das Boas Práticas Agropecuárias (BPA) ainda é um dos mais efetivos diante dos atuais conhecimentos técnico-científicos (JIANG *et* al, 2021).

Segundo OLIVEIRA; CORRASSIM (2014) alguns métodos físicos já foram utilizados na tentativa de realizar a descontaminação de aflatoxinas em alimentos como a inativação pelo calor, luz ultravioleta, e radiação ionizante, também foram avaliados processos de separação mecânica ou extração com solventes, no entanto, não foram observados resultados satisfatórios. Por outro lado, alguns métodos químicos como a adição de agentes de clorados, oxidantes ou hidrolíticos, bem como processos de biológico pelo uso de fungos,

bactérias e leveduras para um processo de descontaminação biológica já foram testados sem sucesso efetivo.

De uma maneira geral, ao se pensar em novos métodos de descontaminação de aflatoxinas em alimentos deve-se levar em consideração a acessibilidade, facilidade de utilização, bem como os mesmos não devem alterar as propriedades nutricionais e/ou tecnológicas do leite e dos produtos lácteos. Atualmente, ainda não existem métodos físicos e químicos que possam ser aplicados no processamento de queijos que sejam eficazes do ponto de vista de segurança, economia e manutenção de qualidade do produto (nutricional e sensorial). Quanto aos métodos biológicos, poucos estudos foram publicados acerca do assunto, e nenhum dos estudos publicados testou os métodos descritos em queijo (GONÇALVES *et* al, 2020). Neste sentido, as BPA se mostram como uma excelente alternativa para prevenir e limitar a contaminação de aflatoxinas na cadeia produtiva de queijos. A adoção destas práticas devem ser iniciadas no campo, principalmente através do cuidado com a plantação e colheita de cereais, assim como no processamento, distribuição e armazenamento da ração fornecida as vacas leiteiras (OWUSU-KWARTENG *et* al., 2020; FAO; IDF, 2013).

4. PREVENÇÃO DAS AFLATOXINAS EM QUEIJOS PELA ADOÇÃO DAS BOAS PRATICAS AGROPECUÁRIAS

Segundo a FAO (2016) as Boas Práticas Agropecuárias (BPA) são um conjunto de princípios que devem ser aplicados nos processos de pré e pós-produção na fazenda, gerando alimentos seguros e saudáveis, considerando a sustentabilidade econômica, social e ambiental. Sendo assim, pode-se afirmar que essas práticas contribuem para o progresso social, ecossistêmico e financeiro.

Alguns autores relatam que as BPA podem ser utilizadas como estratégia de gerenciamento da contaminação por aflatoxinas. Consequentemente, essas práticas reduzem os riscos à saúde do consumidor, assim como diminuem os

custos do produtor com descarte de alimentos que possam vir a ser contaminados por aflatoxinas, principalmente os cereais e rações (MAHATO *et* al, 2019; CODEX ALIMENTARIUS, 2016; FEDDERN *et* al, 2013; ATANDA *et* al, 2013).

A deficiência na implementação das BPA afeta a qualidade dos alimentos, podendo levar ao desenvolvimento das aflatoxinas. Os derivados lácteos, como os queijos, são bastante afetados pela aplicação dessas práticas devido a sua susceptibilidade à contaminação em todo processo de produção e armazenamento, principalmente quando produzidos de forma artesanal (PELEGRINO *et* al, 2020; MAGNOLI *et* al, 2018). É notório que os produtores e manipuladores exercem papéis cruciais na produção de alimentos seguros. Aliado a falta de conhecimento, o sucesso dos programas de Boas Práticas Agropecuárias esbarram na percepção dos produtores de que essas práticas têm pouco ou nenhum efeito no resultado final do sistema de produção e na qualidade do produto obtido e, como tal, não as incorporam adequadamente (DERETI *et* al, 2019).

JOSHI *et* al (2019) em seu estudo sobre a conscientização das BPA entre produtores de banana, observou que 72% dos entrevistados nunca tinham ouvido falar em BPA e cerca de 11% já tinham ouvido falar porém não tinham conhecimento sobre o tema. Além disso, também observaram que dentre as variáveis que mais afetaram o conhecimento dos produtores sobre as BPA, destaca-se a escolaridade e participação em treinamentos. Dessa forma, o estudo sugere uma maior ênfase na educação e treinamento desses produtores. Dessa maneira, é necessária a formação dos agricultores por instituições e pessoas qualificadas através de procedimentos, práticas tecnológicas e recomendações técnicas apropriadas. Além disso, esses produtores devem ser instruídos quanto à adoção de processos controlados, padronizados e documentados e sua importância na segurança alimentar durante todo o processamento dos alimentos (MAHATO *et* al, 2019; FEDDERN *et* al, 2013; ATANDA *et* al, 2013).

Muitos países criam programas de apoio e certificação em Boas Práticas Agropecuárias, como os Estados Unidos da América e Paraguai. O apoio governamental é imprescindível para construir um conhecimento sólido entre técnicos agrícolas, agricultores, cooperativas e instituições interessadas, fornecendo treinamento, cursos e auxílio de forma gratuita. Além disso, os programas de treinamento devem ser seguidos por visitas regulares aos agricultores por especialistas para apoiá-los e ajudar a reforçar seu compromisso com as BPA.

Existem vários fatores de risco que predispõem as plantações à contaminação por aflatoxina, como injuria no grão, infestação de insetos, atraso na colheita, danos à plantações ocasionadas pela temperatura e clima. Para prevenir ou reduzir essa contaminação, os fatores de riscos citados devem ser minimizados através de ações como a rotação de cultura; tilagem e preparo da semente; cuidados na fase de pré-colheita, através de um programa integrado de pragas, controle das ervas daninhas e irrigação adequada. Na colheita deve-se observar o teor de umidade de grão, evitando colher aqueles que se apresentem com altos teores de umidade, além disso, deve se evitar os danos mecânicos aos grãos e o contato com o solo (JIANG *et* al, 2021; CODEX ALIMENTARIUS, 2016)

Na etapa de pós-colheita dos cereais, os cuidados devem ser tomados no seu transporte e armazenamento, além de atenção nos processos de lavagem, secagem e pós-armazenamento. Aliado a essas questões, após o processamento dos cereais para produção da ração é importante que se adote as BPA com ações que previnam a contaminação por aflatoxinas no armazenamento das rações, através de instalações adequadas, controle de temperatura e umidade, inspeção e remoção de produtos mofados, separação da ração nova e antiga e controle do tempo de armazenamento (LEDO et al, 2020). Com a aplicação dessas ações há uma menor possibilidade da presença de aflatoxinas em leites e seus derivados.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Indescritivelmente as aflatoxinas podem ser caracterizadas como substâncias tóxicas que prejudicam toda cadeia produtiva do queijo. Diante dos atuais conhecimentos técnicos e científicos, uma vez presente no leite, não existem procedimentos reconhecidamente capazes de eliminá-las durante o processamento do queijo. Sendo assim, a adoção das Boas Práticas Agropecuárias direcionado ao manejo adequado da alimentação das vacas leiteiras é o único mecanismo eficiente para prevenir este perigo. Atualmente, a desinformação dos produtores rurais é o principal fator impeditivo para a adoção de medidas preventivas eficazes no campo. Portanto, pode-se afirmar que o ponto chave para prevenir o aparecimento de aflatoxinas M1 na cadeia produtiva do queijo é realizar a conscientização dos seus participantes através de palestras, materiais informativos e pelo monitoramento laboratorial.

5. REFERÊNCIAS

ABBAS, HK *et* al. Ecology of Aspergillus flavus, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. **Toxin Reviews**, v. 28, p. 142–153, 2009.

AGRIOPOULOU, Sofia *et* al. Advances in Occurrence, Importance, and Mycotoxin Control Strategies: Prevention and Detoxification in Foods. **Foods,** v. 9, p. 137, 2020.

ATANDA, S.A. *et al*. Mycotoxin Management in Agriculture. **Greener Journal of Agricultural Sciences**, v. 3, p. 176-184, 2013.

AYENI, Kolawole I. *et* al. Present status and future perspectives of grain drying and storage practices as a means to reduce mycotoxin exposure in Nigeria. **Food Control**, v. 126, p. 108074, 2021.

CAMPAGNOLLO, Fernanda Bovo *et* al. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M_1: A review. **Food Control**, v. 68, p. 310-329, 2016.

CARÃO, Ágatha Cristina de Pinho. Determinação de biomarcadores de aflatoxinas B1 e aplicabilidade na avaliação da eficiência de adsorventes em

frangos de corte. 2016. 146f. **Tese de Doutorado** (Doutor em Ciências) – Departamento de Nutrição e Produção animal, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

CARCERES, Isaura et al. Aflatoxin Biosyntesis and genetic regulation: a review. Toxins, v.12, p150, 2020.

CARVAJAL-MORENO, Magda *et* al. Presence of unreported carcinogens, Aflatoxins and their hydroxylated metabolites, in industrialized Oaxaca cheese from Mexico City. **Food and Chemical Toxicology**, v. 124, p. 128-138, 2019.

CHAVARRIA, Guadalupe *et al*. Detection of aflatoxin M1 in milk, cheese and sour cream samples from Costa Rica using enzyme-assisted extraction and HPLC. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 8, p. 128–135, 2015.

CLAEYS, L. *et al*. Mycotoxin exposure and human cancer risk: a systematic review of epidemiological studies. **Compr Rev Food Sci Food Saf**, v. 19, p. 1449-1464, 2020.

CODEX ALIMENTARIUS. Code of practice for the prevention and reduction of mycotoxin contamination in cereals. **FAO**, Revisado em 2016.

CRUZ, Adriano Gomes *et* al. Processamento de Produtos Lácteos: Queijos, Leites Fermentados, Bebidas Lácteas, Sorvete, Manteiga, Creme de Leite, Doce de Leite, Soro em Pó e Lácteos Funcionais. 3 ed. Rio de Janeiro: **Elservier**, 2017.

DERETI, R.M. *et* al. Boas práticas agropecuárias na produção leiteira: diagnóstico e ajuste de não conformidades. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**., v.71, p. 2075-2084, 2019.

ENESPA; CHANDRA, Prem. Aflatoxins: Food Safety, Human Health Hazards and Their Prevention**. IntechOpen**, 2021.

FAO. A scheme and training manual on good agricultural practices (GAP) for fruits and vegetables. Bangkok, 2016.

FAO; IDF. Guia de boas práticas na pecuária de leite. **Produção e Saúde Animal**. Roma, 2013. Disponível em:< https://www.fao.org/3/Y5224E/Y5224E00.htm>.Acesso em: 30 maio de 2022.

FEDDERN, V. *et al*. Aflatoxins Importance on Animal Nutrition. **Intech**, cap 8, p. 1-26, 2013.

GONÇALVES, Bruna Leonel *et al*. Aflatoxin M_1: biological decontamination methods in milk and cheese. **Food Sci. Technol**, v. 42, p. 22920, 2020.

GONÇALVES, Lúcio Carlos *et* al. Alimentos para gado de leite. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2009.

IHA, M.H. *et al*. Aflatoxin M 1 in milk and distribution and stability of aflatoxin M 1 during production and storage of yoghurt and cheese. **Food Control**, v. 26, p. 1-6, 2013.

JIANG, Y *et al.* Aflatoxin in Dairy Cows: Toxicity, Occurrence in Feedstuffs and Milk and Dietary Mitigation Strategies. **Toxins**, v. 13, p. 283, 2021.

JOSHI, Arati *et al*. Determinants of awareness of good agricultural practices (GAP) among banana growers in Chitwan, Nepal. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 1, p. 100010, 2019.

KAUR, Simranjot *et al*. Exposure assessment and risk characterization of aflatoxin M1 through consumption of market milk and milk products in Ludhiana, Punjab. **Food Control**, v. 126, p. 107991, 2021.

KHANEGHAH, A.M. *et al.* The prevalence and concentration of aflatoxin M1 among different types of cheeses: A global systematic review, meta-analysis, and meta-regression. **Food Control**, v. 125, p. 107960, 2021.

KUMAR, Pradeep *et al*. Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. **Front. Microbiol**., v. 7, p. 2170, 2017.

LEDO, James *et* al. Implications of differences in safety and hygiene control practices for microbial safety and aflatoxin M1 in an emerging dairy chain: The case of Tanzania. **Food Control**, v. 118, p. 107453, 2020.

MAGNOLI, A.P. *et al.* Validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the detection of aflatoxin B1 residues in broiler liver. **Revista Argentina Microbiology**, v. 50, p. 167-164, 2018.

MAHATO, D.K. *et al.* Aflatoxins in Food and Feed: An Overview on prevalence, detection and control strategies. **Front. Microbiol**, v. 10, p. 2266, 2019.

OLIVEIRA, Carlos AF; CORRASSIN, Carlos H. Aflatoxin. **Future Science**, cap. 1, p. 6-19, 2014.

OWUSU-KWARTENG, James *et al*. Microbial Safety of Milk Production and Fermented Dairy Products in Africa. **Microorganisms**, v. 8, p. 752, 2020.

PAULA, Junio César Jacinto de *et* al. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, p. 19-25, 2009.

PELEGRINO, B.O. *et al.* Traceability: Perception and attitudes of artisanal cheese producers in Brazil. **Journal Dairy Science**, v. 103, p. 1525-3198, 2020.

SANTOS, J.S. *et* al. Aflatoxina M1 em produtos lácteos e uso de bactérias ácido lácticas para biocontrole em leite. **Uniciências**, v.8, n.1, p.51-56, jun., 2014.

SIMÕES, Tânia Valeska Medeiros Dantas; OLIVEIRA, Amaury Apolônio de. Mastite Bovina, Considerações e Impactos Econômicos. 1 ed. Aracajú: **EMBRAPA**, 2012.

TOLEDO, Eduardo Amaral de. Quantificação de micotoxinas e análise bromatológica de silagens de milho na microrregião geográfica Apucarana, no norte do Paraná. 2018. 73f. Dissertação de mestrado (Mestre em Saúde e Produção de Ruminantes) – UNOPAR, Arapongas, 2017.

XIONG, J.L. *et a*l. Seasonal variation of aflatoxin M1 in raw milk from the Yangtze River Delta region of China. **Food Control**, v. 34, p. 703-706, 2013.

AFLATOXINAS M1: PERCEPÇÃO DE PRODUTORES DE QUEIJO ARTESANAL

Isabela Maria de Moura Silva[1], Adriano Gomes da Cruz[2], Rodrigo Barbosa Acioli de Oliveira[1]

[1]Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Pernambuco, Brasil. [2]Departamento de Alimentos Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Rio de Janeiro, Brasil

INTRODUÇÃO

Os consumidores de leite e derivados estão constantemente expostos a potenciais ameaças à saúde devido a grande susceptibilidade desta matéria-prima a contaminação. Compreender a percepção dos produtores rurais sobre a presença de aflatoxinas nos produtos lácteos pode contribuir para produção de alimentos seguros (Paraffin et al., 2018).

Os fungos são os micro-organismos responsáveis pela produção destas micotoxinas nos cereais que habitualmente são utilizados na alimentação dos rebanhos leiteiros (Gonçalves et al., 2020). O milho e o sorgo são culturas vegetais passíveis ao ataque de cepas micotoxigênicas desde a produção no campo, assim como no processamento na forma de ração e, posteriormente, durante o período de armazenamento, pois sua extensão não é previsível já que pode variar de acordo com as práticas agrícolas adotadas (Oliveira & Corrassim, 2014).

As aflatoxinas ingeridas pela alimentação dos bovinos podem ser metabolizadas parcialmente no lúmen intestinal, enquanto outra fração é eliminada através da urina, fezes e leite. Consequentemente, o consumo do leite e seus derivados, pode representar um grande risco para a saúde pública diante do elevado potencial carcinogênico, teratogênico e mutagênico das aflatoxinas (Claeys et al, 2020).

O consumo de queijo representa uma das principais vias de exposição humana as aflatoxinas M1, já que o processamento do leite para obtenção de queijo aumenta a concentração desta substância devido sua elevada afinidade pela caseína (Jiang et al., 2021). Dessa maneira, este estudo teve o objetivo investigar a percepção de produtores artesanais sobre a presença de aflatoxinas M1 em queijos.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em propriedades rurais localizadas no Estado de Pernambuco, Brasil. Foram visitadas vinte e seis fazendas produtoras de queijo artesanal (n=26) no período de março a maio de 2022. Os proprietários e/ou responsáveis pela produção do estabelecimento foram convidados para participar da pesquisa de acordo com os protocolos aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal Rural de Pernambuco (protocolo n.5354.204/2022 CEPE-UFRPE). A percepção dos produtores artesanais sobre a presença de aflatoxinas M1 em queijos foi investigada através de um questionário semi-estruturado composto de 08 sentenças (Tabela 1) no qual o respondente expressou o grau de concordância com as afirmativas de acordo com a escala bipolar de Likert de cinco pontos (1=discordo totalmente, 2=discordo parcialmente, 3=não sei, 4=concordo parcialmente, 5=concordo totalmente). Os dados foram analisados através de estatística descritiva utilizando o programa SPSS statistics da IBM.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A percepção dos produtores de queijo artesanal do Estado de Pernambuco sobre a presença de aflatoxinas M1 foi apresentada na Tabela 1. De uma maneira geral, a resposta mais frequente quanto o grau de concordância entre os produtores rurais foi “Não Sei”, demonstrando a notória ausência de conhecimento dos respondentes quanto

ao tema abordado. Segundo Kimatu & Kanui (2017) é importante investir na informação de produtores rurais para tentar reduzir ou erradicar a produção de aflatoxinas em toda cadeia produtiva de alimentos.

Uma porcentagem significativa dos entrevistados (n=25, 96.15%) afirmaram não saber que as aflatoxinas são substâncias tóxicas produzidas por fungos, assim como 88.46% (n=23) não sabiam que estas micotoxinas são prejudiciais a saúde do homem e dos animais. Esses resultados são preocupantes, pois de acordo com Oliveira & Corrassim (2014) a exposição crônica às aflatoxinas pode ocasionar problemas na saúde humana e animal. O consumo de aflatoxinas por vacas em lactação pode provocar uma redução no consumo de alimentos e consequente diminuição na produção de leite, em contrapartida, o consumo pelos humanos pode ocasionar problemas mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos, com destaque para o aumento na incidência de câncer hepático.

Apenas três produtores (11,54%) concordaram totalmente que as aflatoxinas podem ser encontradas na ração, assim como que, seu preparo e armazenamento adequado previnem o aparecimento desta micotoxina. Segundo Gonçalves *et* al. (2020) os alimentos e rações fornecidos aos rebanhos leiteiros são bastante susceptíveis ao ataque de cepas micotoxigênicas.

Aproximadamente 80,77% dos entrevistados (n=21) afirmaram não saber que as aflatoxinas são capazes de passar da ração contaminada para o leite e após o processamento para o queijo. Equivocadamente 19,23% dos produtores (n=05) concordaram totalmente que o tratamento térmico reduz a quantidade de aflatoxinas no queijo. Segundo Oliveira & Corrassim (2014) de acordo com os atuais conhecimentos técnicos e científicos, nenhum método é capaz de eliminar as aflatoxinas dos alimentos, sendo necessário adotar as Boas Práticas Agropecuárias como uma medida preventiva.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de aflatoxinas nos alimentos constitui uma grave ameaça à saúde pública e a economia de qualquer nação. Esta pesquisa constatou que a percepção dos produtores de queijo artesanal é inadequada. Esses dados podem se refletir na adoção insuficiente de medidas preventivas como a adoção das Boas Práticas Agropecuárias. Portanto, é importante realizar o monitoramento analítico dos queijos para realizar uma avaliação da exposição na dieta, bem como incentivar ações de educação sanitária em toda cadeia produtiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Claeys, L. *et al*. Mycotoxin exposure and human cancer risk: a systematic review of epidemiological studies. **Compr Rev Food Sci Food Saf**, v. 19, p. 1449-1464, 2020.

Gonçalves, Bruna Leonel *et al*. Aflatoxin M_1: biological decontamination methods in milk and cheese. **Food Sci. Technol**, v. 42, p. 22920, 2020.

Jiang, Y *et al.* Aflatoxin in Dairy Cows: Toxicity, Occurrence in Feedstuffs and Milk and Dietary Mitigation Strategies. **Toxins**, v. 13, p. 283, 2021.

Paraffin, A. S.; Zindove, T. J.; Chimonyo, M, Perceptions of factors affecting milk quality and safety among large- and small-scale dairy farmer in Zimbabwe. **Jornal of Food Qualty**, v.18, 7pages, 2018.

INCIDÊNCIA E NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO POR AFLATOXINA M1 EM QUEIJOS PRODUZIDOS EM PERNAMBUCO, 2022

Isabela Maria de Moura Silva[1], Adriano Gomes da Cruz[2], Luzianna Macedo Fonseca[3], Sher Ali[4], Lucas Gabriel Dionisio Freire[4], Carlos Augusto Fernandes de Oliveira[4], Carlos Humberto Corassin[4], Rodrigo Barbosa Acioli de Oliveira[1]

[1]Departamento de Ciências do Consumo, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Pernambuco, Brasil. [2]Departamento de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Rio de Janeiro, Brasil. [3]Departamento de Zootecnia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, São Paulo, Brasil. [4]Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Zootecnia e Engenharia dos alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, São Paulo, Brasil

INTRODUÇÃO

Produzir alimentos com a garantia da isenção de substâncias tóxicas, constitui um grande desafio para a indústria, tendo em vista que envolve esforços em toda cadeia produtiva. Diante da grande variedade de produtos lácteos, o queijo se destaca como um dos mais propensos ao acúmulo de aflatoxinas devido à elevada afinidade destes metabólitos tóxicos pelas micelas de caseína. A aplicação de calor durante o processamento do leite não é capaz de eliminar esta micotoxina devido sua elevada estabilidade (Campagnollo et al., 2016).

A incidência de aflatoxinas M1 em produtos lácteos representa um risco potencial à saúde, especialmente nas populações mais vulneráveis como bebês, crianças e idosos. Adicionalmente, essas substâncias podem provocar danos hepáticos, diminuição da imunidade e, em último caso, a morte dos indivíduos. (Claeys et al., 2020).

O queijo é um dos produtos lácteos mais populares do mundo, afinal é consumido por pessoas de todas as idades devido suas excelentes propriedades nutricionais e características sensoriais (Khaneghah et al., 2021). Dessa maneira, esta pesquisa teve o objetivo de investigar a incidência e os níveis de contaminação de aflatoxinas M1 em queijos coalho e mussarela produzidos no Estado de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta investigação foi conduzida entre os meses de março a maio de 2022 através da análise de 28 amostras de queijo coletadas em propriedades rurais (queijo artesanal) e lacticínios (queijo industrializado) situados no Agreste e Sertão do Estado de Pernambuco. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos da Universidade de São Paulo Os procedimentos analíticos adotados para detecção e quantificação de AFM1 em queijos seguiram a metodologia proposta por Jager et al. (2013), utilizando Cromatografia Líquída de Alta Eficiência (CLAE) utilizando o cromatógrafo Shimadzu 10VP (Kyoto, Japão) acoplado com detector de fluorescência 10 AXL (excitação a 360 nm e emissão acima de 440 nm). Os resultados foram analisados através de estatística descritiva, comparação das médias pela ANOVA e aplicação do teste de Tukey 5% com utilização do software XLSTAT 2022.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A investigação sobre a incidência de aflatoxinas M1 em queijos produzidos Pernambuco revelou que todas amostras (n=28) estavam contaminadas. Esses resultados reforçam a importância de monitorar continuamente essas micotoxinas nos produtos lácteos tendo em vista a sua importância econômica e para saúde pública.

Os teores de AFM1 nos queijos coalho e mussarela (artesanal e industrializado) produzidos entre os meses de março e maio de 2022 situaram-se entre 0.026µg/Kg e 0.132µg/Kg. Estas concentrações constataram um baixo nível de contaminação, e estes resultados podem ser reflexo do período de coleta das amostras situado na estação do outono. Segundo Polat & Gul (2014) a colheita e a secagem adequada na estação do outono de culturas vegetais utilizadas como forragem para vacas em lactação apresentam menor risco de contaminação por micotoxinas, consequentemente o leite e queijo produzido apresentam menores concentrações de AFM1.

A comparação entre os níveis de contaminação dos diferentes tipos de queijo demonstrou que o queijo mussarela artesanal possui uma concentração de AFM1 significativamente maior que o queijo coalho industrializado (0.065 e 0.039µg/Kg, respectivamente). Essas diferenças podem estar associadas a tecnologia de fabricação e as características físico-químicas desses produtos.

A análise do perfil de distribuição das amostras por nível de contaminação revelou uma predominância na faixa de 0.30-0.50µg/Kg (n=21). Adicionalmente, uma amostra de queijo mussarela industrializado apresentou nível de contaminação maior que 0.100µg/Kg, entretanto, nenhuma ultrapassou os limites permitidos pela legislação brasileira que estabelece uma concentração máxima de 2.5µg/Kg (BRASIL, 2011). O limite permitido no Brasil é maior que o estabelecido em outros países pelo mundo, como por exemplo, no Iran (0.25µg/Kg), Itália (0.45µg/Kg), Aústria e Suíca (0.25µg/Kg) (Oliveira et al., 2011).

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A elevada taxa de incidência de AFM1 nas amostras de queijo coalho e mussarela produzidas em Pernambuco em 2022 reforçou a necessidade do contínuo monitoramento desta micotoxina de grande relevância para a saúde pública. Entretanto, todas amostras pesquisadas atenderam os limites estabelecidos pela legislação brasileira. Finalmente, diferenças significativas nas médias de concentração de AFM1 nos queijos coalho e mussarela foram constatadas, sugerindo a necessidade de investigação do efeito da tecnologia de processamento

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Ministério da Saúde: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2011.

Campagnollo, F. B. et al. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: A review. Food Control, v. 68, p. 310-329, 2016.

Claeys, L. et al. Mycotoxin exposure and human cancer risk: a systematic review of epidemiological studies. Compr Rev Food Sci Food Saf, v. 19, p. 1449-1464, 2020.