

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E**  
**TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**DISSERTAÇÃO**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E PESQUISA DE AFLATOXINA M<sub>1</sub> EM**  
**QUEIJO PARMESÃO RALADO**

**FELIPE MACHADO TROMBETE**

**2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E PESQUISA DE AFLATOXINA M<sub>1</sub> EM  
QUEIJO PARMESÃO RALADO**

**FELIPE MACHADO TROMBETE**

*Sob a Orientação do Professor*

**Marcelo Elias Fraga**

*e Co-orientação da Professora*

**Tatiana Saldanha**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2012.

664.66  
T849a  
T

Trombete, Felipe Machado, 1988-  
Avaliação da qualidade e pesquisa de  
aflatoxina M<sub>1</sub> em queijo parmesão ralado /  
Felipe Machado Trombete. - 2012.  
59 f.: il.

Orientador: Marcelo Elias Fraga.

Dissertação (mestrado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de  
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos.

Inclui bibliografia.

1. Queijo parmesão - Microbiologia -  
Teses. 2. Queijo parmesão - Qualidade -  
Teses. 3. Aflatoxina - Teses. I. Fraga,  
Marcelo Elias, 1967- II. Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de  
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos. III. Título.

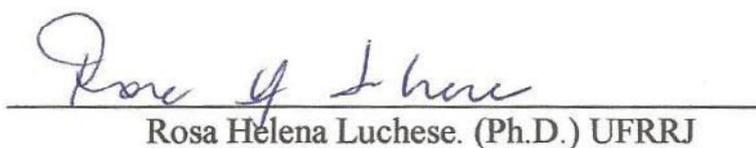
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS**

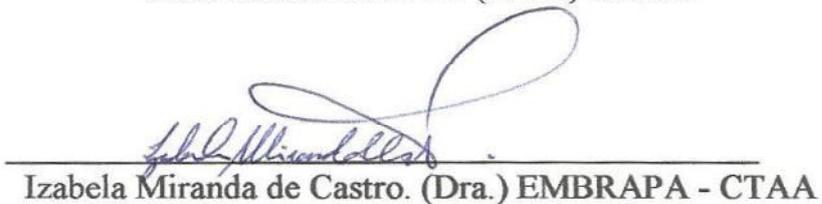
**FELIPE MACHADO TROMBETE**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/02/2012

  
Marcelo Elias Fraga. (Dr.) UFRRJ  
(Orientador)

  
Rosa Helena Luchese. (Ph.D.) UFRRJ

  
Izabela Miranda de Castro. (Dra.) EMBRAPA - CTAA

## AGRADECIMENTOS

- § Primeiramente à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, Instituição de ensino que me proporcionou a realização do Mestrado pelo Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - PPGCTA, onde adquiri nestes dois anos valiosos conhecimentos através de grandes mestres;
- § Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de pesquisa através do Programa de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais – REUNI, a qual foi fundamental na realização deste Curso;
- § Ao Orientador Dr. Marcelo Elias Fraga e Co-Orientadora Dra. Tatiana Saldanha, que sempre estiveram à disposição na realização de cada etapa deste projeto. Obrigado pelo apoio e pelos ensinamentos;
- § À equipe de pesquisadores e analistas do Laboratório de Resíduos e Contaminantes da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, M.Sc. Alessandra da Silva Teixeira, Dra. Maria de Lourdes Mendes de Souza e Dra. Izabela Miranda de Castro;
- § Às professoras que me orientaram na elaboração do projeto inicial, sempre com grande interesse e disposição: Dra. Verônica Lobato e Dra. Arlene Gaspar;
- § Às professoras que participaram da banca de qualificação, criticando e sugestionando a melhor forma de conduzir este projeto, Dra. Djalva Santana e Dra. Maria Ivone Barbosa;
- § À professora Dra. Rosa Helena Luchese pela atenção e apoio na realização das análises microbiológicas no DTA-UFRRJ;
- § Ao M.Sc. Juarez Vicente (LAAB-UFRRJ) pelos esclarecimentos necessários em vários momentos e apoio na condução das análises químicas;
- § Às Técnicas Edina e Edilene (LAAB-UFRRJ), pelo treinamento inicial das análises microbiológicas e pela atenção e dedicação, sempre quando necessárias;
- § Às amigas Nutricionistas, Ellen Almeida dos Santos e Dilcilene Fagundes Sabaa-Srur, pelo apoio complementar à banca de defesa e pela amizade.

### *Aos familiares:*

- § Agradeço-os pelo apoio e incentivo durante estes anos. Sem dúvidas, a concretização deste Curso não teria sido possível sem a participação de vocês. Em especial à minha Mãe Neide, irmão Vinícius, Pai Valter, Tio Benedito e sua esposa Carla e Tia Rita.

*Aos amigos:*

- § Obrigado ao apoio de todos. Agradeço ao carinho prestado: Carolina Andrade, Emerson Pereira, Fabrícia Ferreira e Paula Oliveira (companheira desbravadora!). Meus grandes amigos que não perderam o contato mesmo devido à distância;
- § Aos colegas Mestres em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo PPGCTA-UFRRJ da Turma de 2010, os quais trilharam este mesmo caminho. Futuros professores, pesquisadores e profissionais da área, os quais eu cito a seguir: SOUZA, André Luis de; RODRIGUES, Felipe R.; SILVA, Gabriela V.; AMARAL, Gabriela V.; GONÇALVES, Ingrid da M.; BARRABIN, Juliana S.; ANDRADE, Kelita L. S.; MOURA, Luciana S. de M.; PELOSSI, Mariana S.; SANTOS, Mayra G. N. dos; SANTOS, Regiane R. dos; ROCHA, Renata P.; TAVARES, Rodrigo D. O.; ZUVANOV, Virgínia L.; MELEIRO, Vitor da C. et al!
- § Agradeço em especial ao grande companheiro, Dione Charles de Noronha.

*“Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã” Chico Xavier.*

## **BIOGRAFIA**

FELIPE MACHADO TROMBETE, filho de Neide Joana Machado Trombete e Valter Trombete, nasceu em Americana, Estado de São Paulo, no dia 08 de setembro de 1988.

Formou-se em 2006 como Técnico em Agricultura e Zootecnia pelo antigo Centro Federal de Educação Tecnológica – CEFET Bambuí, MG.

Em 2010 graduou-se em Tecnologia em Alimentos no então Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia – IFMG Campus Bambuí. Durante o Curso Superior foi aluno de iniciação científica e bolsista da FAPEMIG, desenvolvendo pesquisas nas áreas de análises sensoriais e físico-químicas de frutos do cerrado.

Em 2010 ingressou no Mestrado Acadêmico pelo Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde desenvolveu pesquisas voltadas às áreas de análises químicas, microbiológicas e micotoxinas em derivados lácteos, submetendo-se à defesa de dissertação em 29 de fevereiro de 2012.

Atualmente é aluno de doutorado pelo PPGCTA da UFRRJ na área de Ciência de Alimentos, tendo ingressado em março de 2012. O tema do seu projeto de doutoramento refere-se à otimização da técnica de ozonização em grãos de trigo e avaliação da influência do processo sob micobiota, micotoxinas e qualidade química e tecnológica do alimento.

## RESUMO

TROMBETE, Felipe Machado. **Avaliação da qualidade e pesquisa de aflatoxina M<sub>1</sub> em queijo parmesão ralado**. 2012. 45p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2012.

O queijo parmesão ralado é um alimento popularmente consumido no Brasil e, na última década poucos trabalhos objetivaram estudar sua qualidade. Esta pesquisa objetivou avaliar a adequação do queijo parmesão ralado comercializado na Região Metropolitana do Rio de Janeiro em relação ao preconizado pela legislação atual e também pesquisar os índices de aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) no produto. Para tal, foram analisadas 30 amostras representativas das 10 principais marcas comercializadas na região. Na pesquisa da qualidade, foram analisados os teores de umidade, atividade de água, pH, acidez titulável, conservante ácido sórbico e microrganismos indicadores da qualidade higiênica e sanitária. Já a pesquisa de AFM<sub>1</sub> foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (CLAE-DF), precedida de purificação por Cromatografia de Imunoafinidade. Apenas 14 amostras das 30 analisadas (46,7%) estavam em acordo com a legislação que regulamenta a qualidade do produto. Além da falta de uniformidade na produção, as principais irregularidades constatadas foram referentes ao excessivo teor de umidade e também pela adição abusiva do conservante ácido sórbico. Tais resultados sugerem a ocorrência de falhas nas Boas Práticas de Fabricação pelas indústrias responsáveis pelas marcas analisadas, o que representa além de fraude econômica, riscos à saúde do consumidor, mesmo que de forma indireta. Com relação a pesquisa de AFM<sub>1</sub>, todas as amostras se adequaram a legislação nacional. No entanto, o limite existente para a presença da toxina neste produto é excessivamente alto quando comparado com os estabelecidos por outros países. Se comparado com a regulamentação predominante na União Européia, 8 amostras (26,7%) poderiam ser consideradas contaminadas.

**Palavras chave:** Micotoxina. Qualidade microbiológica. Análises químicas. Cromatografia de Imunoafinidade. AFM<sub>1</sub>.

## ABSTRACT

TROMBETE, Felipe Machado. **Quality assessment and survey of aflatoxin M<sub>1</sub> in grated parmesan cheese**. 2012. 45p. Dissertation (Master in Food Science) - Institute of Technology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2012.

The grated parmesan cheese is a food commonly consumed in Brazil and, in the last decade, few studies evaluated their quality. The aim of this research was to evaluate the adequacy and the levels of aflatoxin M<sub>1</sub> in the grated parmesan cheese marketed in the Metropolitan Region of Rio de Janeiro in relation to the recommendations of current legislation. For this, were analyzed 30 samples representing 10 major brands sold in the region. In the evaluation of quality, were analyzed the levels of moisture, water activity, pH, acidity, sorbic acid and indicator microorganisms of hygienic quality and sanitary. The research of AFM<sub>1</sub> was carried out by high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-DFL) preceded by purification by immunoaffinity chromatography. Only 14 of the 30 samples analyzed (46.7%) were in accordance with the legislation that regulates the product quality. Beyond the lack of uniformity in production, the major irregularities were due to excessive moisture content and also by the abusive addition of the preservative sorbic acid. These results suggest the occurrence of faults on Good Manufacturing Practices by the industries responsible for the brands tested, which represents beyond economic fraud, risks to consumers health, even if indirectly. With relation to research of AFM<sub>1</sub>, all samples showed satisfactory values with the national legislation. However, the existing limit for aflatoxin in this product is excessively high when compared with those established by others countries. If compared with the regulation prevailing in the European Union, 8 samples (26.7%) could be considered contaminated.

**Palavras chave:** Mycotoxin. Microbiological quality. Chemical analysis. Immunoaffinity chromatography. AFM<sub>1</sub>.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- FIGURA 1** - Estrutura molecular da Aflatoxina M<sub>1</sub> ..... 07
- FIGURA 2** – Citações em periódicos científicos de diferentes regiões do mundo envolvendo o tema Aflatoxina M<sub>1</sub> ao longo dos anos..... 08
- FIGURA 3** – Teoria dos obstáculos de Leistner aplicada à alimentação animal e prevenção da contaminação de leite e derivados por AFM<sub>1</sub> ..... 13
- FIGURA 4** – Teoria dos obstáculos de Leistner aplicada à alimentação animal e prevenção da contaminação de leite e derivados por AFM<sub>1</sub>. Efeito trampolim ocorrido devido à elevada % UR do ambiente..... 14

### CAPÍTULO II

- FIGURA 1** – Exemplificação dos diferentes métodos de extração de AFM<sub>1</sub> avaliados em amostra de queijo parmesão ralado ..... 27
- FIGURA 2** - Curva analítica para quantificação de AFM<sub>1</sub> em queijo parmesão ralado.... 29
- FIGURA 3** – Cromatograma obtido por CLAE-DF em amostra de queijo parmesão ralado contaminado artificialmente com 1 µg.Kg<sup>-1</sup> de AFM<sub>1</sub> ..... 30
- FIGURA 4** – Valores de AFM<sub>1</sub> (µg.Kg<sup>-1</sup>) encontrados nas amostras de queijo parmesão ralado comercializadas na região metropolitana do Rio de Janeiro em 2011..... 31

### CAPÍTULO III

- FIGURA 1** – Valores de umidade encontrados nas amostras de queijo parmesão ralado comercializadas na região metropolitana do Rio de Janeiro em 2011 ..... 40
- FIGURA 2** – Teores do conservante ácido sórbico encontrados nas amostras de queijo parmesão ralado comercializadas na região metropolitana do Rio de Janeiro em 2011.... 41

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**TABELA 1** – Contaminação de queijos por AFM<sub>1</sub> em diferentes regiões do mundo..... **08**

**TABELA 2** - Limites máximos de aflatoxina M<sub>1</sub> admissíveis em alimentos nacionais de consumo humano..... **10**

**TABELA 3** – Legislação Internacional para aflatoxina M<sub>1</sub> em leite e derivados ..... **10**

### CAPÍTULO II

**TABELA 1** – Valores de recuperação obtidos através da Metodologia A em amostras de queijo parmesão ralado adicionadas de 0,5 e 1,0 µg.Kg<sup>-1</sup> de AFM<sub>1</sub> ..... **28**

**TABELA 2** – Valores de recuperação obtidos através da Metodologia B em amostras de queijo parmesão ralado adicionadas de 0,5 e 1,0 µg.Kg<sup>-1</sup> de AFM<sub>1</sub>..... **28**

**TABELA 3** – Valores de recuperação obtidos através da Metodologia C em amostras de queijo parmesão ralado adicionadas de 0,5 e 1,0 µg.Kg<sup>-1</sup> de AFM<sub>1</sub> ..... **28**

**TABELA 4** - Níveis de AFM<sub>1</sub> encontrados em amostras de queijo parmesão ralado comercializadas na Região Metropolitana do Rio de Janeiro em 2011 ..... **30**

### CAPÍTULO III

**TABELA 1** – Critérios microbiológicos de aceitação para queijo ralado elaborado com única variedade de queijo de baixa umidade..... **38**

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>%</b>	Porcentagem
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μg</b>	Micrograma
<b>r<sup>2</sup></b>	Coefficiente de correlação
<b>Aa</b>	Atividade de água
<b>AFB<sub>1</sub></b>	Aflatoxina B <sub>1</sub>
<b>AFG<sub>1</sub></b>	Aflatoxina G <sub>1</sub>
<b>AFG<sub>2</sub></b>	Aflatoxina G <sub>2</sub>
<b>AFM<sub>1</sub></b>	Aflatoxina M <sub>1</sub>
<b>AFs</b>	Aflatoxinas
<b>ANIVSA</b>	Agência Nacional de vigilância Sanitária
<b>BPF</b>	Boas Práticas de Fabricação
<b>C</b>	Carbono
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>CNNPA</b>	Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
<b>CV</b>	Coefficiente de Variação
<b>DFL</b>	Detector de Fluorescência
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>DVA</b>	Doença Veiculada por Alimentos
<b>et al.</b>	E outros
<b>etc.</b>	<i>et coetera</i> : e assim por diante
<b>FAO</b>	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
<b>g</b>	Grama
<b>IAL</b>	Instituto Adolfo Lutz
<b>INMETRO</b>	Instituto Nacional de Metrologia
<b>Kg</b>	Quilograma
<b>L</b>	Litro

<b>LD</b>	Limite de Detecção
<b>LQ</b>	Limite de Quantificação
<b>m</b>	Metro
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>mg</b>	Miligrama
<b>min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrogênio
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>ng</b>	Nanograma
<b>n°</b>	Número
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>ppb</b>	Partes por bilhão
<b>ppm</b>	Partes por milhão
<b>RJ</b>	Rio de Janeiro
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>rpm</b>	Rotação por minuto
<b>seg</b>	Segundo
<b>SIF</b>	Serviço de Inspeção Federal
<b>sp</b>	Espécie
<b>spp</b>	Espécies
<b>UE</b>	União Européia
<b>UFRRJ</b>	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
<b>UHT</b>	Ultra High Temperature
<b>UR</b>	Umidade Relativa
<b>UV</b>	Ultra Violeta

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>01</b>
-------------------------	-----------

### CAPÍTULO I

#### **CONTAMINAÇÃO DE DERIVADOS LÁCTEOS COM AFLATOXINA M<sub>1</sub>: FATORES IMPORTANTES NA OCORRÊNCIA E PREVENÇÃO**

<b>RESUMO</b> .....	<b>04</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>05</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>06</b>
<b>2 DESENVOLVIMENTO</b> .....	<b>07</b>
<b>2.1</b> Contaminação e ocorrência de AFM <sub>1</sub> em leite e derivados lácteos .....	<b>07</b>
<b>2.2</b> Legislação atual sobre AFM <sub>1</sub> em alimentos .....	<b>09</b>
<b>2.3</b> Métodos de Quantificação de AFM <sub>1</sub> .....	<b>11</b>
<b>2.4</b> Prevenção e controle da contaminação de AFM <sub>1</sub> em alimentos .....	<b>12</b>
<b>2.4.1</b> Aplicação da Teoria dos Obstáculos de Leistner aos alimentos destinados ao gado leiteiro .....	<b>12</b>
<b>2.4.2</b> Métodos convencionais e alternativos de descontaminação e prevenção da contaminação por aflatoxinas .....	<b>14</b>
<b>3 CONCLUSÕES</b> .....	<b>15</b>
<b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>15</b>

### CAPÍTULO II

#### **AFLATOXINA M<sub>1</sub> EM QUEIJO PARMESÃO RALADO COMERCIALIZADO NA REGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO**

<b>RESUMO</b> .....	<b>22</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>23</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>2 METODOLOGIA</b> .....	<b>25</b>
<b>2.1</b> Amostragem .....	<b>25</b>
<b>2.2</b> Extração e quantificação de AFM <sub>1</sub> .....	<b>25</b>
<b>2.2.1</b> Metodologia A .....	<b>26</b>

2.2.2	Metodologia B .....	26
2.2.3	Metodologia C .....	26
2.3	Quantificação de AFM <sub>1</sub> .....	27
2.4	Critérios de validação .....	27
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>28</b>
3.1	Resultados dos ensaios de recuperação .....	28
3.2	Quantificação de AFM <sub>1</sub> nas amostras analisadas .....	29
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>32</b>

### CAPÍTULO III

#### AVALIAÇÃO DA QUALIDADE QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO PARMESÃO RALADO COMERCIALIZADO NO RIO DE JANEIRO

	<b>RESUMO</b> .....	<b>36</b>
	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>37</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>38</b>
<b>2</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>46</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O queijo ralado industrializado é um produto largamente consumido no Brasil e utilizado tradicionalmente no preparo de alimentos como massas e molhos, devido principalmente às suas características sensoriais, preço acessível e também por ser um alimento pronto para consumo.

O queijo parmesão ralado é aquele elaborado a partir do parmesão, um queijo caracterizado pela consistência compacta e granulosa, de cor amarelada e sabor picante. A obtenção do produto ocorre através do esfrelamento ou ralagem do parmesão, seguido do processo de desidratação.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA permite durante a produção do queijo parmesão ralado a introdução de queijos não adequados para venda ao público. No entanto, esta permissão refere-se apenas àqueles impróprios para comercialização por motivos morfológicos ou de apresentação.

A prática ilegal adotada por algumas indústrias processadoras de queijo ralado é incluir no processo de ralagem queijos não aptos ao consumo por outros motivos, e, ainda nesta etapa do processamento, incorporar outros tipos de queijo de menor valor comercial, não indicando esta mistura no rótulo, o que certamente constitui-se em fraude.

Esta adulteração do produto compromete sua qualidade final e caracteriza um risco à saúde do consumidor, já que a qualidade da matéria prima torna-se questionável. No entanto, é um tipo de fraude difícil de ser percebida tanto pelo consumidor, já que o produto apresenta-se em pó, quanto por métodos analíticos.

O controle da qualidade do queijo ralado é então realizado através da avaliação de parâmetros químicos intrínsecos do alimento, bem como pela pesquisa de microrganismos indicadores da qualidade higiênica e sanitária do produto.

Na pesquisa das características químicas, tais como pH, Atividade de água (Aa), umidade, acidez, dentre outros, o objetivo principal é a caracterização e avaliação da adequabilidade, ou não, do produto frente ao que é preconizado pela atual legislação. Valores acima dos permitidos, como em pesquisas de conservantes, por exemplo, são limitantes ao consumo do alimento, indicando comportamento abusivo e fraudulento do fabricante.

Já quanto ao risco da contaminação microbiológica, este é existente desde o momento da obtenção do leite, seguindo pelas diversas etapas da produção até a aquisição e o armazenamento do produto final pelo consumidor. Assim a indústria de laticínios deve ter preocupação constante com as Doenças Veiculadas por Alimentos - DVAs, já que as oportunidades de contaminação são muitas e o leite e seus derivados apresentam características ideais para o desenvolvimento microbiano.

As falhas ao longo do processamento do queijo ralado podem favorecer o crescimento de microrganismos patogênicos e formação de seus produtos tóxicos. O desenvolvimento de fungos filamentosos é um agravante, pois, além de serem indicadores de má qualidade higiênica, podem através da oxidação dos ácidos orgânicos promover a formação de substâncias que interferem no sabor e, ainda, reduzir a acidez do produto favorecendo o desenvolvimento de bactérias patogênicas.

Além do problema da deterioração microbiológica, algumas espécies de fungos filamentosos podem promover a formação de toxinas nos alimentos destinados ao gado leiteiro, que após o consumo, são metabolizadas pelo organismo animal e eliminadas nas fezes, urina e no leite. Estas toxinas fúngicas são denominadas micotoxinas e se tornaram um problema de saúde pública em todo o mundo devido aos efeitos tóxicos que causam aos animais e aos seres humanos.

Dentre as micotoxinas existentes, as aflatoxinas merecem maior preocupação devido a alta incidência em diferentes grupos de alimentos. Do grupo das aflatoxinas, a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) é considerada a de maior potencial tóxico ao homem, e, quando o animal aingere, ela é eliminada no leite como um metabólito, denominado aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>).

AFM<sub>1</sub> quando presente em altas concentrações no leite e derivados é motivo de grande preocupação em saúde pública, principalmente para crianças e recém nascidos, já que não é um metabólito inativo, possuindo reconhecido efeito mutagênico para várias espécies, inclusive humanos. Desta forma, o leite e seus derivados são considerados os veículos para introdução da AFM<sub>1</sub> na dieta humana.

Outro fato preocupante é que, a partir da concentração da matéria prima, como ocorre na fabricação do leite em pó, leite condensado, requeijão e queijos, AFM<sub>1</sub> pode aumentar sua proporção no produto final, em função da redução do teor de água dos produtos.

A partir do ano de 2011, foi estipulado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA) o limite máximo tolerado de AFM<sub>1</sub> em queijo de 2,5 µg.Kg<sup>-1</sup>, além dos já existentes para leite e leite em pó (0,5 e 5,0 µg.Kg<sup>-1</sup>, respectivamente), sendo estes os únicos alimentos de origem láctea com limites fixados.

Desta forma, pesquisar a qualidade do queijo ralado atualmente comercializado no país, incluindo a pesquisa e quantificação de AFM<sub>1</sub> é de grande relevância, podendo-se desta forma, adquirir informações sobre a adequação dos produtos analisados em relação ao que regulamenta a atual legislação, exercendo ainda um papel informativo à sociedade, e ao mesmo tempo, incentivando a indústria a melhorar continuamente a qualidade deste produto.

Ressalta-se que, no Brasil, importantes estudos sobre tais assuntos estão sendo realizados, onde pode-se observar grande interesse das instituições de pesquisa sobre o tema.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade química, microbiológica e determinar os níveis de AFM<sub>1</sub> em amostras de queijo parmesão ralado comercializadas na Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Este estudo foi dividido em três capítulos, de acordo como exposto a seguir: No CAPÍTULO I é apresentada uma revisão de literatura sobre a contaminação de derivados lácteos com aflatoxina M<sub>1</sub>, abordando os principais fatores da contaminação e prevenção. No CAPÍTULO II é apresentado um estudo sobre diferentes metodologias de extração de AFM<sub>1</sub> e sua quantificação em amostras de queijo parmesão ralado. O CAPÍTULO III refere-se à avaliação da qualidade química e microbiológica do queijo parmesão ralado comercializado no Rio de Janeiro.

## **CAPÍTULO I**

**CONTAMINAÇÃO DE DERIVADOS LÁCTEOS COM AFLATOXINA M<sub>1</sub>:  
FATORES IMPORTANTES NA OCORRÊNCIA E PREVENÇÃO**

**CONTAMINATION OF DAIRY PRODUCTS WITH AFLATOXIN M<sub>1</sub>: IMPORTANT  
FACTORS IN THE OCCURRENCE AND PREVENTION**

**Submetido para publicação na REVISTA HIGIENE ALIMENTAR**

## RESUMO

No Brasil, muitas pesquisas têm objetivado avaliar a exposição de AFM<sub>1</sub> em derivados lácteos industrializados. A incidência desta toxina em alimentos é considerada uma questão de saúde pública devido sua capacidade mutagênica e alta estabilidade aos processos industriais nos quais o leite é submetido durante a fabricação de derivados. Nesta revisão abordaram-se os principais assuntos referentes à ocorrência e prevenção da contaminação por AFM<sub>1</sub> em derivados lácteos. Foram discutidos os novos limites estabelecidos a partir de 2011 pela ANVISA e os métodos de quantificação mais comumente utilizados. A partir da Teoria dos Obstáculos de Leistner, foi elaborado um esquema ilustrativo das principais barreiras à contaminação dos alimentos com aflatoxinas e conseqüentemente da prevenção ao risco de transmissão de AFM<sub>1</sub> ao leite e derivados. Métodos convencionais e alternativos de descontaminação e prevenção da contaminação por aflatoxinas também foram abordados. Conclui-se que a melhor forma de evitar a contaminação do leite e seus derivados por AFM<sub>1</sub> ainda é a redução do risco de formação de aflatoxinas na dieta animal. Desta forma, impedir a prevalência das condições ideais ao desenvolvimento do fungo são de extrema importância, principalmente àquelas relacionadas à estocagem do alimento.

**Termos para indexação:** Micotoxina, *Aspergillus* spp, aflatoxina B<sub>1</sub>, leite, Teoria dos Obstáculos.

## ABSTRACT

In Brazil, many studies have aimed to evaluate the exposure of AFM<sub>1</sub> in dairy products. The incidence of this toxin in food is considered a public health issue due to its mutagenic capacity and high stability to the industrial processes in which the milk is submitted to the manufacture of dairy products. In this review has addressed the main subjects related to the occurrence and prevention of contamination with AFM<sub>1</sub> in dairy products. Were discussed the new limits established in 2011 by ANVISA and quantification methods most commonly used. Based on the Theory of Obstacles of Leistner, was constructed a schematic illustration of the main barriers to prevent contamination of food with aflatoxins and consequently prevention of the risk of transmission of AFM<sub>1</sub> in milk and dairy products. Conventional and alternative methods for decontamination and prevention of aflatoxin contamination were also addressed. The best way to prevent milk and dairy products contamination with AFM<sub>1</sub> is reduce the risk of the contamination with aflatoxin in the animal diet. Prevent the prevalence of ideal conditions for fungus development, are of extreme importance, especially those related to food storage.

**Index terms:** Mycotoxins, *Aspergillus* spp, aflatoxin B<sub>1</sub>, milk, Theory of Obstacles.

# 1 INTRODUÇÃO

A alta incidência de micotoxinas nos alimentos tem causado preocupações a nível mundial. A partir do ano de 2011, o Ministério da Saúde através da ANVISA, estabeleceu novos limites para diversos grupos de micotoxinas em alimentos e matérias primas destinados ao consumo humano, tais como aflatoxinas, ocratoxina, desoxinivalenol, fumonisinas, patulina e zearalenona, até então inexistentes na legislação brasileira (BRASIL, 2011).

As micotoxinas se tornaram um problema de saúde pública em todo o mundo devido aos efeitos tóxicos e mutagênicos que podem causar em animais e aos seres humanos (WHO, 2002). Estas substâncias são produzidas por fungos filamentosos, principalmente os dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, sendo consideradas como metabólitos secundários de baixo peso molecular, formadas por uma série de compostos de diferentes toxicidades (IHESHIULOR et al., 2011).

A contaminação pode ocorrer na fase agrícola, durante o armazenamento ou no processamento dos alimentos (RASFF, 2009). A síntese da micotoxina constitui uma forma de redução da quantidade de nutrientes não mais requeridos pelo fungo, ocorrendo durante o final da fase exponencial de crescimento, quando precursores de metabólitos primários são acumulados (IHESHIULOR et al., 2011; JAY, 2000; FORSYTHE, 2000).

Atualmente, são reconhecidos centenas de fungos produtores de micotoxinas, com mais de quatrocentas já identificadas (DILKIN et al., 2002). As aflatoxinas são o grupo considerado de maior relevância, devido à ampla ocorrência e importantes efeitos tóxicos ao homem e animais (ARANA et al., 2011; RITTER; HOELTZ; NOLL, 2011; SANTURIO, 2000).

Já foram identificadas quatro espécies de *Aspergillus* produtores de aflatoxinas, denominadas *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* e *A. pseudotamarii*. No entanto, apenas as duas primeiras representam importância econômica (CORTYL, 2008).

Devido às condições propícias para o crescimento de todo tipo de fungos aflatoxigênicos no Brasil, os produtos de origem animal, como carne, ovos e leite, podem ser fontes indiretas de contaminações por aflatoxinas, visto que, várias ocorrências foram relatadas em diferentes tipos de alimentos, a maioria ainda sem legislação específica quanto aos limites aceitáveis (MAZIERO; BERSOT, 2010).

Na cadeia produtiva de queijos e demais derivados lácteos, a contaminação por aflatoxinas ocorre pelo uso do leite contaminado com AFM<sub>1</sub>. De acordo com Hussein e Brasel (2001), quando um animal ingere um alimento contaminado com AFB<sub>1</sub>, de 0,5 a 5% da toxina é biotransformada no fígado em AFM<sub>1</sub>, e, em geral, mais de 90% da AFB<sub>1</sub> ingerida é eliminada pelo organismo em até 24 h. Este fato é, sem dúvidas, uma questão de saúde pública e de preocupação mundial, já que são alimentos intensivamente consumidos por bebês, crianças e adultos (SADEGHI, 2009).

A AFM<sub>1</sub>, apesar de ser um metabólito, não é um produto inativo, sendo cancerígeno para várias espécies. É classificada pela Agência Internacional de Pesquisas sobre Câncer – IARC como agente carcinogênico com efeitos na saúde pré e pós-natal em seres humanos ainda não totalmente esclarecidos (IARC, 2002).

Outro fator que deve ser ressaltado com relação a esta contaminação é o fato da AFM<sub>1</sub> ser uma substância bastante estável aos processos em que o leite é utilizado para fabricação de derivados (DEVECI et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão de literatura abordando os principais assuntos referentes a ocorrência e prevenção da contaminação por AFM<sub>1</sub> em derivados lácteos.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Contaminação e ocorrência de AFM<sub>1</sub> em leite e derivados

As aflatoxinas são estruturas policíclicas pertencentes a classe de compostos denominados furanocumarinas e são produzidas pelos fungos do gênero *Aspergillus*, tais como *A. flavus* e *A. parasiticus*. Atualmente são conhecidas mais de 17 com efeitos tóxicos ao homem e animais (ANDRADE, 2004; DILKIN et al., 2002).

Em estado puro são extremamente estáveis em temperaturas de até 200°C e não são afetadas pelo congelamento. Além disso, são incolores, inodoras e não alteram o sabor dos alimentos.

Na União Européia, somente em 2010 foram notificados pelo stema RASFF (The Rapid Alert System for Food and Feed) 679 casos de alimentos contaminados por micotoxinas. Destes, 640 foram referentes às aflatoxinas (11 notificações foram relacionadas com ração para aves importadas do Brasil).

AFB<sub>1</sub> é reconhecida como a micotoxina mais potente dentro deste grupo, sendo produzida por todas as linhagens de fungos aflatoxigênicos (PÁDUA; SILVEIRA; MARTINS, 2002).

AFM<sub>1</sub> é um produto hidroxilado de AFB<sub>1</sub>. Esta última, após ser ingerida pelo animal, passa pelo processo de biotransformação primária no fígado. Neste processo ocorre a hidroxilação da molécula, resultando então na formação de metabólitos tóxicos, tal como a AFM<sub>1</sub>. Estes compostos por conterem o grupo hidroxila são bastante solúveis em água, o que possibilita sua rápida excreção através da urina, bÍlis, fezes ou leite, constituindo então um processo de detoxificação da AFB<sub>1</sub> (ARAÚJO, 2008; HUSSEIN; BRASEL, 2001).

O consumo de alimentos contaminados com aflatoxinas é considerado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) como um dos principais fatores de risco para desenvolvimento de câncer em humanos (BRASIL, 2002). Esta capacidade mutagênica é característica da dupla ligação entre C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> na estrutura de hidrofurofurano da molécula (JAY, 2005). Na Figura 1 é representada a estrutura molecular da AFM<sub>1</sub>.

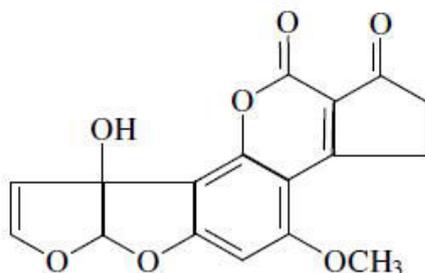


Figura 1 - Estrutura molecular da AFM<sub>1</sub>. Extraído de NOGUEIRA (2009).

Aflatoxinas também são relacionadas com a ocorrência de síndrome de Reye e hepatite crônica (GREMMELS, 2008; DESHPANDE, 2002).

Nos países da União Européia (UE), a Ingestão Diária Aceitável para AFM<sub>1</sub> é de 6,8 ng.kg<sup>-1</sup>, enquanto na América Latina (incluindo o Brasil) é de 3,5 ng.kg<sup>-1</sup> e de 0,7 ng.kg<sup>-1</sup> na África (CREPPY, 2002).

Nos últimos anos observa-se um intensivo aumento nas publicações envolvendo AFM<sub>1</sub> no mundo, com mais de 9.000 citações do tema em bases científicas, como apresentado na Figura 2.

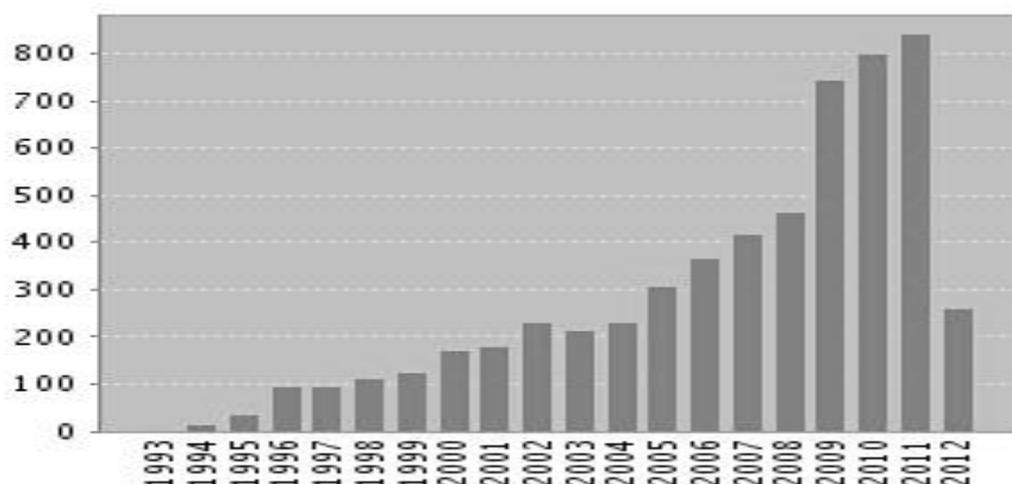


Figura 2 – Citações em periódicos científicos de diferentes regiões do mundo envolvendo o tema AFM<sub>1</sub> ao longo dos anos. Fonte: Web of Knowledge (2012).

Diversos estudos ao redor do mundo têm objetivado quantificar os níveis de contaminação por AFM<sub>1</sub> principalmente em queijos, podendo ser citados os realizados na Ásia (AMER; IBRAHIM, 2010; DASHTI et al., 2009; FALLAH et al., 2011), Brasil (OLIVEIRA et al., 2011; PRADO et al., 2008; PRADO et al., 2001), e Itália (ANFOSSI et al., 2012; MONTAGNA et al., 2008; VIRDIS et al., 2008). Nestes estudos é possível observar que a AFM<sub>1</sub> está amplamente distribuída em diferentes tipos de queijos e por vezes em níveis acima dos limites máximos estabelecidos nestes países

Na Tabela 1 são demonstrados estudos recentes sobre pesquisa de AFM<sub>1</sub> em queijos em diferentes países, incluindo os estudos realizados no Brasil.

Tabela 1 – Contaminação de queijos por AFM<sub>1</sub> em diferentes regiões do mundo

País	Amostras	n *	Amostras Positivas	Maior que 0,25 µg.Kg <sup>-1</sup>	Maior valor (µg.Kg <sup>-1</sup> )	Referência
Itália	Queijos nacionais	102	83% (84)	1 (1%)	0,32	Anfossi et al. (2012)
Iran	Queijo branco	50	30 (60%)	3 (6%)	0,37	Tavakoli et al. (2012)
Lebanon	Queijos nacionais e importados	111	67% (75)	13 (12%)	0,31	Elkak et al. (2012)
Brasil	Queijos nacionais	58	49 (89%)	4 (7%)	0,30	Iha, Barbosa e Okada (2011)
Iran	queijo Lighvan	75	65% (49)	7 (9,3%)	-	Fallah et al. (2011)
Turquia	white-brined Urfa cheese	127	36 (28%)	13 (10%)	0,77	Kav et al. (2011)
Brasil	Queijo Minas Padrão e Minas Frescal	48	13 (27%)	2 (4%)	0,31	Oliveira et al. (2011)
Iran	Queijo branco	72	82% (59)	22 (30%)	1,2	Fallah (2010)
Egito	Queijos nacionais	150	50 (33%)	0 (0%)	0,18	Amer e Ibrahim
Brasil	Queijo parmesão	88	40 (46%)	2 (2%)	0,66	Prado et al. (2008)
Brasil	Queijo prato e parmesão ralado	23	22 (96%)	6 (26%)	0,54	Prado et al. (2001)

Na literatura internacional, estudos recentes relatam contaminações de leite e derivados por AFM<sub>1</sub> (EL KHOURY et al., 2011; ERTAS et al., 2011; SAKUMA et al., 2011), e, no Brasil, muitas pesquisas também têm sido realizadas objetivando avaliar a exposição desta toxina em derivados industrializados.

Iha, Barbosa e Okada (2011) descrevem a contaminação em queijos, iogurtes e bebidas lácteas consumidos no país. Das 123 amostras analisadas, a toxina foi detectada em 84% dos queijos e em 95% das amostras de iogurtes e bebidas lácteas. Os autores consideraram a ingestão destes alimentos como um possível risco à saúde dos consumidores.

Shundo et al. (2009) observaram a contaminação em amostras de leite em pó, pasteurizado e UHT, estimando a ingestão diária de AFM<sub>1</sub> por crianças em 1 ng.kg<sup>-1</sup>, enquanto que para adultos seria de 0,188ng.kg<sup>-1</sup>.

Já com relação aos queijos, os índices de contaminação por aflatoxinas são maiores do que no leite e bebidas lácteas. Devido a afinidade da AFM<sub>1</sub> pela caseína, a concentração deste micotóxina em queijos é maior do que em outros derivados lácteos (ARDIC et al., 2009, ORUC et al., 2007). Hassanin (1994) explica que a AFM<sub>1</sub> associa-se à fração protéica (caseína), ficando nela retida mesmo após a pasteurização e o beneficiamento durante a produção de queijos.

Pesquisa realizada por Galvano et al. (1996) demonstra que de 0,5 a 6% da AFB<sub>1</sub> presente na ração animal aparece no leite sob a forma de AFM<sub>1</sub>. De acordo com Manetta et al. (2009) e López et al. (2001), cerca de 40 a 60% da AFM<sub>1</sub> permanece no soro após coagulação do leite.

Prado et al. (2008b), relataram a presença da toxina em 40 (46,4%) de 88 amostras de queijo parmesão avaliadas no país. Entretanto, somente duas estavam contaminadas em níveis acima do limite máximo permitido (0,25 µg.L<sup>-1</sup>) na UE.

Ressalta-se que mesmo sendo quantificada nos alimentos citados, não era possível classificar o produto como contaminado ou não por AFM<sub>1</sub>, devido a inexistência de uma legislação nacional que estabelecesse os limites máximos toleráveis em derivados lácteos.

## 2.2 Legislação atual sobre AFM<sub>1</sub> em alimentos

A presença de AFM<sub>1</sub> em leite e produtos derivados é considerado um risco potencial a saúde de recém nascidos e crianças por serem estes os maiores consumidores de tais produtos. Consequentemente, diversos países possuem limites regulatórios para a presença de AFM<sub>1</sub> em leite e derivados lácteos. O U.S. FDA (2011) determina o limite máximo para leites de 0,5 µg.Kg<sup>-1</sup>, enquanto a EU estipula o limite de 0,05 0,5 µg.Kg<sup>-1</sup>. A atual legislação brasileira determina o limite máximo de 0,5 µg.Kg<sup>-1</sup> (BRASIL, 2011).

Até o ano de 2010, vigorava no país a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n° 274 de 15 de Outubro 2002, da ANVISA. Este regulamento estabelecia os limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite fluído, em pó, amendoim e milho destinados ao consumo humano (BRASIL, 2002). Outros grupos de micotoxinas não eram contemplados.

Somente a partir de fevereiro de 2011 foi criado pela ANVISA o Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos (BRASIL, 2011), o qual revogou a RDC n° 274 de 2002 e a Resolução CNNPA n° 34 de 1976 (BRASIL, 1976). Esta nova legislação contempla não somente aflatoxinas, mas também estabelece limites máximos para Ocratoxina A, Desoxinivalenol, Fumonisina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, Zearalenona e Patulina em diferentes alimentos.

No entanto, com relação a AFM<sub>1</sub>, os novos limites regulamentam apenas os queijos, além dos já existentes na legislação anterior. A Tabela 2 apresenta os limites máximos de AFM<sub>1</sub> em alimentos estabelecidos pela legislação vigente no país.

Para os alimentos destinados ao consumo animal (matérias-primas e rações), a Portaria nº 07 de 1988 do Ministério da Agricultura, estipula que, para matéria-prima destinada à alimentação direta ou como ingrediente para rações, o limite máximo para aflatoxinas ( $B_1+B_2+G_1+G_2$ ) é de  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (BRASIL, 1996).

Tabela 2 – Limites máximos de  $\text{AFM}_1$  admissíveis em alimentos nacionais de consumo humano

<b>Alimento</b>	<b>Aflatoxina</b>	<b>Limite tolerado</b>
Leite fluido	$M_1$	$0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$
Leite em pó	$M_1$	$5,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$
Queijos	$M_1$	$2,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$

Adaptado de: ANVISA, RDC nº 07 de 2011 (BRASIL, 2011).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2004), definir normas para micotoxinas é uma atividade complexa, que envolve muitos fatores e as partes interessadas. Estes incluem principalmente os fatores científicos, tais como dados sobre os efeitos na saúde humana e animal, níveis de exposição humana, e ainda a disponibilidade de métodos de amostragem e análise eficientes.

Percebe-se ainda uma falta de acordo entre países sobre determinados aspectos da avaliação e gestão de riscos para micotoxinas, mas, nos últimos anos, muitas organizações vêm se deslocando no sentido da harmonização entre países (MAGAN; OLSEN, 2000).

No Brasil o limite de  $\text{AFM}_1$  para leite ( $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) é dez vezes superior ao limite predominante nos países da União Europeia correspondente a  $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$  (EC, 2006) e, com exceção dos queijos, os demais derivados lácteos não possuem limites estabelecidos. A Tabela 3 apresenta os limites de  $\text{AFM}_1$  estipulados em diferentes países.

Tabela 3 - Legislação Internacional para  $\text{AFM}_1$  em leite e derivados

<b>País</b>	<b>Leite fluido (<math>\mu\text{g.Kg}^{-1}</math>)</b>	<b>Alguns derivados Lácteos contemplados (<math>\mu\text{g.Kg}^{-1}</math> ou <math>\text{L}^{-1}</math>)</b>
Argentina	0,05	todos (0,5)
Áustria	0,05	manteiga (0,02); queijos (0,25); leite em pó (0,4)
Brasil	0,50	leite em pó (5,0) e queijos (2,5)
EUA	0,50	todos (0,5)
Suíça	0,05	soro e derivados (0,025); queijos (0,25); manteiga (0,02); leite em pó (0,1)
Turquia	0,05	queijos (0,25)

Fonte: Adaptado de Kaniou-Grigoriadou et al. (2005)

Existe uma grande discordância entre vários países sobre o nível máximo de contaminação com  $\text{AFM}_1$  de  $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$  versus  $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Os países que defendem o nível máximo de  $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  afirmam que poderiam provocar consequências econômicas negativas se reduzissem este limite, e que, o nível de  $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$  seria difícil de ser alcançado em diversas regiões do mundo, ao contrário do primeiro que poderia ser atingido de forma razoável pela totalidade dos países.

De acordo com a EMBRAPA (2007), mesmo o Brasil possuindo limites para  $\text{AFM}_1$ , falta no país maior rigor no cumprimento das legislações, já que, as fiscalizações são esporádicas e os laboratórios encarregados de realizar as análises encontram-se, em sua grande maioria, desprovidos de material e de pessoal especializado.

Deste modo, um fator complicador nas fiscalizações e na avaliação da exposição da AFM<sub>1</sub> são as metodologias de identificação e quantificação, que devem necessariamente ser precisas, exatas, sensíveis, e que ao mesmo sejam rápidas e práticas. Porém, ainda são poucos os laboratórios brasileiros que possuem tais qualidades analíticas.

### **2.3 Métodos de quantificação de AFM<sub>1</sub>**

A maioria dos estudos para quantificação de AFM<sub>1</sub> em derivados lácteos é realizada por utiliza cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia líquida de alta pressão (UPLC) ou ainda por cromatografia em camada delgada (TLC). A detecção é comumente realizada por fluorescência (FLD) ou espectrômetro de massa (MS) nas duas primeiras técnicas (Oliveira et al. , 2011; REN et al., 2007; Cavaliere et al., 2006; Muscarella et al., 2007, BELTRÁN et al., 2011; RUBIO et al. (2011).

Para Fujii, Garcia e Hirooka (2004), a CCD apresenta a vantagem de ser simples e possuir baixo custo e visualização direta do perfil cromatográfico baseado na cor, fluorescência e aspecto da corrida. Entretanto, a baixa sensibilidade do método torna-o pouco eficaz perante os limites permitidos de micotoxinas em alimentos.

Ainda assim é uma técnica que tem sido utilizada em estudos recentes, como nos de Fallah et al. (2011) e Fallah (2010).

Já a HPLC apresenta melhor eficiência e sensibilidade, porém o custo restringe a implantação na rotina laboratorial. São inconvenientes ainda, a demanda considerável de reagentes de alto grau de pureza, equipamento/manutenção de alto custo, tempo de análise significativo e supervisão por técnicos especializados (FUJII; GARCIA; HIROOKA, 2004).

O sistema CLAE-DF é cerca de 30-40 vezes mais sensível que o sistema de detecção por UV para aflatoxinas (AMARAL; MACHINSKI JUNIOR, 2006; TABARI et al., 2011), sendo o mais aconselhável para quantificação.

Métodos imunoquímicos também são utilizados, como nos estudos de Tavakoli et al. (2012); Kim et al. (2000); Lopez et al. (2001) e Pei et al. (2009), ELKAK et al. (2012), Turner et al. (2009) com a desvantagem de possíveis resultados falso-positivos e necessidade da realização de confirmação adicional do resultado (KAV et al., 2011).

Geralmente são usadas como procedimento de triagem na determinação de AFM<sub>1</sub>, devido a sensibilidade, especificidade, rapidez e facilidade de manuseio.

Já o uso de colunas de imunoafinidade (IAC), recentemente aplicadas a técnicas convencionais como HPLC, têm sido largamente utilizadas em pesquisa com AFM<sub>1</sub> devido a alta sensibilidade e especificidade do método. Segundo Amado (1997), estas colunas possuem anticorpos específicos (monoclonais) para isolar a toxina do alimento. A base deste método é a interação entre os antígenos com anticorpos produzidos num organismo animal e fixados na coluna.

A partir de um estudo interlaboratorial ocorrido na Itália e envolvendo diferentes métodos de quantificação de AFM<sub>1</sub> em queijo, Cattaneo et al. (2011) concluíram que o uso de colunas de imunoafinidade são determinantes para se obter bons parâmetros analíticos, principalmente aqueles relacionados com a sensibilidade do método.

Tal metodologia tem sido considerada indispensável, devido a eficácia na remoção de impurezas e concentração de toxinas no extrato bruto (FUJII; GARCIA; HIROOKA, 2004).

No entanto, de acordo com Ramos, Brasil e Geraldine (2008), a utilização de colunas de imunoafinidade apresenta a desvantagem de possuir um elevado custo, chegando a ser aproximadamente seis vezes superior ao do método que utiliza somente CLAE.

Novas metodologias para quantificação de AFM<sub>1</sub> em leite e derivados utilizando biosensores e nanopartículas são descritas nos trabalhos de Dinçkaya et al. (2011).

Ressalta-se ainda que, além da utilização de metodologias confiáveis, a validação contínua destas é extremamente recomendada (RAMOS; BRASIL; GERALDINE, 2008).

Portanto, o emprego de metodologias que sejam específicas e sensíveis são indispensáveis em pesquisas de controle e/ou prevenção de AFM<sub>1</sub> em derivados lácteos. A escolha de qual utilizar irá depender da situação econômica, objetivos da análise, equipe de analistas, entre outros.

## **2.4 Prevenção e controle da contaminação de AFM<sub>1</sub> em alimentos**

A presença de AFM<sub>1</sub> em produtos lácteos elaborados a partir de leite contaminado é um fenômeno já descrito por diversos autores. Desta forma, evitar a contaminação do alimento que será fornecido ao gado leiteiro parece ser a única maneira prática para garantir a segurança do leite e de seus derivados, já que, como reportado por FALLAH et al. (2010), a AFM<sub>1</sub> não é inativada pelos processos térmicos usados na indústria de laticínios, incluindo a pasteurização HTST e tratamento por UHT, mostrando-se ainda estável durante as diversas etapas de processamentos, tais como pasteurização, coagulação do leite, fabricação de queijo, acidificação, imersão em salmoura, dentre outros (MANETTA, 2009; DEVECI et al., 2007).

Formas de evitar a contaminação da dieta animal por aflatoxinas, tornando o leite seguro à presença de AFM<sub>1</sub> são abordadas a seguir, através da aplicação da Teoria dos Obstáculos e de métodos convencionais e alternativos na prevenção e descontaminação da dieta animal.

### **2.4.1 Aplicação da Teoria dos Obstáculos de Leistner aos alimentos destinados ao gado leiteiro**

Ainda na fase agrícola ou durante a estocagem do alimento, a produção das aflatoxinas somente irá ocorrer quando o fungo micotoxigênico encontrar condições ideais de temperatura, umidade e pH, além de outros fatores.

As condições relatadas na literatura científica indicam haver a necessidade de oxigênio suficiente para o desenvolvimento do fungo, com temperatura ideal na faixa de 25 a 28°C e teores de atividade de água (Aa) no substrato de no mínimo 0,86. O pH favorece o crescimento quando em valores de 3,4 a 5,5, e, em geral, quando o alimento possui maior quantidade de carboidratos, porém, a síntese ocorre muito bem em substratos ricos em gordura e proteína, como no amendoim (IHESHIULOR et al., 2011; JAY, 2005; GARCIA, 2004).

Partindo da afirmativa que a prevenção é o melhor método de controle da contaminação do alimento por AFM<sub>1</sub>, a aplicação da Teoria dos Obstáculos proposta por Leistner (1994) seria uma forma de prevenir o desenvolvimento do fungo aflatoxigênico e produção da micotoxina em rações e silagens destinadas ao consumo animal.

A Teoria dos Obstáculos baseia-se na manutenção da qualidade inicial do alimento. As barreiras que podem ser aplicadas na prevenção do desenvolvimento de *Aspergillus* spp seriam àquelas relacionadas com os fatores inerentes ao alimento, principalmente o controle da atividade de água e umidade, através de um processo de secagem e armazenamento adequado dos produtos destinados aos animais.

Fatores como a Umidade Relativa do ar (%UR) e o tempo de estocagem também podem ser controlados, constituindo em importantes obstáculos ao desenvolvimento fúngico. Por outro lado, fatores como pH, temperatura e potencial Redox, dificilmente poderiam ser manipulados, e, portanto, não constituiriam em barreiras preventivas.

O controle biológico ainda na fase agrícola também têm sido realizado. O método ainda é pouco aplicado no Brasil, e consiste em inocular no solo, esporos de espécies

conhecidas de *Aspergillus* spp não produtores de aflatoxinas. Durante o desenvolvimento das culturas, o fungo se reproduz dominando a população de outras espécies aflatoxigênicas através da competição microbiológica. Desta forma, mesmo após colhido, o alimento ainda se mantém protegido devido ao baixo risco de contaminação durante o armazenamento (BIOSPHERE, 2011).

Estudo realizado por Prado et al (2008a), sugere o controle biológico através da inoculação de leveduras *Saccharomycopsis schoenii* e *S. crataegensis* diretamente nos grãos. Decréscimo na concentração de AFB<sub>1</sub> atingiram cerca de 90% quando comparados com o controle, demonstrando grande eficácia do método.

O uso de adsorventes naturais ou sintéticos como forma de reduzir a absorção da aflatoxina presente em rações animais também têm sido utilizado como método de prevenção (OGUZ et al., 2002). O princípio se baseia na adesão da aflatoxina ao adsorvente, impedindo a absorção pelo trato gastrointestinal do animal, tornando-a inerte ao organismo. Dentre os adsorventes mais utilizados estão os aluminossilicatos de Na e Ca (BATINA et al., 2011; KUBENA et al., 1990).

A eficiência do adsorvente depende ainda da sua própria estrutura química e também das características da aflatoxina. No entanto, a discussão sobre o uso destas substâncias deve-se a compatibilidade em adsorver outros componentes da dieta, como promotores de crescimento e coccidiostáticos, aumentando a susceptibilidade dos animais à micoplasmose e coccidiose, restringindo sua aplicação (SHRYOCK et al., 1994).

Desta forma, a partir dos fatores já citados, foi elaborado um esquema ilustrativo dos principais obstáculos à contaminação do alimento com aflatoxinas e conseqüentemente da prevenção ao risco de contaminação por AFM<sub>1</sub> em leite e produtos lácteos (Figura 3).

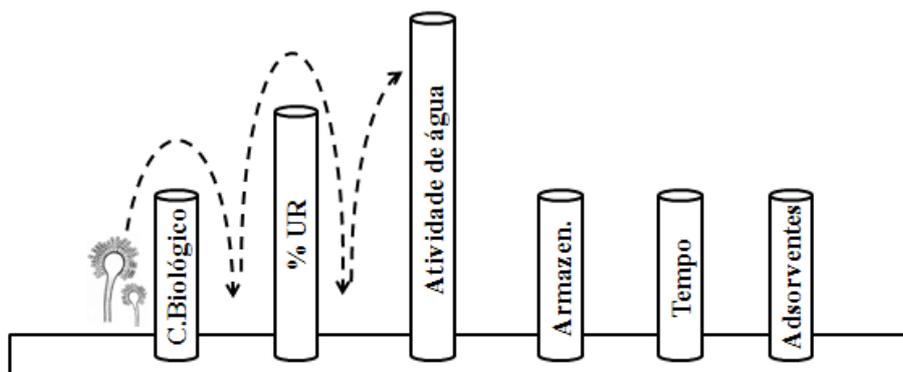


Figura 3 – Teoria dos obstáculos de Leistner aplicada a alimentação animal e prevenção da contaminação de leite e derivados por AFM<sub>1</sub>. São representadas como barreiras o controle biológico, uso de adsorventes, controle da umidade relativa do ar, Aa, armazenamento adequado e curto tempo de armazenamento. Fonte: o autor.

Percebe-se na Figura 3 que, o obstáculo de maior importância refere-se a Aa do alimento. Valores abaixo de 0,78 e 0,86 são limitantes ao desenvolvimento dos fungos e produção de aflatoxinas, respectivamente (GARCIA, 2004).

Quando a %UR do ambiente é alta, ocorre o aumento de umidade do alimento e conseqüente aumento de sua Aa. Têm-se então o fenômeno demonstrado na Figura 4, chamado de “efeito trampolim”, onde o fungo encontra condições de transpor facilmente as barreiras posteriores. A estocagem dos grãos em condições de armazenamento inadequadas permite a absorção da umidade do ambiente, influenciando diretamente o crescimento fúngico e a produção das aflatoxinas no substrato.

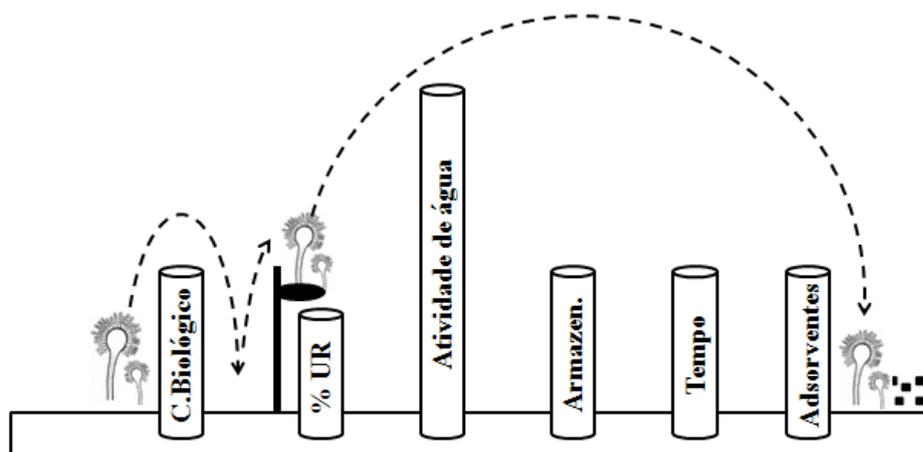


Figura 4 – Teoria dos obstáculos de Leistner aplicada a alimentação animal e prevenção da contaminação de leite e derivados por AFM<sub>1</sub>. Efeito trampolim ocorrido devido a elevada % UR do ambiente. Fonte: o autor.

Desta forma, os métodos de prevenção à contaminação por aflatoxinas devem resultar do controle dos três fatores básicos: desenvolvimento fúngico, substrato e meio ambiente (GOURAMA; BULLERMAN, 1995). Outras metodologias alternativas para descontaminação do alimento já contaminado são apresentadas a seguir.

#### 2.4.2 Métodos convencionais e alternativos de descontaminação e prevenção da contaminação por aflatoxinas

Métodos alternativos de eliminação da contaminação por aflatoxinas, tais como a remoção de grãos visivelmente contaminados por procedimentos eletrônicos ou aplicação de fungicidas ainda na fase agrícola, reduzem os níveis de contaminação, porém, são pouco aplicados e de baixa efetividade (ARAÚJO, 2008).

Outros que podem ser citados são a degradação da molécula pela aplicação de agentes oxidantes como água oxigenada e hipoclorito de sódio. Porém, a utilização destas substâncias em alimentos é impraticável, uma vez que, certamente afetariam suas propriedades como “flavor”, cor, textura, propriedades nutricionais e funcionais, além da possível formação de resíduos tóxicos. O custo excessivo e a dificuldade de aplicação também são outros inconvenientes (ARAÚJO, 2008).

O emprego da amônia, denominado amonização também possui certa eficiência na degradação das aflatoxinas. É um procedimento adotado em alguns países, especialmente na descontaminação de grãos e castanhas. No entanto, as principais desvantagens são a ineficiência contra outras micotoxinas e possíveis efeitos tóxicos à saúde animal devido ao excesso de resíduos de amônia na ração (HUIG et al., 2001).

Já a aplicação do Ozônio (O<sub>3</sub>), ao contrário da amonização ou de outros métodos convencionais, é uma técnica que vem sendo muito estudada recentemente por apresentar algumas vantagens que permitem sua aplicação de forma eficaz na destruição das aflatoxinas. É um método de oxidação, capaz de reagir com grande variedade de grupos funcionais constituintes da molécula de aflatoxina, degradando-os e originando uma grande variedade de compostos carbonílicos como aldeídos e cetonas ou ácidos orgânicos (BABLON et al., 1991).

O uso do O<sub>3</sub> tem sido recentemente estudado como controle da incidência de aflatoxinas em castanha-do-Brasil. A ozonização da castanha é capaz de promover uma degradação eficaz das aflatoxinas do grupo B e G, com redução também na contagem total de fungos (GIORDANO, 2009), sendo uma técnica ainda promissora no controle de diferentes grupos de micotoxinas.

O uso da radiação ionizante é outra metodologia recentemente empregada no controle e descontaminação de aflatoxinas. Ribeiro et al. (2009) avaliaram o efeito da radiação gama (Césio<sup>137</sup>) sobre espécies de *Aspergillus* spp e outros fungos filamentosos presentes em alimentos, eliminando a micobiota totalmente com níveis de radiação de 8KGy. As espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* mostraram-se mais radiorresistentes que as demais avaliadas e, em amostras de milho, observou-se significativa diminuição dos fungos com a dose 2KGy e completa inibição a partir de 4KGy.

Prado (2005) avaliou a aplicação de radiação gama (Cobalto<sup>60</sup>) e os efeitos provocados em cepas irradiadas de *Aspergillus flavus*, bem como a degradação provocada em AFB<sub>1</sub> naturalmente presente em amostras de amendoim. Foi relatado que AFB<sub>1</sub> foi destruída com doses de 15 a 30 KGy, na faixa de 49 a 72%. A micobiota natural foi eliminada nas doses de 5 e 10 KGy. Entretanto, doses de 25 e 30 KGy foram necessárias para completa inativação de esporos de *Aspergillus flavus*.

Desta forma, o campo das tecnologias alternativas aplicadas no controle da contaminação dos alimentos por aflatoxinas têm muito a ser explorado. Os métodos citados neste estudo ainda são pouco utilizados na prática devido principalmente ao alto custo e necessidade de tecnologias não convencionais, o que restringe sua aplicabilidade.

### 3 CONCLUSÕES

A partir desta revisão, percebe-se que a incidência de AFM<sub>1</sub> em derivados lácteos tem sido objetivo de diversas pesquisas recentes na área micotoxicológica, tornando-se atualmente questão de saúde pública. Mesmo já estando em vigor, a legislação atual ainda é insuficiente para fiscalização de derivados lácteos, visto que contempla somente os queijos. Ainda assim, para o seu cumprimento, faz-se necessário o uso de metodologias adequadas, a qual irá depender de fatores como custos, objetivos e capacidade dos analistas. A melhor forma de evitar a contaminação por AFM<sub>1</sub> ainda é a prevenção da contaminação da dieta animal por aflatoxinas. Desta forma, o controle das condições ideais ao desenvolvimento do fungo são de extrema importância, principalmente os parâmetros relacionados a estocagem do alimento. Metodologias alternativas para a descontaminação das aflatoxinas têm sido utilizadas, porém, ainda são muitos os fatores que restringem sua aplicabilidade prática.

### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMADO, M.A. **Métodos imunológicos na detecção e determinação de aflatoxinas em alimentos:** Vantagens e inconvenientes. 1997. Disponível em: <[http://www.ipv.pt/millennium/millennium26/26\\_21.htm](http://www.ipv.pt/millennium/millennium26/26_21.htm)> Acesso em: 05 nov. 2010.
- AMARAL, K.A.S.; MACHINSKI JR, M. Métodos analíticos para a determinação de aflatoxinas em milho e seus derivados: uma revisão. **Analytica**, São Paulo, n. 24, p. 56-58, ago.-set., 2006.
- AMER, A.A.; IBRAHIM, M.A.E. Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk and traditional cheeses retailed in Egyptian markets. **Journal of Toxicology Environmental Health Science**, v. 2, n.4, p. 50-53, set., 2010.
- ANDRADE, A.N. Micotoxinas: Importância na alimentação (Uma revisão). **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v.50, n.2, p.139-175. 2004
- ANFOSSI, L.; BAGGIANI, C.; GIOVANNOLI, C.; D'ARCO, G.; PASSINI, C.; GIRAUDI. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in Italian cheese: Results of a survey conducted in 2010 and correlation with manufacturing, production season, milking animals, and maturation of cheese. **Food Control**, v.25, n.1, p.125-130, 2012.

ARANA, S.; DAGLI, M.L.Z.; SABINO, M. et al. Evaluation of the efficacy of hydrated sodium aluminosilicate in the prevention of aflatoxin-induced hepatic cancer in rainbow trout. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 9, set., 2011.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 4ª ed. UFV: Viçosa. 2008. 473p.

ARDIC, M.; KARAKAYA, Y.; ATASEVER, M.; ADIGUZEL, G. Aflatoxin M<sub>1</sub> levels of Turkish white brined cheese. **Food Control**, v. 20, n.1, p. 196–199, 2009.

BABLON G. et al. Application and Engineering. In. LANGLAIS, D.A. (Ed). **Fundamental aspects Ozone in Water Treatment**, p.11-132. Chelsea: Lewis Publishers, 1991,

BATINA, P. N.; LOPES, S.T.A.; SANTURIO, J.M. et al. Efeitos da adição de montmorilonita sódica na dieta sobre o perfil bioquímico de frangos de corte intoxicados com aflatoxina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p.826-831, ago., 2005.

BELTRÁN, E.; IBÁÑEZ, M.; SANCHO, J. V.; CORTÉS, M. A.; YUSÁ, V.; HERNÁNDEZ, F. UHPLC–MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M<sub>1</sub> and ochratoxin A in baby food and milk. **Food Control**, v.126, n.1, p.737-744, 2011.

BIOSPHERE. **Controle Biológico das Aflatoxinas**. Cultivar Soluções para Agricultura Ltda. Disponível em: <<http://www.acultivar.com.br/biosphere.htm>> Acesso em: 17 set. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria MAARA n. 183 de 21 de março de 1996. Internaliza as normas do MERCOSUL GMC/RES. No. 56/94. **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 mar. 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 274, de 2002. Regulamento técnico Mercosul sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim, no milho. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 out. 2002. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>>. Acesso em: 17 set. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada N° 7, de 18 de fevereiro de 2011. Limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 09 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>>. Acesso em: 17 set. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2002.

CAVALIERE, C., FOGLIA, P., GUARINO, C., MARZIONI, F., NAZZARI, M., SAMPERI, R., et al. Aflatoxin M<sub>1</sub> determination in cheese by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1135, n.1, p.135-141, 2006.

CREPPY, E.E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, v.127, n.1, p.19-28, 2002.

DESHPANDE, S.S. Handbook of Food Toxicology. In: DESHPANDE, S.S. **Fungal Toxins**. Marcel Decker: New York, p.387–456, 2002.

DASHTI, B., AL-HAMLI, S., ALOMIRAH, H., AL-ZENKI, S., BU ABBAS, A., & SAWAYA, W. Levels of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk, cheese consumed in Kuwait and occurrence of total aflatoxin in local and imported animal feed. **Food Control**, v.20, n.1, p.686-690, 2008.

DEVECI, O. Changes in the concentration of aflatoxin M<sub>1</sub> during manufacture and storage of White Pickled cheese. **Food Control**, v.18, n.9, p.1103–1107, set., 2007.

DILKIN, P. Micotoxicose suína: aspectos preventivos, clínicos e patológicos. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.187-191, jul.-dez., 2002.

DINÇKAYA, E.; KINIK, O.; SEZGINTURK, M. K.; ALTUG, C.; AKKOCA, A. Development of an impedimetric aflatoxin M<sub>1</sub> biosensor based on a DNA probe and gold nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v.26, n.1, p.3806-3811, 2011.

ELKAK, A.; MOHAMAD, A.; OULA, E. A. A survey on the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw and processed milk samples marketed in Lebanon. **Food Control**, v.22, n.1, p.1856-1858, 2012.

EL KHOURY, A.; ATOUI, A.; YAGHI, J. Analysis of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and yogurt and AFM<sub>1</sub> reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. **Food Control**, v. 22, n.1, p. 1695-1699, 2011.

EMBRAPA Agroindústria Tropical. Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. IFREIRE, F.C.O.; VIEIRA, E.G.P.V.; GUEDES, M.I.F.; MENDES, F.N.P. Fortaleza, CE. Out. 2007. Disponível em: <[http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Dc\\_110.pdf](http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Dc_110.pdf)> Acesso em: 17 set. 2011.

ERTAS, N.; GONULALAN, Z.; YILDIRIM, Y. et al. A survey of concentration of aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products marketed in Turkey. **Food Control**, v.22, n.1, p. 1956-1959, dez., 2011.

EUROPEAN COMMISSION (EC) Regulation. Commission regulation. No. 1881/2006 of 19 December 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Communities**, p. 2-25, 2006.

FALLAH, A. A. Seasonal variation of Aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in dairy products marketed in Iran during winter and summer. **Food Control**, v.21, n.1, p.1478-1481, 2010.

FALLAH, A. A. Assessment of aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in pasteurized and UHT Milk marketed in central part of Iran. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, n.1, p.988-991, 2011.

FAO. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. HANS P.; EGMOND, V.; JONKER, M.A. Paper n. 81, fev., Rome, 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.HTM>> Acesso em: 04 nov. 2010.

FORSYTHE, S.J. **The microbiology of safe food**. London: Blackwell Science, 2000. 424p.

FUJII, S.; GARCIA, L.B.; HIROOKA, E.Y. Metodologia analítica imunoquímica com ênfase na detecção de micotoxinas – ficotoxinas no sistema agroalimentar. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 273-284, 2004.

GALVANO, F., GALOFARO, V., & GALVANO, G. Occurrence and stability of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products: a worldwide review. **Journal of Food Protection**, v.59, n.1, p.1079-1090, 1996.

GARCIA, D. M. **Análise de atividade de água em alimentos armazenados no interior de granjas de integração avícola**. 2004. 50p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GILBERT, J. Recent advances in analytical methods for mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v.10, n.1, p.37-48, 1993.

GIORDANO, B. N. E. **Efeito do ozônio sobre a microflora e aflatoxinas durante a armazenagem de castanha-do-Brasil com casca (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)**. 2009. 193p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GOURAMA, H.; BULLERMAN, L. B. Detection of molds in foods and feeds: potential rapid and selective methods. **Journal of Food Protect**, v. 58, n.12, p. 1389-1394, dez. 1995.

GREMMELS, J.F. **Food Additives and Contaminations**, v.25, n.1, p.172–180, 2008.

HASSANIN, N. I. Stability of aflatoxin M<sub>1</sub> during manufacture and storage of yoghurt cheese and acidified milk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 65, n. 1, p. 31-34, mai., 1994.

HUIG, A.; FREIMUND, S.; KÄPPELIB, O. et al. Mycotoxin detoxication of animal feed by different absorvents. **Toxicology Letters**, v.122, n.2, p.179-188, jul. 2001.

HUSSEIN, S.H.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v.167, n.2, p.101-134, out., 2001.

IARC, International Agency for Research on Cancer. Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans, World Health Organization, some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. In.: **Summary of data reported and evaluation**, v. 82, p. 171-175. Lyon, 2002.

IHA, M.H.; BARBOSA, C.B.; OKADA, I.A. et al. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products in Brazil. **Food Control**, v. 22, n. 12, p. 1971-1974, out., 2011.

IHESHIULOR, O.O.M., ESONU, B.O., CHUWUCA, O.K. et al. Effects of mycotoxins in animal nutrition: a review. **Asian Journal of Animal Sciences**, v.5, n.1, p.19-33, jul., 2011.

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. Gaithersburg: Aspen, 2000. 854p

KANIOU-GRIGORIADOU I.; ELEFThERiADOU A.; MOURATIDOU T. et al. Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in ewe's milk samples and the produced curd and Feta cheese. **Food Control**, v.16, n.1, p. 257-261, 2005.

KAV, K.; COL, R.; TEKINSEN, K. K. Detection of aflatoxin M<sub>1</sub> levels by ELISA in white-brined Urfa cheese consumed in Turkey. **Food Control**, v.22, n.1, p.1883-1886, 2011.

KIM, E. K., SHON, D. H., RYU, D., PARK, J. W., HWANG, H. J., & KIM, Y. B. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. **Food Additives and Contaminants**, v.17, n.1, p.59-64, 2001.

KUBENA, L.F.; PHILLIPS, T.D.; CORRIER, D.E. et al. Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of hydrated, sodium aluminosilicate. **Poultry Science**, v.1, n. 69, p.727-735, 1990.

LEISTNER, L. **Food design by hurdle technology and HACCP**. Kulmbach : Adalbert Raps Foundation, 1994. 62p.

LOPEZ, C., RAMOS, L., RAMADAN, S., BULACIO, L., PEREZ, J. Distribution of aflatoxin M<sub>1</sub> in cheese obtained from milk artificially contaminated. **International Journal of Food Microbiology**, v.64, n.1, p.211-215, 2001.

MAGAN, N.; OLSEN, M. **Mycotoxins in food: Detection and control**. Woodhead Publishing Limited: Cambridge, England. 2000.

MANETTA, A. C.; GIAMMARCO, M.; GIUSEPPE, L.D. et al. Distribution of aflatoxin M<sub>1</sub> during Grana Padano cheese production from naturally contaminated milk. **Food Chemistry**, v. 113, n.1, p. 595-599, 2009.

MAZIERO, M.T.; BERSOT, L.S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.12, n.1, p.89-99, 2010.

MONTAGNA, M. T., NAPOLI, C., DE GIGLIO, O., IATTA, R., & BARBUTI, G. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products in Southern Italy. **International Journal of Molecular Science**, v.9, n.1, p.2614-2621, 2008.

MUSCARELLA, M., LO MAGRO, S., PALERMO, C., & CENTONZE, D. Validation according to European Commission Decision 2002/657/EC of a confirmatory method for aflatoxin M<sub>1</sub> in milk based on immunoaffinity columns and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v.594, n.1, p.257-264, 2007.

NOGUEIRA, J.H.C. **Quimioprevenção pelo óleo essencial de mentrasto (*Ageratum conyzoides*) no crescimento de *Aspergillus flavus* e da produção de aflatoxina**. 2009. 73p. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio). Instituto Biológico, São Paulo.

OGUZ H; KURTOĞLU, F; KURTOĞLU, V. et al. Evaluation of biochemical characters of broiler chickens during dietary aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. **Research Veterinary Science**, v.73, n.1, p.101-103, ago., 2002.

OLIVEIRA, C. A. F., FRANCO, R. C., ROSIM, R. E., & FERNANDES, A. M. Survey of aflatoxin M<sub>1</sub> in cheese from the North-east region of São Paulo, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v.4, n.1, p.57-60, 2011.

ORUC, H. H.; CIBIK, R.; YILMAZ, E.; GUNES, E. Fate of aflatoxin M<sub>1</sub> in Kashar cheese. **Journal of Food Safety**, v.27, n.1, p.82-90, feb., 2007.

PÁDUA, I.P.M.; SILVEIRA, I. A; MARTINS, C.E.C.B. Aflatoxinas e risco de contaminação do leite humano. **Pró Homine**, Lavras, v.1, n.1, p.12-16, jul-dez., 2002.

PEI, S. C., ZHANG, Y. Y., EREMIN, S. A., LEE, W. J. Detection of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies. **Food Control**, v. 20, n.1, p.1080-1085, 2009.

PEREIRA, M. L., TOLEDO, M. C. F. Micotoxinas: impacto na saúde humana e animal e sua detecção pelo método de ELISA. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária da UFMG**, v. 13, n.1, p. 5-27, 1995.

PRADO, G. **Influência da irradiação gama (Co<sup>60</sup>) na microbiota fúngica e na aflatoxina B<sub>1</sub> em amendoim (*Arachis hypogaea* L.)**. 186 p. 2005. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PRADO, G.; SOUZA, R.A.; MORAIS, V.A.D. et al. Influência de *Saccharomyces schoenii* e *Saccharomyces crataegensis* na produção de aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> por *Aspergillus parasiticus* em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 67, n. 3, p. 177, 182, dez., 2008a.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S. de; LIMA, A.S.; et al. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in Parmesan cheese in Minas Gerais, Brazil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1906-1911, dez., 2008b.

RAMOS, C.R.B.A.; BRASIL, E.M.; GERALDINE, R.M. Avaliação de métodos de extração, limpeza e purificação de aflatoxinas para análise em cromatografia líquida de alta eficiência. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 38, n. 2, p. 103-108, jun. 2008.

RASFF. The Rapid Alert System for Food and Feed. **Annual Report 2010**. Luxembourg, European Communities, 2011. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/RASFF>> Acesso em: 17 fev., 2012.

REN, Y., ZHANG, Y., SHAO, S., CAI, Z., FENG, L., PAN, H., et al. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1143, n.2, p.48-64, 2007.

RIBEIRO, J. M. M.; CAVAGLIARI, L.R.; VITAL, H.C. et al. Radiação gama sobre a microbiota de ração avícola e *Aspergillus* spp. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1452-1458, ago., 2009.

RITTER, A. C.; HOELTZ, M.; NOLL, I. B. Toxigenic potential of *Aspergillus flavus* tested in different culture conditions. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 3, set., 2011.

RUBIO, R.; MOYA, V. J.; BERRUGA, M. I. et al. Aflatoxin M(1) in the intermediate dairy products from Manchego cheese production: distribution and stability. **MLJEKARSTVO**, v.61, n.4, p.283-290, 2011.

SADEGHI, N.; OVEISI, M.R.; JANNAT, B. et al. Incidence of aflatoxin M<sub>1</sub> in human breast milk in Tehran, Iran. **Food Control**, v.20, n.1, p. 75-78, jan., 2009.

SAKUMA, H.; KAMATA, Y.; SUGITA-KONISHI, Y. et al. Method for Determination of Aflatoxin M<sub>1</sub> in Cheese and Butter by HPLC using an Immunoaffinity column. **Food Hygiene and Safety Science**, v. 52, n.4, p. 220-225, ago., 2011.

SALLE, C. T. P.; LORENZINI, G.; SFOGGIA, M. V. Presença de aflatoxinas em fígados de frangos de corte criados a campo. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 29, n. 2, p. 101-106, 2001.

SANTURIO, J. M. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v.2, n.1, p.1-12, abr., 2000.

SHRYOCK, T.R.; KLINK, P.R.; READNOUR, R.S. et al. Effect of bentonite incorporated in a feed ration with tilmicosin in the prevention of induced *Mycoplasma gallisepticum* airsacculitis in broiler chickens. **Avian Diseases**, v.38, n.1, p.501-505, 1994.

SHUNDO, L.; NAVAS, S.A.; LAMARDO, L.C.A. et al. Estimate of aflatoxin M<sub>1</sub> exposure in milk and occurrence in Brazil. **Food Control**, v.20, n.7, p.655–657, jul., 2009.

TABARI, M.; KARIM, G.; GHAVAMI, M. et al. Method validation for aflatoxin M<sub>1</sub> determination in yoghurt using immunoaffinity column clean-up prior to high-performance liquid chromatography. **Toxicology and Industrial Health**, v. 27, n.7, p. 629-635, ago. 2011.

TAVAKOLI, H. R.; RIAZIPOUR, M.; KAMKAR, A.; SHALDEHI, H. R.; NEJAD, A. S. M. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in white cheese samples from Tehran, Iran. **Food Control**, v.23, n.1, p.293, 295, 2012.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, v.632, n.1, p.168-180, 2009.

VIRDIS, S.; GORGIOLU, G.; SCARANO, C.; PILO, A. L.; De SANTIS, E. P. L. Occurrence of Aflatoxin M<sub>1</sub> in tank bulk goat milk and ripened goat cheese. **Food Control**, v.19, n.1, p. 44-49, 2008.

U.S. Food and Drug Administration, FDA. **Guidance for industry**: Action levels for poisonous or deleterious substances in human food and animal feed. 2011. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ChemicalContaminantsandPesticides/ucm077969.htm>> . Acesso em: 15 jan., 2012.

WEB of Knowledge. Aflatoxin M<sub>1</sub>: Citations in Each Year. Disponível em: <[apps.isiknowledge.com](http://apps.isiknowledge.com)> Acesso em: 21 jan. 2012.

WHO. World Health Organization. **Global Strategy for Food Safety**: safer food for better health. Food Safety Programme. Geneva, Switzerland.2002.

## **CAPÍTULO II**

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE AFM<sub>1</sub> EM  
QUEIJO RALADO E QUANTIFICAÇÃO EM AMOSTRAS COMERCIALIZADAS  
NO RIO DE JANEIRO**

**EVALUATION OF DIFFERENT METHODS OF EXTRACTION OF AFM<sub>1</sub> IN  
GRATED CHEESE AND QUANTIFICATION IN SAMPLES MARKETED IN RIO  
DE JANEIRO**

**Submetido para publicação no periódico BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY  
AND TECHNOLOGY**

## RESUMO

Aflatoxina M<sub>1</sub> é um metabólito tóxico, estável aos processamentos industriais no qual o leite é submetido à fabricação de derivados e está amplamente presente em tais produtos. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes métodos de extração de AFM<sub>1</sub> e quantificar os níveis da micotoxina em amostras de queijo parmesão ralado comercializadas na Região Metropolitana do Rio de Janeiro. Foram analisadas 30 amostras representativas das 10 principais marcas comercializadas na região através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por fluorescência, precedida de purificação por coluna de imunoafinidade. Dos três métodos avaliados neste trabalho, apenas um demonstrou-se adequado para extração. A micotoxina foi identificada em 18 amostras (60%), em concentrações de até 0,69 µg.Kg<sup>-1</sup>. Todas as amostras se encontraram abaixo do limite estipulado pela legislação brasileira (2,5 µg.Kg<sup>-1</sup>), no entanto, 8 (26,7%) poderiam ser consideradas contaminadas se comparado com a regulamentação predominante na União Européia.

**Palavras-chave:** micotoxina, derivado lácteo, cromatografia de imunoafinidade.

## ABSTRACT

Aflatoxin M<sub>1</sub> is a toxic metabolite and stable to the industrial processes in which the milk is subjected to the manufacture of dairy products and is widely present in such products. The objective of this study was to evaluate different methods of extraction of AFM<sub>1</sub>, and quantify the levels of mycotoxin in samples of grated parmesan cheese marketed in the Metropolitan Region of Rio de Janeiro. Were analyzed 30 samples representing 10 major brands marketed in the region by High Performance Liquid Chromatography with fluorescence detection preceded by purification by immunoaffinity chromatography. Of the three methods evaluated in this study, only one proved to be suitable for extraction. The mycotoxin was identified in 18 samples (60%) in concentrations up to 0,69 µg.Kg<sup>-1</sup>. All samples were below the limit established by Brazilian legislation (2,5 µg.Kg<sup>-1</sup>), however, eight (26.7%) could be considered contaminated when compared with the predominant regulation in the European Union.

**Key words:** mycotoxin, AFM<sub>1</sub>, immunoaffinity chromatography.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país de clima tropical úmido com condições propícias para o crescimento de diversos gêneros de fungos produtores de micotoxinas. As Aflatoxinas (AF) B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* são o grupo considerado de maior relevância no país devido à alta incidência e efeitos tóxicos que podem provocar ao homem e animais (ARANA et al. 2011; CARDOSO et al., 2011; RITTER; HOELTZ; NOLL, 2011; MAZIERO, BERSOT; 2010).

Ao ser ingerida pelo animal, AFB<sub>1</sub> é biotransformada no fígado e eliminada no leite na forma de AFM<sub>1</sub> (HUSSEIN; BRASEL, 2001). AFM<sub>1</sub> apesar de ser um metabólito é classificada pela Agência Internacional de Pesquisas sobre Câncer (IARC, 2002) como agente carcinogênico do grupo 1. Este fato, sem dúvidas, representa um sério problema de saúde pública, já que o leite e seus derivados são intensivamente consumidos por bebês, crianças, adultos e idosos (SADEGHI et al., 2009).

Estudos recentes abordam a contaminação de leites e derivados por AFM<sub>1</sub>, demonstrando que a toxina, mesmo quando dentro dos limites aceitáveis, está amplamente exposta em produtos lácteos industrializados (IHA; BARBOSA; OKADA, 2011; SHUNDO et al., 2009; PRADO et al., 2008), sendo bastante estável aos processos em que o leite é utilizado na fabricação destes (DEVECI, 2007).

A partir de 2011 foi estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA) o limite máximo tolerado para AFM<sub>1</sub> em queijo de 2,5 µg.Kg<sup>-1</sup> (BRASIL, 2011). Pesquisar os índices de contaminação por AFM<sub>1</sub> em queijos nacionais é de grande relevância, pois tratam-se de alimentos largamente consumidos pela população. Dentre estes, encontra-se o queijo parmesão ralado industrializado, um produto pronto para consumo e elaborado a partir da ralagem ou esfarelamento de uma ou até quatro variedades de queijos (BRASIL, 1997).

Para a análise de AFM<sub>1</sub> em leites, não há a necessidade de um processo de extração da micotoxina. A amostra é centrifugada e passada diretamente na coluna de imunoafinidade para isolar a micotoxina (OLIVEIRA et al., 2010). Já em análise de queijo, geralmente se utilizam solventes orgânicos, tais como o clorofórmio ou diclorometano por ser um alimento que apresenta elevado teor lipídico. No entanto, A IARC (1999) classifica tais solventes como agentes carcinogênicos para humano.

Neste sentido, Sakuma et al. (2011) propuseram uma metodologia utilizando solução de acentonitrila, metanol e água, a qual consideraram ser confiável e envolver menos riscos aos analistas.

A AOAC (2000) recomenda a extração com clorofórmio e purificação em coluna de sílica gel, seguido de derivatização por ácido trifluoracético. No entanto, é um método constituído por várias etapas complexas, apresentando baixa seletividade, com limite de quantificação em torno de 0,56 µg.Kg<sup>-1</sup> (URBÁN et al., 2009).

Dragacci et al. (1995) propuseram a extração com diclorometano e celite, seguido de uma partição com hexano, o qual é semelhante a extração proposta por Elgerbi et al. (2004). Este método é utilizado na maioria das pesquisas envolvendo AFM<sub>1</sub> em queijos.

Técnicas mais simples de extração, como métodos imunoenzimáticos (ELISA) também usados na detecção e quantificação, têm sido amplamente utilizados em pesquisa de AFM<sub>1</sub>, sendo considerado por vários autores como uma técnica simples, rápida, sensível e confiável (ERTAS et al., 2011, EL KHOURY; ATOUI; YAGHI, 2011; TRUCKSESS, 2001).

O uso de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) ainda é empregado para tal finalidade (KAMKAR, 2006), no entanto, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência e purificação por coluna de imunoafinidade é a

técnica mais recomendada por apresentar excelentes parâmetros analíticos (TABARI et al., 2011, KAMKAR et al., 2008; MARTINS et al., 2007).

Tais estudos visando o desenvolvimento de novas metodologias de extração de AFM<sub>1</sub> em queijos, que apresentem bons parâmetros analíticos e, principalmente, sejam possíveis de serem reproduzidas em escala interlaboratorial, são de grande importância nas fiscalizações dos índices de contaminação.

De acordo com Ramos et al. (2008), em pesquisa de traços, os produtos de origem animal são mais difíceis de serem analisados devido a complexidade da matriz, principalmente se tratando de queijos, visto que, é um produto que apresenta elevado teor de gordura, proteínas, minerais, aditivos químicos e outras substâncias que poderiam interferir nos resultados.

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes metodologias empregadas na extração de AFM<sub>1</sub> em queijos e, a partir de então, quantificar os níveis da micotoxina presentes em amostras de queijo parmesão ralado comercializados na Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Amostragem

Foram coletadas 90 unidades das 10 principais marcas de queijo parmesão ralado comercializadas na Região Metropolitana do Rio de Janeiro (municípios de Niterói, Rio de Janeiro e Seropédica). O critério adotado para a coleta das mesmas constitui-se em retirar 3 unidades de cada um de 3 lotes expostos de cada marca avaliada (10 marcas x 3 lotes x 3 unidades por lote).

Realizou-se um pool das três unidades de cada lote, perfazendo 30 amostras de laboratório. Todas as marcas apresentaram selo de Inspeção Federal (SIF) e se enquadravam dentro do prazo de validade estabelecido pelos fabricantes. Após coleta, foram designadas letras de A a J para cada uma das dez marcas, e numeração de 1 a 3 para cada lote, sendo então armazenadas em caixa de poliestireno ao abrigo da luz e umidade.

### 2.2 Extração de AFM<sub>1</sub>

A extração e quantificação de AFM<sub>1</sub> foi realizada no Laboratório de Micotoxinas do Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos – CTAA da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro-RJ.

Avaliaram-se três metodologias de extração, procurando-se aquela que apresentaria os melhores resultados obtidos nos ensaios de recuperação. Tal parâmetro foi estimado através da análise das amostras adicionadas com quantidades conhecidas de AFM<sub>1</sub> (BRASIL, 2003), e calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = [(C_1 - C_2 / C_3) * 100]$$

Onde: C<sub>1</sub> = concentração determinada na amostra adicionada,  
C<sub>2</sub> = concentração determinada na amostra não adicionada;  
C<sub>3</sub> = concentração adicionada.

Para cada metodologia avaliada, foram realizados 3 ensaios de recuperação em duplicata, sendo uma amostra branco e as outras duas adicionadas com 0,5 e 1 µg.Kg<sup>-1</sup> de

AFM<sub>1</sub> (Sigma-Aldrich). As descrições dos métodos avaliados estão apresentadas nos subitens a seguir.

### **2.2.1 Metodologia A**

A extração foi realizada seguindo as recomendações de Sakuma et al. (2011). Após homogeneização, foram pesadas 10 g de amostra e adicionada em um mixer (Omnimixer Homogeneizer, Omni) juntamente com 40 mL de solução de acetonitrila-metanol-água (6:1:3, v/v/v) e homogeneizada em alta velocidade por 5 min. A mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos (Sorvall legend RT) e então recolhido 10 mL do sobrenadante, o qual foi diluído em 30 mL de solução tampão (900 mL de água, 8g de NaCl, 1.16 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

A solução obtida foi filtrada em membrana de vidro e uma alíquota de 20 mL do filtrado foi passado através de coluna de imunoafinidade (Aflaprep M:P04, R-Biopharma) em fluxo aproximado de 3 mL.min<sup>-1</sup>, utilizando um sistema de vácuo (Supelco Visiprep).

A coluna foi lavada com 20 mL de solução tampão e, para a eluição da toxina, foram adicionados 2 mL de metanol: acetonitrila (2:3, v/v), mantendo em contato por 2 min, recolhendo em vial sob fluxo de 2 a 3 gotas por seg. Em seguida, foram adicionados a coluna mais 3 mL de metanol, sendo o eluato incorporado ao primeiro e levado a secura sob atmosfera de nitrogênio. O resíduo obtido foi reconstituído com 1000 µL de solução acetonitrila: água (20:80, v/v).

### **2.2.2 Metodologia B**

Neste método, a extração foi conduzida de acordo com Prado et al. (2008), onde 10 gramas de amostra foram adicionadas ao mixer com 10 g de celite (Sigma-Aldrich) e 80 mL de diclorometano, agitando-se em alta velocidade por 2 minutos. A mistura foi lavada com mais 40 mL de diclorometano e então filtrada em membrana de papel com 14 µm de poro.

Toda a solução foi evaporada em evaporador rotativo (BÜCHI RE120) sob temperatura ambiente, e, o resíduo obtido foi dissolvido em solução de metanol: água: hexano (1:30:50, v/v/v), transferindo quantitativamente para funil de separação, onde agitou-se vigorosamente e coletou-se a fase aquosa. A fase hexânica foi lavada mais duas vezes com 10 mL de água e a fase aquosa coletada e incorporada a primeira.

O coletado aquoso foi passado através de coluna de imunoafinidade, seguindo o processo descrito no item 2.2.1.

### **2.2.3 Metodologia C**

Esta extração ocorreu de acordo com metodologia proposta por Mayes e MacDonalds (1995) e Deveci (2007). Após homogeneização, 10 g de amostra foram adicionada ao mixer com 10 g de celite (Sigma-Aldrich), 150 mL de clorofórmio e 2 mL de solução saturada de NaCl (Tedia), agitando-se em baixa velocidade por 15 min. A mistura foi filtrada em membrana de papel com 14 µm de poro e todo o filtrado foi evaporado em evaporador rotativo (BÜCHI RE120) sob temperatura ambiente, dissolvendo o resíduo obtido em 60 mL de solução tampão (900 mL de água, 8g de NaCl, 1.16 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e 2 mL de metanol. A solução obtida foi transferida quantitativamente para funil de separação e adicionados 100 mL de hexano, agitando-se vigorosamente por 1 min e posteriormente recolhendo-se a fase aquosa.

Todo o coletado aquoso foi passado através de coluna de imunoafinidade, como descrito em 2.2.1. A Figura 1 ilustra as principais etapas de cada metodologia.

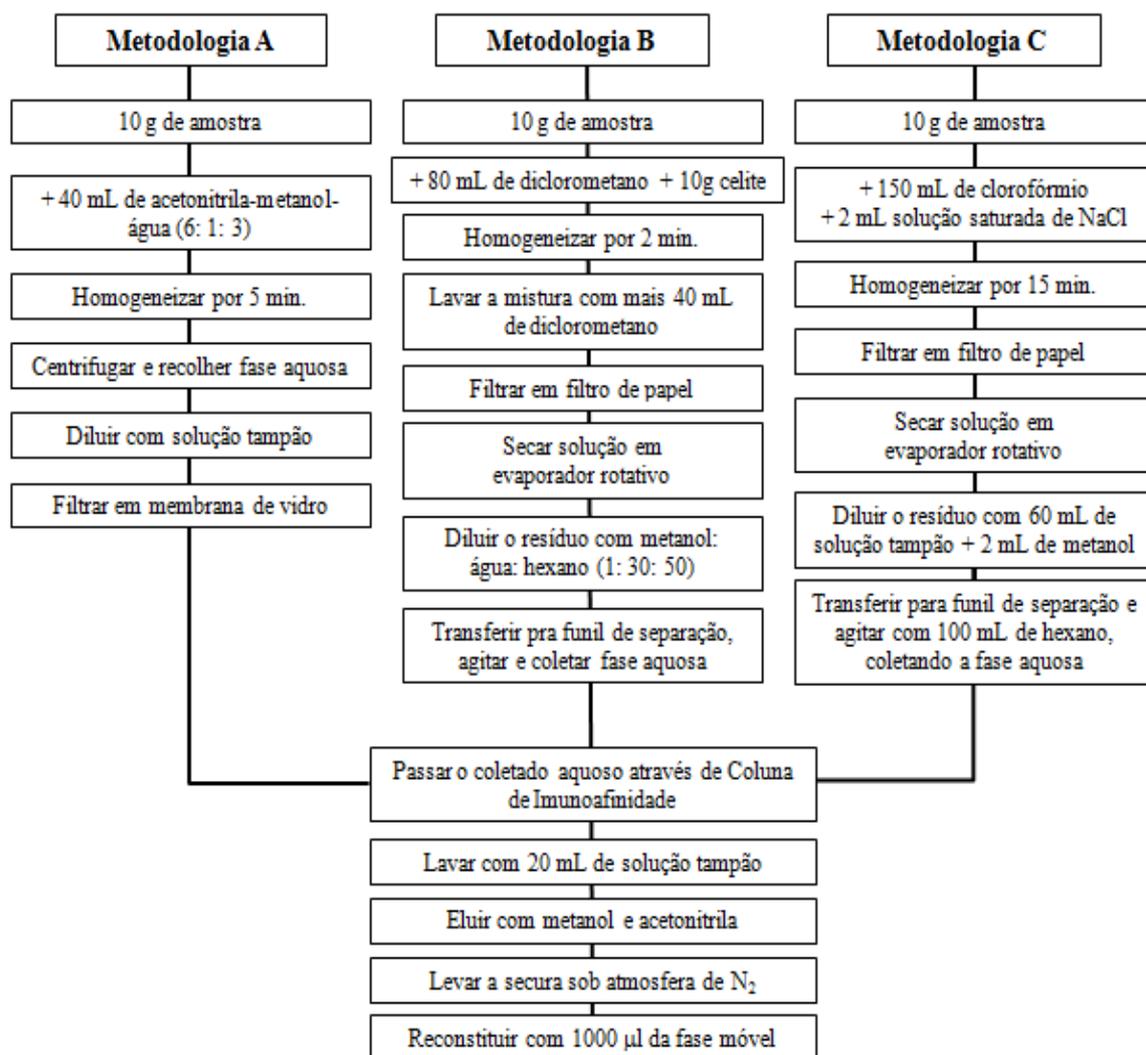


Figura 1 – Exemplificação dos diferentes métodos de extração de AFM<sub>1</sub> avaliados em amostra de queijo parmesão ralado.

### 2.3 Quantificação de AFM<sub>1</sub>

AFM<sub>1</sub> foi quantificada por padronização externa utilizando um sistema cromatográfico com detector de fluorescência (HPLC-FLD) (autosampler Waters 717, Waters 600 Pump, Waters On-Line Degasser, Waters 2475 Multi Fluorescence Detector - excitação em 360 nm e emissão em 430 nm, coluna C18 Waters X-Terra 5 µm – 4, 6 x 250 mm), fase móvel constituída por acetonitrila: água (20: 80, v/v), volume de injeção de 40 µl, vazão de 1 mL.min<sup>-1</sup> e temperatura do forno em 40°C.

A identificação da AFM<sub>1</sub> foi feita por comparação dos tempos de retenção dos picos das amostras com os dos padrões de referência na curva analítica, e, a partir do cálculo das áreas dos picos foram obtidos os teores da toxina presente nas amostras analisadas. Todos os solventes utilizados foram de grau CLAE (Tedia) e a água ultrapurificada pelo sistema MILLI-Q.

### 2.4 Critérios de validação

O método analítico foi avaliado através da linearidade, recuperação, repetibilidade e limites de detecção e quantificação. A linearidade foi observada através do coeficiente de correlação da curva de calibração construída por 7 pontos da solução padrão de AFM<sub>1</sub> (Sigma-Aldrich) em concentrações variando de 0,1 a 3,75 µg.Kg<sup>-1</sup>.

A análise de recuperação foi realizada em dois níveis de adição ( $0,5 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  e  $1 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ ) com duas repetições em cada nível, obtendo-se a repetibilidade através dos desvios padrões relativos (% CV). Os Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) do método foram estimados (em  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ ) graficamente a partir da inclinação e interseção da curva analítica, como descrito por Frehse e Thier (1991) e INMETRO (2003).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Resultados dos ensaios de recuperação

A porcentagem de recuperação variou entre os diferentes métodos de extração avaliados. Os resultados encontrados estão apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1 – Valores de recuperação obtidos através da Metodologia A em amostras de queijo parmesão ralado adicionados de  $0,5$  e  $1,0 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  de AFM<sub>1</sub>

Concentração adicionada	Replicata	% Recuperação*	Média ± DP	CV
$0,5 \mu\text{g.Kg}^{-1}$	1	32,3	35,9 % ± 5,0 %	14,0 %
	2	39,4		
$1,0 \mu\text{g.Kg}^{-1}$	1	40,3	42,7 % ± 3,4 %	7,9 %
	2	45,1		

\* Média da quantificação em duplicata. DP = Desvio Padrão CV = Coeficiente de Variação

Tabela 2 – Valores de recuperação obtidos através da Metodologia B em amostras de queijo parmesão ralado adicionados de  $0,5$  e  $1,0 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  de AFM<sub>1</sub>

Concentração adicionada	Replicata	% Recuperação*	Média ± DP	CV
$0,5 \mu\text{g.Kg}^{-1}$	1	39,6	43,8 % ± 5,9 %	13,4 %
	2	47,9		
$1,0 \mu\text{g.Kg}^{-1}$	1	44,3	47,5 % ± 4,5 %	9,5 %
	2	50,7		

\* Média da quantificação em duplicata. DP = Desvio Padrão CV = Coeficiente de Variação

Tabela 3 – Valores de recuperação obtidos através da Metodologia C em amostras de queijo parmesão ralado adicionados de  $0,5$  e  $1,0 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  de AFM<sub>1</sub>

Concentração adicionada	Replicata	% Recuperação*	Média ± DP	CV
$0,5 \mu\text{g.Kg}^{-1}$	1	66,8	72,4 % ± 7,9 %	10,9 %
	2	78,0		
$1,0 \mu\text{g.Kg}^{-1}$	1	82,0	89,4 % ± 5,2 %	5,9 %
	2	89,4		

\* Média da quantificação em duplicata. DP = Desvio Padrão CV = Coeficiente de Variação

Diversos autores e grupos de pesquisa concordam que os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de traços, situam-se entre 70 e 120%, com CV de no máximo 20% (COMUNIDADE EUROPÉIA, 1998; GARP, 1999; RIBANI et al., 2004).

Desta forma, a Metodologia C, proposta por Mayes e MacDonalds (1995) e Deveci (2007) pode ser considerada adequada para a extração de AFM<sub>1</sub> em amostra de queijo

parmesão ralado, já que apresentou recuperação de 72,2 % e 89,4 % quando adicionado de 0,5 e 1  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ , respectivamente, além do CV ter sido inferior a 20%. Em contrapartida, as Metodologias A e B não se mostraram reprodutíveis.

Portanto, a quantificação de AFM<sub>1</sub> nas amostras de queijo parmesão ralado foi realizada conforme Metodologia C, descrita no item 2.2.3. Esta melhor eficácia no processo de extração de AFM<sub>1</sub> pode ser atribuída a maior quantidade de solvente utilizado, bem como ao tempo de extração mais prolongado quando comparado com as demais metodologias testadas.

### 3.2 Quantificação de AFM<sub>1</sub> nas amostras analisadas

Nas condições experimentais adotadas, o tempo de retenção da AFM<sub>1</sub> foi de aproximadamente 11 minutos e, a linearidade da curva analítica superior a 0,99 como apresentado na Figura 1.

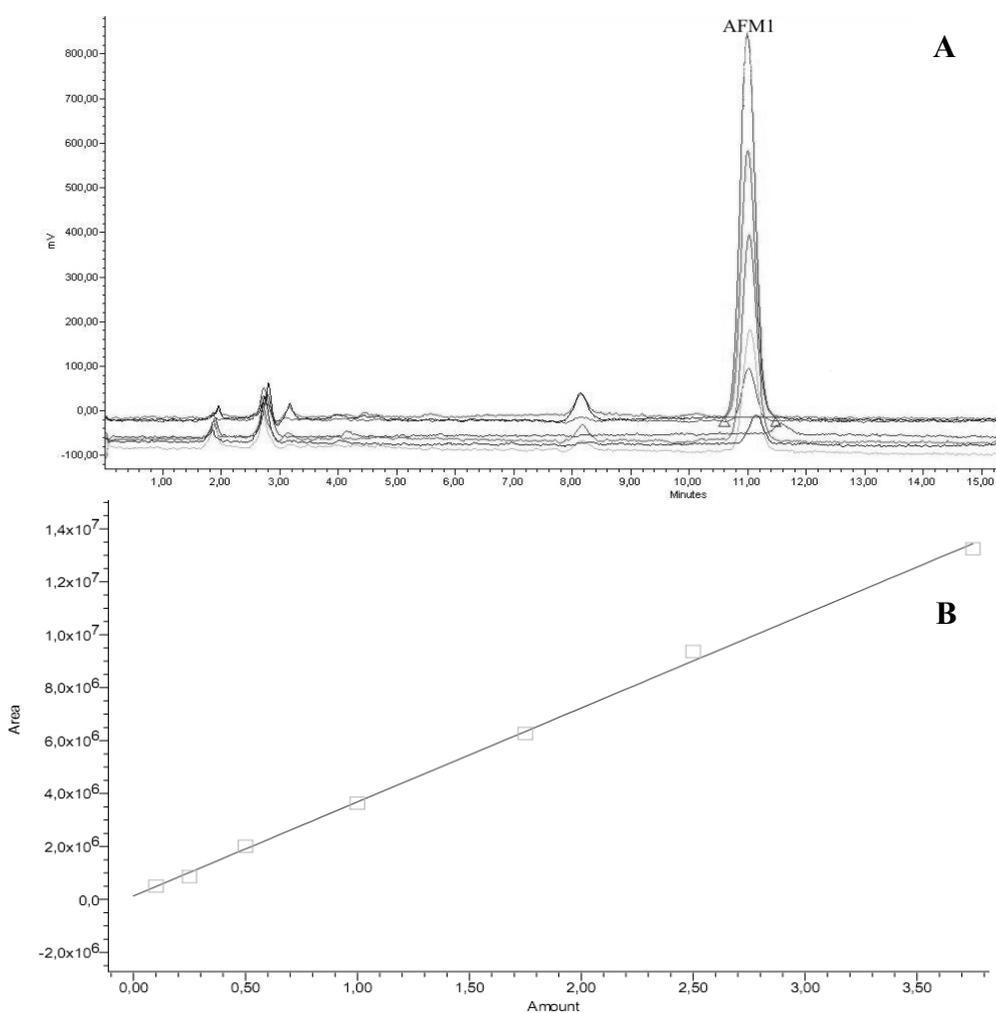


Figura 2 – Curva analítica para quantificação de AFM<sub>1</sub> em queijo parmesão ralado (padronização externa). A – Sobreposição dos cromatogramas de 7 pontos da curva em concentrações variando de 0,1 a 3,75  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ . B – Linearidade da curva com valor  $R^2 = 0,9985$ .

Os limites de detecção e quantificação do método foram de 0,02 e 0,05  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ , respectivamente. Pode-se observar pela Figura 3 a alta seletividade obtida, onde verifica-se a inexistência de interferentes próximos ao tempo de retenção da AFM<sub>1</sub>.

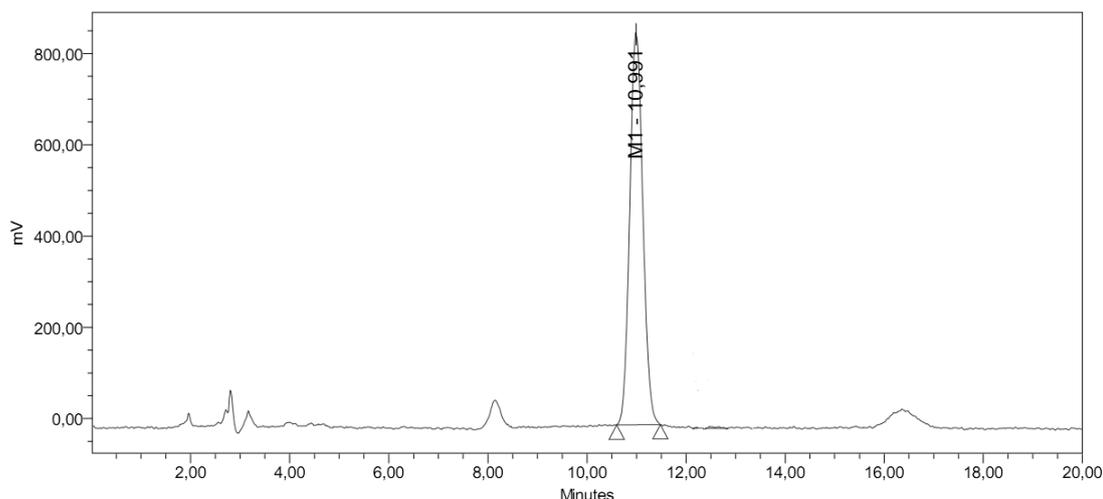


Figura 3 – Cromatograma obtido por CLAE-DF em amostra de queijo parmesão ralado contaminado artificialmente com 1  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$  de AFM<sub>1</sub>.

Desta forma, o método utilizado neste estudo demonstrou ser sensível, seletivo, preciso e com valores de recuperação de até 89,4%.

AFM<sub>1</sub> foi detectada em 18 amostras (60%), com valor máximo de 0,69  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$  e média de 0,16  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ . Nenhuma amostra ultrapassou o limite brasileiro de 2,5  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$  estipulado pela ANVISA (BRASIL, 2011).

No entanto, se fosse avaliado de acordo com a regulamentação da maioria dos países da União Européia, que adotam o valor máximo de 0,25  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$  de AFM<sub>1</sub> em queijos, 8 amostras (26,7%) estariam acima do limite permitido (EC, 2006).

A Tabela 4 apresenta os valores de AFM<sub>1</sub> encontrados nas amostras analisadas, os quais estão ilustrados na Figura 4.

Tabela 4 – Níveis de AFM<sub>1</sub>\* encontrados em amostras de queijo parmesão ralado comercializadas na Região Metropolitana do Rio de Janeiro em 2011

Marcas	Níveis de AFM <sub>1</sub> em $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ *		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
A	0,42 ± 0,02 (4,8)	0,52 ± 0,05 (9,0)	ND
B	0,16 ± 0,01 (3,1)	0,14 ± 0,01 (1,5)	0,10 ± 0,01 (3,9)
C	ND	ND	ND
D	0,06 ± 0,01 (4,6)	0,69 ± 0,01 (0,3)	0,09 ± 0,01 (0,7)
E	0,05 ± 0,01 (1,3)	0,07 ± 0,01 (1,1)	0,61 ± 0,03 (5,6)
F	0,27 ± 0,01 (4,7)	0,06 ± 0,01 (4,6)	ND
G	ND	0,34 ± 0,03 (9,5)	ND
H	ND	ND	ND
I	0,23 ± 0,02 (7,3)	0,49 ± 0,05 (9,5)	0,41 ± 0,02 (4,9)
J	0,08 ± 0,01 (3,3)	ND	ND

\* Média da quantificação em duplicata expresso em  $\mu\text{g.Kg}^{-1} \pm \text{DP} (\% \text{CV})$

ND = Não Detectado. Limite de Detecção: 0,02  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ , Limite de Quantificação: 0,05  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$

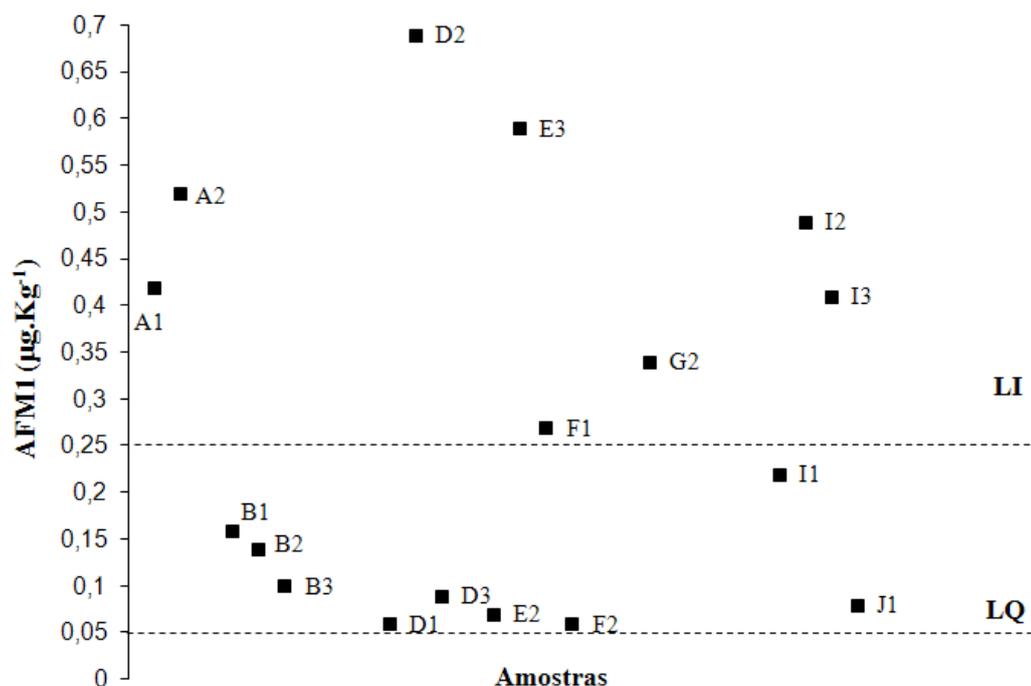


Figura 4 – Valores de AFM<sub>1</sub> (µg.Kg<sup>-1</sup>) encontrados nas amostras de queijo parmesão ralado comercializadas na região metropolitana do Rio de Janeiro em 2011. As linhas pontilhadas representam: LI – Limite Internacional, nível máximo para AFM<sub>1</sub> permitido em queijos pela legislação predominante nos países da União Européia; LQ – Limite de Quantificação do Método (0,05 µg.Kg<sup>-1</sup>). Letras representam marcas analisadas e números representam os lotes.

Os resultados deste trabalho são similares aos de outros estudos envolvendo quantificação de AFM<sub>1</sub> em queijose. Prado et al. (2008) avaliaram 88 amostras de queijo parmesão comercializados no estado de Minas Gerais. Os autores encontraram valores da micotoxina acima do limite adotado pela EU em duas amostras.

Contaminação em queijo Minas Padrão e queijo Minas Frescal também foram descritas por Oliveira et al. (2011), encontrando valores de AFM<sub>1</sub> variando de 0,04 até 0,31 µg.Kg<sup>-1</sup>.

A presença de AFM<sub>1</sub> em derivados lácteos também é descrita em outros países. Na Turquia, Ertas et al. (2011) reportaram a presença de AFM<sub>1</sub> em 135 (64%) de 210 amostras de diferentes tipos de produtos lácteos analisados. Em queijos os índices variaram de 0,01 até 0,37 µg.Kg<sup>-1</sup>.

No Egito, Amer e Ibrahim (2010) analisaram 150 amostras de diferentes tipos de queijos comercializados no país, encontrando valores de contaminação de até 0,25 µg.Kg<sup>-1</sup> de AFM<sub>1</sub>.

Na Itália, 41 amostras de queijos foram avaliadas e, cerca de 10% foram positivas para AFM<sub>1</sub> com o maior valor encontrado correspondente à 0,39 µg.Kg<sup>-1</sup> (VIRDIS et al., 2008).

No Ira, de 80 amostras analisadas, 66 (82,5%) foram positivas para AFM<sub>1</sub>. O valor máximo encontrado correspondeu à 0,52 µg.Kg<sup>-1</sup> e aproximadamente 60% das amostras positivas estavam acima do máximo permitido no país (0,25 µg.Kg<sup>-1</sup>) (KAMKAR, 2006).

Esta contaminação também é descrita em outros trabalhos envolvendo produtos lácteos derivados, incluindo diferentes tipos de queijos, como apresentado nos trabalhos de ELKAK et al. (2012), ANFOSSI et al. (2012), TAVAKOLI et al. (2012), FALLAH et al. (2011) e ELZUPIR e ELHUSSEIN (2010).

Neste trabalho, os resultados indicaram que este constante monitoramento dos níveis de AFM<sub>1</sub> em derivados lácteos comercializados no Brasil devem ser realizados com maior

frequência, especialmente pelo fato do país possuir atualmente um limite específico para a presença desta micotoxina em queijos.

#### 4 CONCLUSÕES

De um total de 30 amostras de queijo parmesão ralado analisadas, 18 (60%) apresentaram níveis quantificáveis de AFM<sub>1</sub>. Todas as amostras estavam abaixo do limite máximo para AFM<sub>1</sub> em queijos permitido pela atual legislação, entretanto, 8 (26,7%) poderiam ser consideradas contaminadas se fosse considerada a legislação adotada pela União Européia. Apesar da legislação brasileira ter adotado um limite para a presença de AFM<sub>1</sub> em queijos, esta ainda é insuficiente por não contemplar outros derivados lácteos.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMER, A.A.; IBRAHIM, M.A.E. Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk and traditional cheeses retailed in Egyptian markets. **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences**, v.2, n.4, p.50-53, 2010.
- ANFOSSI, L.; BAGGIANI, C.; GIOVANNOLI, C.; D'ARCO, G.; PASSINI, C.; GIRAUDI. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in Italian cheese: Results of a survey conducted in 2010 and correlation with manufacturing, production season, milking animals, and maturation of cheese. **Food Control**, v.25, n.1, p.125-130, 2012.
- AOAC. Aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and Cheese. Method 980.21. In: **Official Method of Analysis of AOAC International**, 16 ed., v. 2. Food composition; additives; natural contaminants, Natural Toxins, p.37-38, 2000.
- ARANA, S.; DAGLI, M.L.Z.; SABINO, M. et al. Evaluation of the efficacy of hydrated sodium aluminosilicate in the prevention of aflatoxin-induced hepatic cancer in rainbow trout. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 9, set., 2011 .
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 357 de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Ralado. **Diário Oficial da União**. Brasília, 08 set. 1997.
- BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada N° 7, de 18 de fevereiro de 2011. Limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 09 mar. 2011. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>>. Acesso em: 17 set. 2011.
- CARDOSO, V.S.; CASTRO, I.S.; LIMA, C.A.R. et al . Efficacy of piperine in reducing the effects of aflatoxin intoxication in broiler chickens: a preliminary report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 2, Abr. 2011 .
- COMISSÃO EUROPÉIA. Directiva 98/53/CE da Comissão de 17 de Julho de 1998, Anexo II. **Jornal Oficial das Comunidades Européias**, p. 93-101, 1998.
- DEVECI, O. Changes in the concentration of aflatoxin M<sub>1</sub> during manufacture and storage of White Pickled cheese. **Food Control**, v.18, n.9, p.1103–1107, set., 2007.
- DRAGACCI, S.; GLEIZES, E.; FREMY, J.M.; CANDLISH, A.G. Use of immunoaffinity chromatography as a purification step for the determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in cheeses. **Food Additives and Contaminants**, v.12, n.1, p.59-65, 1995.
- ERTAS, N.; GONULALAN, Z.; YILDIRIM, Y. et al. A survey of concentration of aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products marketed in Turkey. **Food Control**, v.22, n.1, p. 1956-1959, 2011.
- ELGERBI, A.M.; AIDOO, K.E.; CANDLISH, A.A.G.; TESTES, R.F. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in randomly selected in North African milk and cheese samples. **Food Additives and Contaminants**, v.21, n.1, p.592-597, 2004.

ELKAK, A.; EL ATAT; HABIB, J. et al. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in cheese processed and marketed in Lebanon. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 140-143, mai., 2012.

EL KHOURY, A.; ATOUI, A.; YAGHI, J. Analysis of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and yogurt and AFM<sub>1</sub> reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. **Food Control**, v.22, n.1, p. 1695-1699, 2011.

ELZUPIR, A. O.; ELHUSSEIN, A. M. Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy cattle milk in Khartoum State, Sudan. **Food Control**, v.21, n.1, p.945-946, 2010.

ERTAS, N.; GONULALAN, Z.; YILDIRIM, Y. et al. A survey of concentration of aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products marketed in Turkey. **Food Control**, v. 22, n.1, p. 1956-1959, 2011.

EUROPEAN COMMISSION (EC) Regulation. Commission regulation. No. 1881/2006 of 19 December 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Communities**, p. 2-25, 2006.

FALLAH, A. A.; RAHNAMA, M.; JAFARI, T. et al. Seasonal variation of aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. **Food Control**, v.22, n.1, p.1653-1656, 2011.

FREHSE, H.; THIER, H.P. Die ermittlung er nachweisgrenze und bestimmungsgrenze bei ruck standanalysen nach dem neuen. **DFG-Konzept**, v.35, n.1, p. 285-91, 1991.

GARP - Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas; Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos (apostila), 1999.

HUSSEIN, S.H.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v.167, n.2, p.101-134, out., 2001.

IARC, International Agency for Research on Cancer. Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans, World Health Organization, some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances. In.: **Summary of data reported and evaluation**, v. 73, p.131-182, Lyon, 1999.

IARC, International Agency for Research on Cancer. Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans, World Health Organization, some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. In.: **Summary of data reported and evaluation**, v. 82, p. 171-175. Lyon, 2002.

IHA, M.H.; BARBOSA, C.B.; OKADA, I.A. et al. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products in Brazil. **Food Control**, v. 22, n. 12, p. 1971-1974, out., 2011.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008, mar. 2003. 35 p.

KAMKAR, A. A study on the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in Iranian Feta cheese. **Food Control**, v. 17, n.1, p. 768-775, 2006.

KAMKAR, A.; KARIM, G.; ALIABADI, F.S. et al. Fate of aflatoxin M<sub>1</sub> in Iranian white cheese processing, **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.1, p.2236-2238, 2008.

MARTINS, H.M.; MAGALHÃES, S.A.; ALMEIDA, I. et al. Aflatoxin M<sub>1</sub> determination in cheese by immunoaffinity column clean-up coupled to high-performance liquid chromatography. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinárias**, v. 102, n.1, p. 321-325, 2007.

MAYES, L.; MACDONALDS, S. Aflatoxin M<sub>1</sub> in retail milk and milk products. Norwich **Research Park**, Colney Norwich: CSL Foods Science Laboratory, p. 6-17, 1995.

MAZIERO, M.T.; BERSOT, L.S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.12, n.1, p.89-99, 2010.

OLIVEIRA, C.A.F.; SEBASTIÃO, L.S.; FAGUNDES, H.; ROSIM, R.E.; FERNANDES, A.M. Determinação de aflatoxina B<sub>1</sub> em rações e aflatoxina M<sub>1</sub> no leite de propriedades do Estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.1, p.221-225, mai., 2010.

- OLIVEIRA, C.A.F.; FRANCO, R.C.; ROSIM, R.E. et al. Survey of aflatoxin M<sub>1</sub> in cheese from the Northeast region of São Paulo, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v.4, n.1, p. 57-60, 2011.
- PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S. de; LIMA, A.S. et al. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in Parmesan cheese in Minas Gerais, Brazil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1906-1911, dez., 2008.
- RAMOS, C.R.B.A.; BRASIL, E.M.; GERALDINE, R.M. Avaliação de métodos de extração, limpeza e purificação de aflatoxinas para análise em cromatografia líquida de alta eficiência. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 38, n. 2, p. 103-108, jun. 2008.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G; COLLINS, C.H. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, out., 2004.
- RITTER, A.C.; HOELTZ, M.; NOLL, I.B. Toxigenic potential of *Aspergillus flavus* tested in different culture conditions. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 3, set., 2011.
- SADEGHI, N.; OVEISI, M.R.; JANNAT, B. et al. Incidence of aflatoxin M<sub>1</sub> in human breast milk in Tehran, Iran. **Food Control**, v.20, n.1, p. 75–78, jan., 2009.
- SAKUMA, H.; KAMATA, Y.; SUGITA-KONISHI, Y. et al. Method for Determination of Aflatoxin M<sub>1</sub> in Cheese and Butter by HPLC using an Immunoaffinity column. **Food Hygiene and Safety Science**, v. 52, n.4, p. 220-225, ago., 2011.
- SHUNDO, L.; NAVAS, S.A.; LAMARDO, L.C.A.; RUVIERI, V.; SABINO, M. Estimate of aflatoxin M<sub>1</sub> exposure in milk and occurrence in Brazil. **Food Control**, n.20, p.655–657, 2009.
- TABARI, M.; KARIM, G.; GHAVAMI, M. et al. Method validation for aflatoxin M<sub>1</sub> determination in yoghurt using immunoaffinity column clean-up prior to high-performance liquid chromatography. **Toxicology and Industrial Health**, v. 27, n.7, p. 629-635, ago. 2011.
- TAVAKOLI, H. R.; RIAZIPOUR, M.; KAMKAR, A. et al. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in white cheese samples from Tehran, Iran. **Food Control**, v.23, n.1, p.293-295, 2012.
- TRUCKSESS, M.W. Rapid analysis (thin layer chromatographic and immunochemical methods) for mycotoxins in foods and feeds. In.: KOE, W.J.; SAMSON, R.A.; EGMOND, H. P. et al. **Mycotoxins and Phycotoxins in perspective at the turn of the millennium**. Wageningen: Ponsen & Looyen, p.29-40, 2001.
- URBÁN, G.; PÉREZ, J.; MARTINÉZ, F. et al. Niveles de aflatoxina M<sub>1</sub> en quesos frescos producidos en diferentes zonas de México. **Revista de Salud Animal**, v.31, n.2, p.115-121, 2009.
- VIRDIS, S. et al. Occurrence of Aflatoxin M<sub>1</sub> in tank bulk goat milk and ripened goat cheese. **Food Control** v.19, n.1, p. 44–49, 2008.

## **CAPÍTULO III**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO  
PARMESÃO RALADO COMERCIALIZADO NO RIO DE JANEIRO**

**CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL QUALITY EVALUATION OF GRATED  
PARMESAN CHEESE MARKETED IN RIO DE JANEIRO**

**Publicado na REVISTA DO INSTITUTO DE LATICÍNIOS CÂNDIDO TOSTES –  
ILCT, volume 67, nº 385 de março/abril de 2012.**

## RESUMO

O queijo ralado é um alimento popularmente consumido no país e, na última década poucos trabalhos objetivaram estudar sua qualidade. Nesta pesquisa procurou-se avaliar a adequação do queijo parmesão ralado comercializado na Região Metropolitana do Rio de Janeiro em relação ao preconizado pela legislação atual. Foram coletadas trinta amostras de dez marcas do produto e analisadas suas características químicas e qualidade microbiológica através de metodologias oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Os teores de umidade encontrados variaram de 14,6 a 23,5 g.100g<sup>-1</sup>, estando seis amostras (20%) acima do limite máximo de 20 g.100g<sup>-1</sup>. A Atividade de Água variou de 0,703 a 0,829 e o pH de 4,34 a 5,36, com média de 4,90. Os valores de acidez titulável apresentaram grandes variações entre amostras de mesma marca, indicando falta de uniformidade na produção. Já na pesquisa do conservante ácido sórbico, os teores encontrados variaram desde não detectável até 1.285 mg.Kg<sup>-1</sup>, sendo que, dez amostras (33,3%) estavam acima do limite máximo de 1.000 mg.Kg<sup>-1</sup>. Nas pesquisas microbiológicas, foram constatadas contaminações por fungos filamentosos e leveduras em cinco amostras (16,7%), uma destas com contagem de 3,0 x 10<sup>5</sup> UFC.g<sup>-1</sup>. Das amostras analisadas, apenas quatorze (46,7%) estavam em acordo com a legislação que regulamenta a qualidade do queijo ralado comercializado no país. Desta forma, faz-se necessário maior rigor nas fiscalizações pelas autoridades responsáveis.

**Palavras-chave:** umidade, Atividade de água, ácido sórbico, *Escherichia coli*, *Salmonella*, fungos.

## ABSTRACT

The grated cheese is a food commonly consumed in the country and in the last decade few studies have studied its quality. In this study was evaluated the adequacy of grated parmesan cheese marketed in the Metropolitan Region of Rio de Janeiro in relation to the recommendations of current laws. Thirty samples were collected from ten product brands and analyzed their chemical and microbiological quality through methodologies official of the Agriculture, Livestock and Supply Ministry. The moisture found ranged from 14,6 to 23,5 g.100g<sup>-1</sup>, with six samples (20%) above the maximum limit of 20 g.100g<sup>-1</sup>. Water activity ranged from 0,703 to 0,829 and pH 4,34 to 5,36, averaging 4,90. The acidity values showed large variations between samples of the same brand, indicating lack of uniformity in production. In the search of the preservative sorbic acid, the contents ranged from undetectable to 1.285 mg.Kg<sup>-1</sup>, and ten samples (33.3%) were above the maximum limit of 1.000 mg.Kg<sup>-1</sup>. In microbiological research, fungal contamination was found in five samples (16.7%), those with a count of 3,0 x 10<sup>5</sup> CFU.g<sup>-1</sup>. Of the samples analyzed, only fourteen (46,7%) were in accordance with the laws regulating the quality of cheese market in the country. Thus, is necessary tightening up inspections by the authorities.

**Key words:** moisture, Water activity, sorbic acid, Escherichia coli, Salmonella, molds.

# 1 INTRODUÇÃO

Queijo ralado é um alimento pronto para consumo e utilizado popularmente no acompanhamento de massas e molhos. É definido como o produto obtido por esfarelamento ou ralagem da massa de uma ou até quatro variedades de queijos aptos para o consumo humano, parcialmente desidratado ou não. Quanto a denominação de venda, o “queijo parmesão ralado” poderá apresentar como ingredientes, além do queijo parmesão, até 25% m/m de outras variedades de queijos de baixa umidade (BRASIL, 1997).

Por ser um produto perecível, o queijo ralado está susceptível a contaminações de diversas origens durante sua cadeia produtiva. Com relação a qualidade microbiológica, é exigida para a variedade de baixa umidade (até 20 g.100g<sup>-1</sup>) a determinação de coliformes a 35 °C e a 45 °C, estafilococos coagulase positivo, fungos filamentosos, leveduras e *Salmonella* sp (BRASIL, 1997).

Tabela 1 – Critérios microbiológicos de aceitação para queijo ralado elaborado com única variedade de queijo de baixa umidade.

<b>Microrganismo</b>	<b>Critério de Aceitação</b>			
Coliformes/g (30°C)	n = 5	c = 2	m = 200	M = 1000
Coliformes/g (45°C)	n = 5	c = 2	m = 100	M = 500
Estafilococos coag. pos./g	n = 5	c = 2	m = 100	M = 1000
Fungos e leveduras/g	n = 5	c = 2	m = 500	M = 5000
<i>Salmonella</i> sp/25g	n = 5	c = 0	m = 0	

n = número de unidades a serem colhidas aleatoriamente na análise representativa; c = número máximo de amostras com qualidade intermediária aceitável (entre m e M) m = limite inferior da qualidade marginal; M = separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável.

Fonte: BRASIL (1997).

A multiplicação de fungos filamentosos é um agravante neste produto, pois, além de serem deteriorantes e indicadores de más condições higiênicas, podem reduzir a acidez do alimento favorecendo o desenvolvimento de bactérias patogênicas e também promover a formação de micotoxinas (SOFOS & BUSTA, 1993; SALAVESSA, 2009).

Para a inibição dos fungos em queijo ralado, além dos aditivos já presentes na matéria prima, é admitido o uso dos conservantes natamicina e ácido sórbico. Os sorbatos de sódio e potássio são comumente utilizados, sendo permitido no produto concentrações de até 1000 mg.Kg<sup>-1</sup> (BRASIL, 1997). Tal limite segue as recomendações do Comitê Conjunto de Peritos em Aditivos Alimentares - JECFA, para uso seguro de aditivos em alimentos (WHO, 1997), já que, mesmo possuindo baixa toxicidade, o ácido sórbico é uma substância que pode causar efeitos tóxicos ao organismo quando em altas concentrações no alimento (FERRAND, 2000).

Desta forma, pesquisar a qualidade do queijo ralado atualmente comercializado no país é de grande relevância, pois trata-se de um alimento popularmente consumido, o que conseqüentemente envolve questões relacionadas à saúde destes consumidores. Deve ainda ser ressaltado que no Brasil, poucos estudos sobre o assunto foram publicados em periódicos científicos, podendo ser citados na última década, os estudos de Pimentel et al. (2002) e Justus et al. (2011) que encontraram produtos fora dos parâmetros estabelecidos pela legislação vigente e, também, impróprios para o consumo devido a contaminações de origem microbiana ou química.

Neste estudo, o objetivo foi avaliar a qualidade química, microbiológica e adequação do queijo parmesão ralado comercializado na região metropolitana do Rio de Janeiro em relação ao preconizado pela legislação atual.

## 2 METODOLOGIA

Foram coletadas entre janeiro e março de 2011 um total de 120 unidades de 10 diferentes marcas de queijo parmesão ralado comercializadas na região metropolitana do Rio de Janeiro (municípios de Niterói, Rio de Janeiro e Seropédica). O critério adotado para a coleta das mesmas constitui-se em retirar 4 unidades de cada um de 3 lotes expostos do produto (10 marcas x 3 lotes x 4 unidades por lote).

Desta forma, das quatro unidades coletadas por lote, uma foi escolhida aleatoriamente para a análise indicativa da qualidade microbiológica, e para as análises químicas utilizaram-se um pool das três restantes, perfazendo 30 amostras de laboratório em ambas as pesquisas, químicas e microbiológicas.

Todas as marcas apresentaram selo de Inspeção Federal (SIF) e se enquadravam dentro do prazo de validade estabelecido pelos fabricantes. Após coleta foram designadas letras de A a J para cada uma das dez marcas, e numeração de 1 a 3 para cada lote.

Todas as análises foram realizadas em triplicatas e de acordo com metodologia preconizada nos Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos (BRASIL, 2006). Determinaram-se os valores de umidade em estufa a 102°C, atividade de água (Aa) por leitura direta em Aqualab modelo CX-2T, pH, acidez titulável e ácido sórbico.

O ácido sórbico foi extraído por destilação em arraste de vapor e convertido à aldeído malônico, o qual formou com o ácido tiobarbitúrico um composto de coloração vermelha, sendo quantificado por absorvância a 532nm (BioSpectro SP-220) utilizando cubetas de vidro de 2 mm de caminho óptico. O Limite de Detecção (LD) do método foi estimado (em mg.Kg<sup>-1</sup>) graficamente a partir da inclinação e interseção da curva analítica, como sugerido por FREHSE & THIER (1991) e INMETRO (2003).

Os dados obtidos nas determinações químicas foram submetidos à estatística descritiva e Análise de Variância (ANOVA) com comparação das médias pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Para as análises microbiológicas, utilizaram-se 25 g de amostra diluída em 225 mL de solução salina peptonada 0,1%, e, para pesquisa de *Salmonella* sp foi utilizada solução salina peptonada 1% tamponada. A homogeneização das amostras ocorreu em Stomacher<sup>®</sup> circulador 400.

Foram pesquisados os microrganismos exigidos pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Ralado de “baixa umidade” (BRASIL, 1997), sendo: coliformes totais e a 45 °C, estafilococos coagulase positiva, fungos filamentosos, leveduras, e *Salmonella* sp., todas de acordo com a metodologia oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2003c).

A partir do resultado positivo para coliformes a 45 °C foi realizada contagem de *Escherichia coli* pelo método tradicional para alimentos, com identificação bioquímica pelas provas típicas da série IMViC (Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e Ágar Citrato de Simmons) (SILVA et al., 2007).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com as descrições observadas nos rótulos dos produtos, o único ingrediente utilizado em todas as marcas foi o queijo parmesão. Em apenas uma amostra (3,3%) foi observada a indicação do uso do anti-umectante dióxido de silício e, nas trinta (100%) utilizaram-se como conservante o ácido sórbico ou sorbato de potássio. Esta preferência pelo uso de sais do ácido sórbico em queijos e derivados lácteos é relatada por vários autores e comumente realizada pelos fabricantes, já que apresenta eficiente inibição de fungos com

conseqüente aumento na vida de prateleira do produto (THERON & LUES, 2007; COMA, 2008, SALAVESSA, 2009).

Já a indicação do uso de natamicina não foi observada em nenhuma amostra como aditivo utilizado. Apesar de ser autorizado para uso em queijo ralado, acredita-se que a admissão do uso deste conservante não é aprovada pelos consumidores mais informados por tratar-se de um antibiótico.

Com relação as determinações químicas, os teores de umidade encontrados variaram de 14,6 a 23,5 g.100g<sup>-1</sup>, com Coeficiente de Variação (CV) = 12,6% e valor médio correspondendo a 18,2 g.100g<sup>-1</sup>. Conforme ilustrado na Figura 1, seis amostras (20%) não se adequaram ao limite máximo (até 20 g.100g<sup>-1</sup>) permitido pela legislação de “queijo ralado desidratado com predominância (> 50% m/m) de queijo de baixa umidade”.

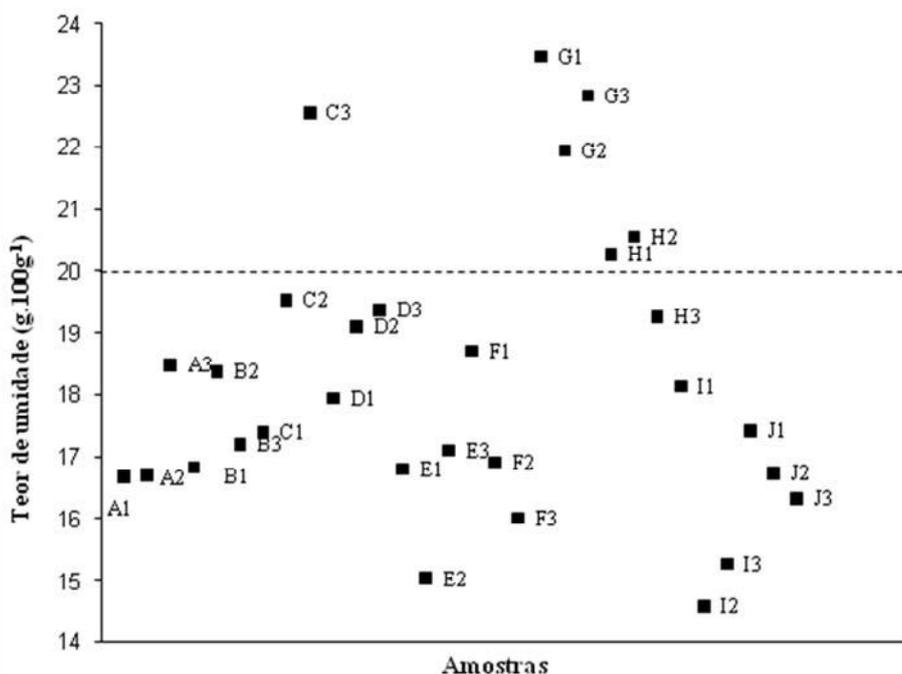


Figura 1 – Valores de umidade (g.100g<sup>-1</sup>) encontrados nas amostras de queijo parmesão ralado comercializadas na região metropolitana do Rio de Janeiro em 2011. A linha pontilhada respresenta o limite máximo permitido pela legislação (BRASIL, 1997). Letras representam marcas analisadas e números representam os lotes.

Estes resultados foram semelhantes aos descritos por Pimentel et al. (2002), que encontraram cerca de 40% das amostras acima do limite máximo tolerável de umidade (20 g.100g<sup>-1</sup>). Também na avaliação feita pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO (BRASIL, 2003a) em dezoito marcas de queijo ralado, sete (38,8%) amostras estavam em desacordo com a legislação quanto aos teores de umidade.

Os valores de Atividade de água encontrados variaram de 0,703 a 0,829. Na literatura científica diversos autores concordam que o valor de 0,800 é limitante para o desenvolvimento da maioria dos fungos deteriorantes em alimentos (FORSYTH, 2010; JAY, 2005; FRANCO & LANDGRAF, 2004). Neste estudo, duas das seis amostras que se encontravam acima do limite máximo de umidade, também apresentaram Aa acima de 0,800.

Tais condições podem favorecer o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos, reduzindo a vida de prateleira do alimento e representando um risco à saúde dos consumidores. O consumidor ainda será lesado por adquirir um produto com maior

quantidade de água do que o permitido e, da mesma forma, os fabricantes comprometem a concorrência justa por estarem obtendo vantagens em seus produtos de maneira ilegal.

Os valores de pH variaram entre 4,34 a 5,36, com média de 4,90. A variação entre as amostras das diferentes marcas analisadas foi pequena, com CV de 4,6%. Tais resultados são semelhantes aos descritos por Pimentel et al. (2001), porém, distintos daqueles apresentados por Justus et al. (2011), que encontraram valores na faixa de 5,73 a 6,97, o que segundo os autores, seria indicativo de fraude no produto.

Em relação aos resultados da acidez titulável, estes apresentaram grandes variações entre as amostras avaliadas (CV=47,4%), com valores de 0,5 até 2,0 g.100g<sup>-1</sup> de ácido láctico, e média de 1,09 g.100g<sup>-1</sup>. De acordo com o Regulamento Técnico, a acidez do queijo ralado deverá ser semelhante a variedade de queijo do qual provenha. Pesquisa realizada por Barros et al (2011), demonstra que os teores de acidez em queijo parmesão variam ao longo do período de maturação, sendo relatados valores na faixa entre 0,56 g.100g<sup>-1</sup> e 1,77 g.100g<sup>-1</sup> de ácido láctico, indicando que os resultados encontrados neste estudo podem ser considerados adequados, já que foram avaliadas diferentes marcas.

A partir dos valores de acidez, foi possível ainda evidenciar a falta de padronização na produção, uma vez que, houve variações discrepantes entre amostras do mesmo lote, encontrando-se CV na faixa entre 10% e 39%. De acordo com Yoon & Tran (2011), a falta de homogeneidade em produtos de uma determinada marca ao longo do tempo prejudica a relação consumidor/produto, já que a uniformidade da produção é um dos principais fatores na fidelização dos clientes. Desta forma, as empresas fabricantes dos queijos ralados amostrados neste estudo não estariam atendendo as exigências atuais do mercado consumidor.

Na pesquisa do conservante ácido sórbico, os valores obtidos variaram do não detectado a 1.285 mg.Kg<sup>-1</sup>. Teores de até 1000 mg.Kg<sup>-1</sup> foram observados em 66,6% das amostras, e como ilustrado na Figura 2, dez amostras (33,3%) apresentaram-se acima do limite máximo tolerado de 1.000 mg.Kg<sup>-1</sup> (BRASIL, 1997).

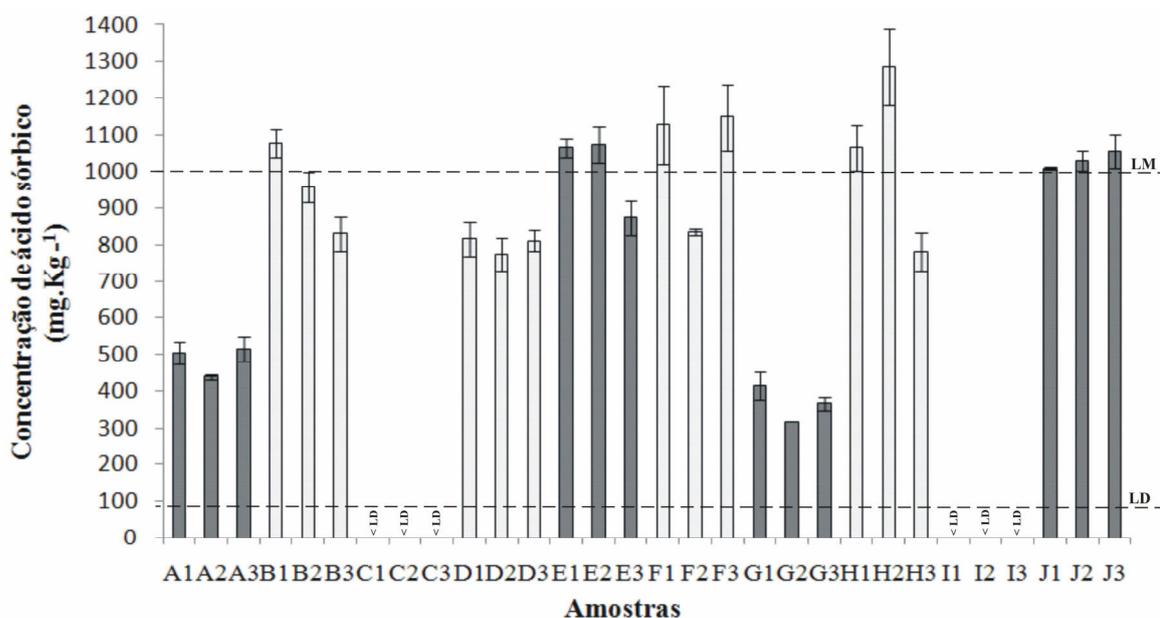


Figura 2 – Teores do conservante ácido sórbico (expresso em mg.Kg<sup>-1</sup> com barra de desvio padrão) encontrados nas amostras de queijo parmesão ralado comercializadas na região metropolitana do Rio de Janeiro em 2011. As linhas pontilhadas representam: LD – Limite de Detecção do Método; LM – Limite máximo de ácido sórbico em queijo ralado permitido pela legislação (BRASIL, 1997). Colunas de tons diferentes distinguem lotes de uma mesma marca. Letras representam marcas analisadas e números representam os lotes.

De acordo com Sofos & Busta (1993), a adição de ácido sórbico em concentrações na faixa de 0,05 a 0,3% possui reconhecido efeito inibitório no desenvolvimento de fungos, inclusive em espécies micotoxigênicas. Neste estudo, a concentração do conservante variou de não detectado a 0,19%. O valor máximo presente em uma porção do produto (considerando 10 g) correspondeu a 12,8 mg.

A Organização Mundial de Saúde – OMS, estipula a Ingestão Diária Aceitável - IDA de ácido sórbico em 25 mg.Kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo (WHO, 1997), e, portanto, os teores do conservante encontrados nas amostras de queijo parmesão ralado não podem ser considerados suficientes para atingir a IDA, mesmo nas amostras onde foram ultrapassados o limite máximo estabelecido pela legislação brasileira.

Entretanto, apesar do ácido sórbico possuir baixa toxicidade e ser metabolizado por caminhos semelhantes aos dos ácidos orgânicos, o mesmo é empregado em vários alimentos e seu consumo constante e em níveis altos pode provocar efeitos adversos no organismo, tais como acidose metabólica, urticária, asma, hiperpnéia e convulsões (WHO, 1997; FERRAND, 2000).

Quanto ao valor encontrado para o Limite de Detecção do método, este correspondeu a 94 mg.Kg<sup>-1</sup>. Ressalta-se que, apesar de existirem metodologias de quantificação de ácido sórbico mais sensíveis (TFOUNI & TOLEDO, 2002; LETH et al., 2010), o valor encontrado pode ser considerado adequado pela finalidade na qual o método destinou-se, ou seja, a verificação da conformidade dos produtos amostrados em relação ao preconizado pela legislação. A metodologia oficial demonstrou ainda ser de fácil execução e aplicabilidade, possuindo baixo custo e não necessitando da aquisição de materiais certificados.

Em relação aos resultados microbiológicos, todas as amostras apresentaram contagem de estafilococos coagulase positiva < 1,0 x 10<sup>1</sup> (estimado) e ausência de *Salmonella* sp em 25 g. Duas amostras (6,66%) foram positivas para coliformes totais e a 45 °C, com número de termotolerantes em até 4,0 x 10<sup>1</sup> NMP.g<sup>-1</sup>, valor ainda abaixo do limite máximo permitido pela legislação (5,0 x 10<sup>2</sup> NMP.g<sup>-1</sup>). Ressalta-se que, mesmo com esta qualidade marginal aceitável, estes resultados indicam a contaminação de origem fecal direta ou indireta das amostras onde foram identificados. Entretanto, dos tubos positivos para coliformes a 45 °C, não foram confirmadas a presença de *Escherichia coli*.

Cinco amostras (16,7%) apresentaram contagem de fungos filamentosos e leveduras acima do limite máximo permitido pela legislação vigente (BRASIL, 1997), uma destas com contagem de 3,0 x 10<sup>5</sup> UFC.g<sup>-1</sup>, indicando práticas higiênicas insatisfatórias durante o processo de fabricação do queijo parmesão ralado, o que inclusive pode representar ainda um risco sanitário, já que o desenvolvimento de alguns fungos pode ser acompanhado da formação de micotoxinas no produto.

Nas amostras contaminadas por fungos, não foi possível estabelecer uma associação com os resultados encontrados nas determinações químicas, tais como valores de umidade acima do permitido ou Aa acima de 0,800 ou ainda, baixas concentrações de ácido sórbico.

Com exceção da contagem de fungos filamentosos e leveduras, os resultados microbiológicos deste estudo são semelhantes aos encontrados por Pimentel et al. (2002) e pela avaliação realizada pelo INMETRO (BRASIL, 2003a), onde não foram observadas contaminações de origem microbiológica acima dos limites máximos permitidos pela legislação em nenhuma amostra analisada.

#### 4 CONCLUSÕES

Das amostras analisadas, apenas quatorze (46,7%) estavam em acordo com a legislação que regulamenta a qualidade do queijo ralado comercializado no país. Tais

resultados evidenciam a ocorrência de falhas nas boas práticas de fabricação do queijo parmesão ralado, e, ainda que não ofereçam riscos diretos à saúde do consumidor, faz-se necessário maior rigor nas fiscalizações pelas autoridades responsáveis.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROS, J. J. C. **Estudo in situ de culturas autóctones de *Lactobacillus helveticus* autolíticos sobre a dinâmica bioquímica e sensorial do queijo Parmesão**. 2009.106f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 357 de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Ralado. **Diário Oficial da União**. Brasília, 08 set. 1997.
- BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Programa de Análise de produtos. **Análise da conformidade das amostras de queijo ralado**. 14 mar. 2003. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/consumidor/prodAnalizados.asp>>. Acesso em: 25 ago. 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 26 de outubro de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**. Brasília, 18 set. 2003c. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/legislacao>>. Acesso em: 25 ago. 2011.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos Analíticos Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 14 dezembro 2006.
- COMA, V. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. **Meat Science**, v.78, n. 3, p. 90-103, fev., 2008.
- FERRAND C.; MARC, F.; FRITSCH, P. et al. Mutagenicity and genotoxicity of sorbic acid-amine reaction products. **Food Additives and Contaminants**, v.17, n. 11, p.895-901, dez. 2000.
- FORSYTHE, S.J. **The microbiology of safe food**. 2ª ed. London, Wiley-Blackwell, 2010. 476p.
- FRANCO, B.D.G; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2004. 182p.
- FREHSE, H.; THIER, H.P. Die ermittlung er nachweisgrenze und bestimmungsgrenze bei ruck standanalysen nach dem neuen. **DFG-Konzept**, v.35, n.1, p. 285-91, 1991.
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008, mar. 2003. 35 p.
- JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. Gaithersburg: Aspen, 2005. 854p
- JUSTUS, A.; FERRARI, L.M.B.; RODRIGUES, L.R. et al. Caracterização física e química de queijos parmesão ralado comercializados na Região Sul de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.66, n.379, p. 16-24, mar./abr. 2011.
- LETH, T.; CHRISTENSEN, T.; LARSEN, I.K. Estimated intake of benzoic and sorbic acid in denmark. **Food Additives and contaminants**, v. 26, n. 6, p. 783-792, mar., 2010.
- PIMENTEL, E.F.; DIAS, R.S.; RIBEIRO-CUNHA, M. et al. Avaliação da rotulagem e da qualidade físico-química e microbiológica de queijo ralado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.3, p.289-294, dez. 2002.
- SALAVESSA, J.J.S.M. **Salsicharia tradicional da zona do Pinhal: caracterização e melhoramento da tecnologia de fabrico dos Maranhos**. 2009. 321f. Tese. (Doutorado em

Ciência e Tecnologia Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/10400.5/2843>>. Acesso em: 25 ago. 2011.

SALVADOR, M. CAMASSOLA, M.; MOSCHEN, E.S. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo prato e parmesão ralado. **Boletim CEPPA**, v. 19, n. 1, p. 65-74, jun. 2001.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 552p.

SOFOS, J.; BUSTA, F. Sorbic acid and sorbates. In: DAVIDSON, P. & BRANEN, A. **Antimicrobials in foods**. Idaho: Marcel Dekker, 1993. p. 49-94.

TFOUNI, S.A.V.; TOLEDO, M.C.F. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. **Food Control**, v. 13, n.2, p. 117-123, mar. 2002.

THERON, M.; LUES, J. Organic acids and meat preservation: a review. **Food reviews international**, v. 23, n. 2, p. 141-158, abr. 2007.

WHO - World Health Organization. Evaluation of certain food additives and contaminants. In. **WHO Technical Report Series**, n. 868, 1997. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_868.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_868.pdf)> Acesso em: 25 ago. 2011.

YOON, K.; TRAN, T.V. Revisiting the relationship between consumer loyalty and price sensitivity: the moderating role of deal-proneness. **The Journal of Marketing Theory and Practice**, v.19, n.3, p.293-306, dez. 2011.

### 3 CONCLUSÕES

Estudos visando monitorar a qualidade do queijo ralado comercializado, especialmente àqueles relacionados com pesquisas de fraudes e adulterações do produto, ainda são necessários de serem enfatizados no país. Neste trabalho, apenas 14 amostras das 30 analisadas (46,7%) estavam em acordo com a legislação que regulamenta a qualidade do produto. Além da falta de uniformidade na produção, as principais irregularidades constatadas foram referentes ao excessivo teor de umidade e também pela adição abusiva do conservante ácido sórbico. Tais resultados sugerem a ocorrência de falhas nas Boas Práticas de Fabricação pelas indústrias responsáveis pelas marcas analisadas, o que representa além de fraude econômica, riscos à saúde do consumidor, mesmo que de forma indireta. Com relação à presença de aflatoxina M<sub>1</sub>, mesmo estando em vigor, a legislação atual ainda é insuficiente para fiscalização de derivados lácteos, já que contempla somente os queijos. Ainda assim, o limite existente para presença da micotoxina neste produto é excessivamente alto quando comparado com os estabelecidos por outros países. Desta forma, todas as amostras se adequaram a legislação nacional quanto à presença de AFM<sub>1</sub>. Como forma de controle desta contaminação nos queijos, sugere-se que, a prevenção da contaminação da dieta animal por aflatoxina B<sub>1</sub> ainda é de extrema importância, já que, os métodos de descontaminação do alimento ainda são inviáveis de serem aplicados em larga escala. Desta forma, o controle das condições ideais ao desenvolvimento do fungo, como àquelas relacionadas à estocagem do alimento são decisivas à formação da micotoxina e conseqüentemente à sua veiculação ao queijo.

## 4 APÊNDICES

### APÊNDICE A – Síntese dos resultados das análises químicas, microbiológicas e pesquisa de aflatoxina M<sub>1</sub>.

Amostra	Umidade (g/100g)	Atividade de água	pH	Acidez (g ácido láctico.100g <sup>-1</sup> )	Ácido sórbico (mg.Kg <sup>-1</sup> )	Nível de Aflatoxina M <sub>1</sub>	Microbiologia
A1	16,68 ± 0,24	0,721 ± 0,001	4,84 ± 0,01	1,05 ± 0,03	504 ± 30	0,42 ± 0,02	Dentro dos limites
A2	16,71 ± 0,07	0,721 ± 0,004	4,76 ± 0,02	1,08 ± 0,03	438 ± 08	0,52 ± 0,05	Dentro dos limites
A3	18,47 ± 0,37	0,724 ± 0,004	4,92 ± 0,02	0,89 ± 0,02	514 ± 34	ND	Dentro dos limites
B1	16,83 ± 0,12	0,788 ± 0,003	5,12 ± 0,02	0,63 ± 0,01	<b>1078 ± 37</b>	0,16 ± 0,01	Dentro dos limites
B2	18,36 ± 0,18	0,793 ± 0,003	4,89 ± 0,01	0,50 ± 0,01	959 ± 42	0,14 ± 0,01	Dentro dos limites
B3	17,19 ± 0,24	0,805 ± 0,004	5,26 ± 0,10	0,61 ± 0,01	831 ± 47	0,10 ± 0,01	Dentro dos limites
C1	17,39 ± 0,48	0,783 ± 0,006	5,17 ± 0,01	0,66 ± 0,02	< LQ	ND	<b>Contam. Fungos</b>
C2	19,53 ± 0,33	0,781 ± 0,009	5,10 ± 0,01	0,63 ± 0,01	< LQ	ND	Dentro dos limites
C3	<b>22,55 ± 0,25</b>	0,829 ± 0,005	4,61 ± 0,01	0,91 ± 0,01	< LQ	ND	Dentro dos limites
D1	17,94 ± 0,27	0,705 ± 0,004	4,85 ± 0,01	1,32 ± 0,03	817 ± 47	0,06 ± 0,01	Dentro dos limites
D2	19,10 ± 0,05	0,715 ± 0,002	4,81 ± 0,02	1,97 ± 0,07	775 ± 46	0,69 ± 0,01	Dentro dos limites
D3	19,37 ± 0,46	0,714 ± 0,001	4,85 ± 0,01	1,79 ± 0,08	811 ± 29	0,09 ± 0,01	Dentro dos limites
E1	16,80 ± 0,25	0,789 ± 0,002	4,61 ± 0,10	0,63 ± 0,01	<b>1066 ± 25</b>	0,05 ± 0,01	<b>Contam. Fungos</b>
E2	15,04 ± 0,14	0,752 ± 0,003	5,03 ± 0,06	0,65 ± 0,02	<b>1073 ± 49</b>	0,07 ± 0,01	Dentro dos limites
E3	17,10 ± 0,10	0,763 ± 0,003	4,65 ± 0,01	0,51 ± 0,01	874 ± 48	0,61 ± 0,03	Dentro dos limites
F1	18,70 ± 0,28	0,712 ± 0,001	4,67 ± 0,02	1,82 ± 0,02	<b>1127 ± 106</b>	0,27 ± 0,01	Dentro dos limites
F2	16,91 ± 0,16	0,708 ± 0,002	4,66 ± 0,00	2,00 ± 0,05	835 ± 9	0,06 ± 0,01	Dentro dos limites
F3	16,01 ± 0,34	0,716 ± 0,001	4,75 ± 0,01	2,00 ± 0,05	<b>1148 ± 90</b>	ND	<b>Contam. Fungos</b>
G1	<b>23,46 ± 0,37</b>	0,775 ± 0,006	5,03 ± 0,01	0,74 ± 0,02	414 ± 37	ND	<b>Contam. Fungos</b>
G2	<b>21,94 ± 0,28</b>	0,760 ± 0,004	4,88 ± 0,03	1,09 ± 0,02	318 ± 0	0,34 ± 0,03	Dentro dos limites
G3	<b>22,84 ± 0,16</b>	0,744 ± 0,003	4,91 ± 0,02	1,63 ± 0,03	366 ± 18	ND	Dentro dos limites
H1	<b>20,27 ± 0,10</b>	0,786 ± 0,001	5,36 ± 0,01	0,74 ± 0,01	<b>1066 ± 61</b>	ND	Dentro dos limites
H2	<b>20,55 ± 0,18</b>	0,812 ± 0,006	5,00 ± 0,02	0,91 ± 0,03	<b>1285 ± 104</b>	ND	Dentro dos limites
H3	19,26 ± 0,38	0,761 ± 0,003	5,12 ± 0,02	0,71 ± 0,02	781 ± 52	ND	Dentro dos limites
I1	18,13 ± 0,20	0,721 ± 0,003	5,01 ± 0,04	0,65 ± 0,01	< LQ	0,23 ± 0,02	Dentro dos limites
I2	14,59 ± 0,10	0,699 ± 0,001	5,19 ± 0,01	0,82 ± 0,01	< LQ	0,49 ± 0,05	Dentro dos limites
I3	15,28 ± 0,02	0,713 ± 0,002	5,02 ± 0,01	0,66 ± 0,03	< LQ	0,41 ± 0,02	<b>Contam. Fungos</b>
J1	17,42 ± 0,39	0,720 ± 0,003	4,34 ± 0,01	1,68 ± 0,03	<b>1010 ± 03</b>	0,08 ± 0,01	Dentro dos limites
J2	16,73 ± 0,34	0,705 ± 0,001	4,77 ± 0,01	1,93 ± 0,05	<b>1031 ± 27</b>	ND	Dentro dos limites
J3	16,32 ± 0,10	0,703 ± 0,003	4,76 ± 0,01	1,89 ± 0,05	<b>1057 ± 45</b>	ND	Dentro dos limites

\* Resultados expressos pela média ± Desvio Padrão