



ABIAH NARUMI IDO DE ABREU

**CONTAGEM MICROBIANA E INCIDÊNCIA DE
AFLATOXINA M1 EM QUEIJO RALADO E
REQUEIJÃO, COMERCIALIZADOS EM
DIFERENTES CIDADES DO ESTADO DE
MINAS GERAIS**

LAVRAS – MG

2011

ABIAH NARUMI IDO DE ABREU

**CONTAGEM MICROBIANA E INCIDÊNCIA DE AFLATOXINA M1
EM QUEIJO RALADO E REQUEIJÃO, COMERCIALIZADOS EM
DIFERENTES CIDADES DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Luís Roberto Batista

Coorientadores

Dr. Luiz Ronaldo de Abreu

Dr. Guilherme Prado

LAVRAS - MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Abreu, Abiah Narumi Ido de.

Contagem microbiana e incidência de aflatoxina M1 em queijo ralado e requeijão, comercializados em diferentes cidades do Estado de Minas Gerais / Abiah Narumi Ido de Abreu. – Lavras : UFLA, 2011.

68 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Luís Roberto Batista.

Bibliografia.

1. Qualidade microbiológica. 2. Micotoxinas. 3. Segurança alimentar. 4. Microrganismos patogênicos. 5. Contaminação microbiológica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 637.3

ABIAH NARUMI IDO DE ABREU

**CONTAGEM MICROBIANA E INCIDÊNCIA DE AFLATOXINA M1
EM QUEIJO RALADO E REQUEIJÃO, COMERCIALIZADOS EM
DIFERENTES CIDADES DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 24 de fevereiro de 2011.

Dr. Roberto Maciel de Oliveira

UFLA

Dra. Ivana Aparecida da Silveira

UNILAVRAS

Dr. Luís Roberto Batista

Orientador

LAVRAS - MG

2011

Aos meus pais, a minha avó, aos meus irmãos e ao André,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades, luz e proteção.

Aos meus pais, Aloiso e Inez, pela minha formação e por todos os exemplos de dedicação e sabedoria. Em especial a minha mãe, pois sem ela nada disso seria possível e nem sequer imaginável. Seu apoio incondicional me trouxe até aqui. Que sua garra, honestidade e força sejam meus guias.

Aos meus queridos e amados irmãos, Edilaine, Sarah, Janaína, Davi e Caleb, que sempre me apoiaram e me deram forças pra trilhar este caminho!

A minha amada “Obatian”, que amo imensamente, por todo seu amor e carinho.

Ao André, por todo seu amor, pela sua amizade, carinho, dedicação, companheirismo, e especialmente pela sua paciência.

As minhas queridas amigas Patrícia Corsetti e Rhonara Franklin, que sempre acreditaram e, mesmo longe, estão sempre presentes!

Aos grandes amigos Daniela Braga, Nayane Dias, Priscila Cotta, Cristiane Lopes e Paulo Siriano, pois sem eles essa jornada certamente seria mais difícil e menos alegre.

Aos queridos amigos e mestres Fernando Teixeira Gomes, José Alberto Bastos Portugal e Rafael Gioia Martins Neto (*in memoriam*), por terem me mostrado este caminho, me guiado nos primeiros passos e por sempre me apoiarem.

Ao professor Dr. Luis Roberto Batista, pela oportunidade, orientação, paciência e dedicação.

Ao professor Luiz Ronaldo de Abreu, pelo apoio e orientações preciosas.

Ao pesquisador Dr. Guilherme Prado e a todos que me ajudaram na FUNED, por todo o apoio e conhecimento dividido.

A Lucilene, melhor secretaria que poderíamos ter, pelo carinho, atenção e por toda a ajuda e apoio que nos dá.

A todos os professores do DCA que auxiliaram neste trabalho e acrescentaram mais conhecimento nessa longa jornada.

Às queridas amigas e companheiras do laboratório de Micotoxinas e Micologia do DCA, Daiani, Fabiana Passamani, Michelle, Fabiana Couto, Josiane, Mônica, Gislaine, Erika, Luíza, Rafaela, Thamara, Thayana, Thais e Priscila, por todo carinho, por todos os excelentes momentos vividos e por todas as ajudas técnicas e psicológicas.

Aos grandes companheiros de Lavras, Amanda, Fernanda, Natalia, Lucas, Michel e Fausto, que dividiram comigo muitas alegrias.

À UFLA, em especial, ao Departamento de Ciência dos Alimentos por me permitirem realizar este trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro, por meio da concessão da bolsa de estudos e financiamento do projeto.

E a todos que participaram desta conquista, mas que, por falta de espaço, não puderam ser citados.

Muito obrigada!

RESUMO

O queijo ralado e o requeijão são produtos lácteos bastante consumidos pela população brasileira. Por isso, a qualidade microbiológica e toxicológica destes produtos é de grande importância. De maneira geral, na produção e no processamento destes produtos lácteos podem ocorrer contaminações provenientes da matéria-prima, de contaminações cruzadas, de falhas da higienização de equipamentos e manipuladores, do ambiente de produção e por falhas no armazenamento. Os contaminantes mais frequentes são as enterobactérias, os *Staphylococcus* e os fungos filamentosos, que podem colocar em risco a segurança dos produtos. Também pode haver a presença da aflatoxina M₁, que é proveniente da metabolização da aflatoxina B₁. Neste trabalho foram avaliadas 22 amostras de queijo ralado e 13 de requeijão. As análises microbiológicas foram feitas em triplicatas e por diluição seriada. Para a contagem de *Staphylococcus* spp. foi utilizado meio Baird-Parker (BP), *violet red bile agar glucose* (VRBG) para enterobactérias, e Dichloran Glicerol-18 (DG-18) em queijo ralado e *dichloran rose bengal chloramphenicol* (DRBC) em requeijão, para fungos filamentosos. A quantificação da AFM₁ foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). No queijo ralado, 32% das amostras apresentaram contaminação por *Staphylococcus* spp., 36% para Enterobactérias e 77% para fungos filamentosos; no requeijão, apenas uma das amostras foi contaminada com enterobactérias e uma com *Staphylococcus* spp., apresentando ausência de fungos filamentosos. Aflatoxina M₁ não foi detectada em nenhuma amostra de requeijão, porém, o queijo ralado apresentou contaminação em 16 amostras, em concentrações que variaram de não detectável a 244,6 ng kg⁻¹. Estes resultados indicam que as amostras de queijo ralado, principalmente em relação à presença de fungos filamentosos e AFM₁, podem representar risco à saúde do consumidor. Porém, o requeijão demonstrou um bom padrão de qualidade, em todos os itens avaliados.

Palavras-chave: Queijo Ralado. Requeijão. Aflatoxina M₁. Qualidade Microbiológica.

ABSTRACT

The grated and creamy cheese are dairy products widely consumed by Brazilian population. Therefore, the toxicological and microbiological quality of these products is of great importance. In general, the production and processing of dairy products contamination may occur by raw material, by cross contamination, failure on the sanitation of equipment and manipulators, through production environment and by failures in storage. The most frequent contaminants are Enterobacteriaceae, Staphylococcus and fungi. There still may be the presence of Aflatoxin M1, which is derived from the metabolism of Aflatoxin B1. In this study 22 samples of grated cheese and 13 samples of creamy cheese had been evaluated. The grated cheese has been contaminated by Staphylococcus in 7 samples, reaching 10^5 UFC g⁻¹, and the creamy cheese contamination was detected in only one sample. To Enterobacteria analysis on grated cheese showed counts ranging from < 5 to 10^4 UFC g⁻¹, and creamy cheese showed only one contaminated sample with 10^5 UFC g⁻¹. As for the filamentend fungus, grated cheese had counts up to 10^4 UFC g⁻¹, and was absent in samples of creamy cheese. Aflatoxin M1 was not detected in any sample of creamy cheese, but grated cheese showed concentrations ranging from undetectable to 244,6 ng Kg⁻¹.

Keywords: Grated Cheese. Cheese. Aflatoxin M1. Microbiological Quality.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Contaminação de queijo ralado e requeijão, por microrganismos patogênicos, deterioradores e aflatoxina M₁	10
1	INTRODUÇÃO GERAL	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Contaminação microbiológica de produtos lácteos	12
2.1.2	Microrganismos indicadores.....	14
2.1.2.1	Enterobactérias	15
2.1.3	<i>Staphylococcus</i> spp.....	16
2.1.4	Fungos filamentosos.....	18
2.2	Fungos produtores de micotoxinas.....	19
2.3	Micotoxinas	20
2.4	Aflatoxinas.....	23
2.5	Aflatoxina M₁ em leite e produtos lácteos.....	28
2.6	Queijo ralado.....	34
2.7	Requeijão.....	35
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	37
	REFERÊNCIAS.....	38
	CAPÍTULO 2 Contagem microbiana e incidência de aflatoxina m₁ em queijo ralado e requeijão comercializados em diferentes cidades do estado de Minas Gerais.....	47
1	INTRODUÇÃO.....	49
4	MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1	Amostras.....	52
4.2	Determinação de aflatoxina M₁	52
4.2.1	Preparo da curva de calibração.....	53
4.2.2	Extração da aflatoxina M₁.....	53
4.2.3	Purificação da amostra em coluna de imunoafinidade	54
4.2.4	Quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	54
4.3	Análises microbiológicas	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
6	CONCLUSÕES.....	64
	REFERÊNCIAS.....	65

CAPÍTULO 1

Contaminação de queijo ralado e requeijão, por microrganismos patogênicos, deterioradores e aflatoxina M₁

1 INTRODUÇÃO GERAL

A qualidade e a segurança dos alimentos constituem preocupações do consumidor atual. O consumo de alimentos contaminados causadores de diversas patologias ao ser humano é, hoje, um dos principais problemas de saúde pública. Os consumidores esperam que os alimentos sejam apetecíveis, nutritivos e, ao mesmo tempo, seguros. Este último aspecto significa que os alimentos consumidos não podem colocar em risco a saúde e o bem-estar do consumidor.

A contaminação microbiológica na indústria de alimentos representa um sério perigo para a saúde do consumidor e acarreta grandes prejuízos econômicos. Os laticínios, devido à própria matéria-prima que utilizam e ao alto teor de umidade nos locais de produção, são particularmente suscetíveis a essa contaminação. Alguns microrganismos, como os da família Enterobacteriaceae, do gênero *Staphylococcus*, e alguns fungos filamentosos são de presença constante nestes produtos e podem transmitir doenças aos consumidores ou reduzir o seu tempo de prateleira. Além de microrganismos, os produtos lácteos também podem apresentar contaminações com micotoxinas, que são metabólitos secundários produzidas por fungos filamentosos, que são tóxicos ao homem e aos animais. A proveniência das micotoxinas associa-se, principalmente, à sua existência nos grãos e cereais (provenientes da contaminação por fungos) que estão na base da alimentação do animal, passando, posteriormente, para o leite, na forma de aflatoxina M₁.

As contaminações por microrganismos patogênicos ou deterioradores estão relacionadas às falhas na produção, na manipulação e no processamento, além da má higienização de equipamentos. A prevenção dessas contaminações pode ser feita buscando uma menor contaminação inicial do leite, realizando a implementação de boas práticas de fabricação ou, quando esse sistema já estiver implementado, realizando novos cursos para a capacitação dos profissionais. A prevenção da aflatoxina M₁ associa-se, principalmente, a uma seleção cuidadosa da alimentação dos animais e a um bom acondicionamento e armazenamento dos mesmos.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de descrever os principais contaminantes presentes no queijo ralado e no requeijão, avaliando a presença de *Staphylococcus* spp., enterobactérias e fungos filamentosos, e a contaminação por aflatoxina M₁.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Contaminação microbiológica de produtos lácteos

O interesse pela qualidade dos alimentos tem aumentado consideravelmente, sobretudo no que diz respeito aos perigos associados a contaminantes e metabólitos. A qualidade microbiológica do queijo é de primordial importância, por estar relacionado à saúde pública (FERNANDES; ANDREATTA; OLIVEIRA, 2006).

Considerando que o leite é a principal matéria-prima do queijo, aumenta a preocupação com o produto. O leite é considerado o alimento mais complexo para o consumo humano, pois tem alto valor biológico, uma vez que são compostos de carboidratos, proteínas, vitaminas e sais minerais. É largamente utilizado para o preparo de derivados, os quais mantêm em sua composição praticamente todos os componentes nutritivos do leite. Para o preparo desses derivados, a matéria-prima deve ser obtida em condições higiênico-sanitárias ideais e ser resfriado logo após a sua obtenção, pois os elementos contidos no leite formam um excelente substrato para o crescimento de microrganismos, afetando a qualidade do produto final (ALBUQUERQUE; RODRIGUES, 2008).

Segundo Araújo et al. (2001), o queijo é uma das formas mais antigas de conservação do leite, tendo surgido praticamente com a domesticação de animais leiteiros. É um produto apreciado tanto pelo valor nutritivo como pelo sabor que atende aos paladares mais exigentes. Tem ampla aceitação comercial e faz parte do hábito alimentar da população, na maioria das regiões do país (LEITE; LIMA; REIS, 2005).

A qualidade dos produtos lácteos incentiva a aceitação e a demanda pelos consumidores. Apesar das exigências de que o leite destinado à fabricação de queijos seja higienizado por meios mecânicos adequados e submetidos à

pasteurização ou tratamento térmico equivalente, é intensa a comercialização dos queijos fora dessas especificações. Além disso, a contaminação pós-pasteurização, a utilização de temperaturas inadequadas e incorretas condições de manufatura e armazenagem contribuem, também de forma efetiva, para a má qualidade do produto final (ALBUQUERQUE; RODRIGUES, 2008).

No estudo da microbiologia do leite e derivados, um aspecto é fundamental: impedir a veiculação de patógenos por meio do leite e derivados lácteos, numa ação de saúde pública. A contaminação microbiana desses produtos assume destacada relevância, tanto para a indústria, devido às perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos (FEITOSA et al., 2003), além de comprometer suas características sensoriais, bem como torná-lo impróprio para o consumo, em virtude da contaminação por microrganismos (ARAÚJO et al., 2001).

O queijo apresenta vários pontos críticos durante a fabricação, com vários processos envolvidos, como pasteurização do leite, coagulação, corte do coágulo, dessoragem, enformagem, salga, maturação (quando necessário) e embalagem, que podem conduzir a alterações e até a recontaminação no produto final (BALBANI; BUTUGAN, 2001; ROSA; PORTO; SPOTO, 2005).

Dentre os microrganismos constantemente presentes em produtos lácteos que oferecem risco à saúde dos consumidores destacam-se as enterobactérias, que incluem os gêneros *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* e *Yersinia*, entre outros, e o *Staphylococcus* spp. Já os fungos filamentosos são os principais deterioradores desses produtos. A presença desses microrganismos pode indicar riscos de infecções e/ou intoxicações alimentares, baixas condições higiênicas de produção ou processamento inadequado e matéria-prima de baixa qualidade. Esses microrganismos podem ser provenientes da matéria prima, do ar, do solo, do processamento do produto, das instalações, dos equipamentos e/ou dos manipuladores (FERNANDES; ANDREATTA; OLIVEIRA, 2006).

2.1.2 Microrganismos indicadores

Os microrganismos indicadores são utilizados para avaliar a qualidade microbiológica dos alimentos e também apontam riscos de contaminações de origem fecal, provável presença de patógenos ou deterioração potencial do alimento e indicações relevantes sobre as condições higiênico-sanitárias no processamento, na produção e no armazenamento (CARDOSO; ARAÚJO, 2004).

Um indicador de segurança deve apresentar certas características importantes, tais como: ser fácil e rapidamente detectável; ser facilmente distinguível de outros membros da microbiota do alimento; ter um histórico de frequente associação com o patógeno cuja presença deve indicar; estar presente quando o patógeno de interesse estiver; ser um microrganismo cujos números idealmente estejam correlacionados com as contagens do patógeno de interesse; possuir necessidades e taxa de crescimento equivalentes às do patógeno; ter uma taxa de morte ao menos paralela à do patógeno e, de preferência, sobreviver um pouco mais do que ele e estar ausente em alimentos que estão livres de patógenos, com exceção, talvez de números mínimos. Esses critérios aplicam-se a muitos, senão a todos, alimentos que podem ser veículos de patógenos de origem alimentar, indiferentemente da origem do alimento (FORSYTHE, 2002; JAY, 2005).

Indicadores sanitários foram historicamente utilizados para detectar contaminação fecal de origem direta ou indireta. O primeiro indicador fecal foi *Escherichia coli*. Quando o conceito de indicadores fecais foi aplicado aos alimentos, alguns critérios adicionais foram salientados. De forma ideal, a bactéria selecionada deve demonstrar especificidade, ocorrendo apenas em ambientes intestinais; os microrganismos indicadores devem ocorrer em altas concentrações nas fezes e devem ser encontrados em altas diluições; eles devem

apresentar alta resistência aos ambientes extraentéricos, assim como a poluição, em que estão sendo analisados e devem permitir uma detecção relativamente fácil e rápida, mesmo quando presentes em quantidades muito baixas. Os microrganismos indicadores usualmente utilizados são: coliformes, *E. coli*, enterobactérias e estreptococos fecais (FORSYTHE, 2002; JAY, 2005). Os coliformes termotolerantes, também chamados de coliformes a 45°C ou coliformes de origem fecal, são bacilos gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não esporogênicos, oxidase-negativos, que fermentam lactose com produção de gás a 44,5°-45,5°C, em 24 a 48 horas (CONTE et al., 2004).

Dentre os microrganismos indicadores mais relevantes estão os que pertencem à família Enterobacteriaceae, que têm importância não somente por indicar contaminação fecal, mas também por estarem geralmente implicados em processos infecciosos, demonstrando, ainda, um grau considerável de deficiência higiênico-sanitária na elaboração do produto (HOFFMANN et al., 2004).

2.1.2.1 Enterobactérias

As enterobactérias estão comumente presentes no intestino animal e humano, podendo existir também no solo e na água e muitas espécies podem causar doenças. Os principais gêneros da família das Enterobacteriaceae são: *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Morganella*, *Yersinia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Serratia* (YAZICI et al., 2004). Esses microrganismos são caracterizados por serem bastonetes, gram-negativos, fermentadores de glicose com produção de ácido e gás, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não esporulados, e por reduzirem nitrato a nitrito e serem oxidase negativos (FRANCO; LANDGRAF, 2005; PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996).

A contaminação do leite e de produtos lácteos por estes microrganismos causa muitos prejuízos. Pode ocorrer a deterioração por acidificação, gerando

perdas nas plataformas de recepção do leite nas indústrias (leite ácido) e pode ocorrer a contaminação do leite já pasteurizado e, conseqüentemente, haverá a contaminação dos seus derivados; em queijos, essas contaminações podem causar o estufamento e a formação do queijo “rendado” e/ou quebradiço (FURTADO, 1999). A presença de enterobactérias no leite comprova contaminação externa, pois estes microrganismos não fazem parte da microbiota do leite. Com isso, sua contagem pode servir para avaliar o grau higiênico-sanitário do leite ou de seus derivados (TRONCO, 1997).

2.1.3 *Staphylococcus spp.*

Os estafilococos foram observados, inicialmente, por Kock, em 1878, a partir de material purulento e, em 1881, houve a primeira publicação citando a forma de cocos e a presença constante desses microrganismos em abscessos agudos e crônicos. A relação desses microrganismos com surtos de intoxicação alimentar só ocorreu em 1884, quando se associou ao consumo de queijo tipo cheddar contaminado com estafilococos (PEREIRA; CARMO; PEREIRA, 2001).

Os estafilococos são microrganismos mesófilos com temperatura de crescimento entre 7° e 47,8°C e podem produzir enterotoxinas termorresistentes a temperaturas entre 10° e 46°C, com temperatura ótima entre 40° e 45°C. O pH ideal para o seu desenvolvimento varia entre 7 a 7,5, mas é possível a multiplicação em alimentos com pH variando entre 4,2 e 9,3. Este grupo de microrganismos ainda tem a capacidade de sobreviver e se multiplicar em uma concentração de cloreto de sódio de até 15% e a produção de enterotoxina acontece em concentrações de sal de até 10%, o que faz com que os alimentos curados também sejam veículos potenciais de intoxicação. Quanto à atividade de água (aw), os estafilococos são únicos em sua capacidade de se multiplicarem

em alimentos com valores de atividade de água inferiores ao normalmente considerados mínimos para outras bactérias halófilas. O valor mínimo de a_w é 0,86, apesar de já ter sido relatada a multiplicação desses microrganismos em alimentos com a_w de 0,83 (FRANCO; LANDGRAF, 2005; JAY, 2005). Por sua capacidade de crescer em altas concentrações de sal e baixa atividade de água, o *Staphylococcus* tem grandes chances de se multiplicar em um queijo com características como as do queijo ralado, com baixa atividade de água e alta concentração de cloretos.

A contaminação dos alimentos por *Staphylococcus* enterotoxigênicos coagulase positiva e negativa representa problema de saúde pública, devido ao risco de causar intoxicação alimentar. A intoxicação estafilocócica constitui a causa mais frequente de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em muitos países e ocorre após a ingestão de alimentos contendo enterotoxinas. Os sintomas dessa enfermidade incluem náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia. Dor de cabeça e queda da pressão arterial também podem ocorrer.

Algumas cepas de espécies desse gênero, quando presentes em populações elevadas ($>10^5$ UFC/mL ou g) e sob condições adequadas (temperatura, pH, atividade de água e O_2), produzem uma ou mais enterotoxinas estafilocócicas nos alimentos (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000). Entre os alimentos envolvidos em surtos e casos de intoxicação e infecção estafilocócica destacam-se o leite cru, o leite pasteurizado e os queijos, como os produtos lácteos mais incriminados, sendo *S. aureus* o microrganismo mais frequente nas investigações epidemiológicas (IKEDA et al., 2005).

Em todo o mundo, muitos estudos referentes à contaminação de produtos lácteos por *Staphylococcus* spp. e suas toxinas são realizados. No Brasil, no trabalho realizado por Komatsu et al. (2010), foram avaliadas 50 amostras de queijo minas frescal comercializado em Uberlândia, MG e os resultados obtidos demonstraram que 88% das amostras avaliadas estavam fora

do padrão estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2001). Pietrowski et al. (2008) avaliaram 16 amostras de queijo tipo mussarela do mercado de Ponta Grossa e encontraram três amostras fora dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira. Já Borges et al. (2008), avaliando o perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorando as condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho, encontraram uma população de *Staphylococcus* spp. que variou de $<1\text{UFC mL}^{-1}$ no leite pasteurizado a $1,5 \times 10^7\text{ mL}^{-1}$ no leite cru e, para o produto final, a variação foi de $<10^{-1}\text{ UFC mL}^{-1}$ a $2,6 \times 10^3\text{ UFC mL}^{-1}$.

O grupo de bactérias estafilococos encontra-se largamente distribuído no meio ambiente e tem como principal hábitat a pele, as glândulas e as membranas mucosas e o trato intestinal do homem e dos animais. A presença de *Staphylococcus* spp. em alimentos sugere uma provável participação de manipuladores portadores desse microrganismo (BALABAN; RASOOLY, 2000). A contaminação dos alimentos pode sugerir condições de manipulação inadequadas e deficientes de limpeza e desinfecção (BORGES et al., 2008).

2.1.4 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos são importantes indicadores de eficiência de práticas de sanitização de equipamentos e utensílios durante a produção e o beneficiamento de alimentos. Além disso, os fungos podem, ainda, representar perigo para a saúde humana, já que têm capacidade de produzir micotoxinas, que são metabólitos tóxicos que podem causar reações alérgicas, infecções e pelo fato de alguns serem carcinogênicos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Os fungos desempenham um importante papel na indústria de produtos lácteos, pois eles podem promover deterioração ou, então, desencadear fermentação e/ou maturação desejáveis aos derivados do leite. Por outro lado,

pouco se conhece sobre a importância, do ponto de vista de saúde pública, da presença destes microrganismos em produtos lácteos. Diversos fungos podem estar associados a doenças infecciosas no ser humano e animais, enquanto outros podem produzir metabólitos tóxicos (micotoxinas) quando estão se multiplicando nos alimentos e, quando ingeridos, podem acarretar diferentes afecções (MINERVINI et al., 2001).

Os fungos deterioradores, geralmente, não são patogênicos, mas podem atuar como patógenos oportunistas. Quando o paciente apresenta algum tipo de debilitação, esses microrganismos podem se multiplicar e causar doenças. Os principais gêneros de fungos filamentosos envolvidos na deterioração de queijos pertencem aos gêneros *Mucor* spp., *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Geotrichum* spp., *Aspergillus* spp. e *Moniliella* sp. (FLEET, 1992; ROHM; ELISKASES-LECHNER; BRÄUER, 1992; TORKAR; VENGUST, 2008). Em um trabalho realizado por Pimentel et al. (2002), em uma das 16 amostras de queijo ralado analisadas foram encontrados 10^5 UFCg⁻¹, sendo, possivelmente, justificada pela alta umidade do produto (acima de 20%). No trabalho de Torkar e Vengust (2008), foram analisadas 60 amostras de leite cru e 40 de diferentes tipos de queijo. Em 63,3% das amostras de leite foram encontrados fungos filamentosos em concentração média de $0,7 \log_{10}$ UFCg⁻¹ e, nos queijos, a concentração encontrada variou de <1 a $5,9 \log_{10}$ UFC g⁻¹, em 60% das amostras. A presença de fungos filamentosos indica que o produto pode estar em fase de deterioração, mesmo que esta possa não ser visível, reduzindo seu tempo de prateleira.

2.2 Fungos produtores de micotoxinas

O desenvolvimento de fungos em alimentos não implica necessariamente na presença de micotoxinas, mesmo tratando-se de um gênero

potencialmente toxigênico. Porém, há um risco implícito e que deve ser afastado. Também é importante esclarecer que a ausência de sinais aparentes de contaminação por fungos não significa que o alimento encontra-se livre de toxinas, já que elas podem permanecer no produto, mesmo depois do desaparecimento dos fungos responsáveis por sua produção.

Muitos dos fungos toxigênicos são onipresentes e, em alguns casos, aparentemente, têm uma forte ligação ecológica com fontes de alimentação humana. A microbiota natural de fungos existentes em conjunto com a produção de alimentos é formada, principalmente, por três gêneros: *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. As espécies do gênero *Fusarium* são fitopatógenos de culturas de cereais e produzem micotoxinas antes ou imediatamente após a colheita, e certas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* também são patógenos de plantas ou comensais, mas esses gêneros estão mais comumente associados ao processo de secagem e armazenamento (PITT, 2000).

2.3 Micotoxinas

A contaminação de alimentos por micotoxinas representa perdas econômicas bastante significativas, além de representar riscos à saúde humana e animal (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

As micotoxinas compreendem um conjunto complexo de substâncias tóxicas produzidas por fungos, diferenciando-se das toxinas bacterianas por não terem natureza proteica nem serem imunogênicas. Os problemas provocados pelas micotoxinas são muito antigos. São metabólitos secundários de algumas espécies de fungos, capazes de produzir efeitos tóxicos em animais e no homem, dependendo dos níveis de consumo (BULLERMAN; SCHOEREDER; PARK, 1984).

O termo micotoxina é resultante das palavras grega “mykes”, que significa fungo e “toxicum”, que significa veneno ou toxina. A ingestão de micotoxinas pode levar os animais e o homem a quadros de intoxicação aguda ou crônica. A condição patológica resultante desta ingestão é chamada micotoxicose; ela pode ocorrer tanto em países industrializados como em países em desenvolvimento e elevar-se quando combinadas a condições ambientais, sociais, econômicas ou meteorológicas (umidade, temperatura), as quais favoreçam o crescimento dos fungos (AYCICEK; AKSOY; SAYGI, 2005). O efeito de uma micotoxina depende da dose e da frequência com que é ingerida e pode ser agudo (letal ou não) ou subagudo. O efeito agudo é de manifestação e percepção rápidas, podendo levar à morte porque causa alterações irreversíveis e é resultante da ingestão de doses geralmente elevadas. O efeito subagudo é o resultado de doses menores e frequentes, que provocam distúrbios e alterações nos órgãos dos humanos e dos animais (BENNETT; KLICH, 2003; MURPHY et al., 2006; SHEPHARD, 2008).

A produção de micotoxinas em grãos depende de inúmeros fatores físicos, como temperatura, luminosidade, aeração, danos mecânicos, longo período de armazenagem, presença de regiões com temperatura elevada na massa de grãos causada pelo desenvolvimento de microrganismos e insetos, além de fatores químicos, como composição do substrato, pH, teor de oxigênio e gás carbônico do ambiente, atividade de água, presença de fungistáticos e fatores biológicos, como, por exemplo, a linhagem fúngica toxigênica e a quantidade de esporos viáveis, a competição e a degradação microbianas e a presença de insetos.

Outros fatores podem influenciar a produção de micotoxinas, tais como a resistência genética da variedade plantada e quaisquer fatores estressantes exercidos sobre o alimento (BULLERMAN; SCHOEREDER; PARK, 1984;

SCUSSEL, 1998), sendo temperatura, umidade e tipo de substrato os mais importantes (MALLOZZI; CORRÊA, 1998).

Dentre as principais micotoxinas encontradas em produtos alimentícios e grãos têm-se aflatoxina, ocratoxina A, zearalenona, patulina, fumonisina e desoxinivalenol (DON) (HUSSAIN; BRASSEL, 2001; RODRIGUES-AMAYA; SABINO, 2002). Duas outras micotoxinas M1 e M2 foram detectadas no leite, urina e fezes de mamíferos, resultantes do metabolismo das toxinas B1 e B2, respectivamente (ELZUPIR; ELHUSSEIN, 2010).

Os principais produtos alimentícios susceptíveis ao desenvolvimento desta micotoxina incluem amendoim (cru, torrado, creme, em doce e confeitado), milho (pipoca, canjica e grãos), trigo, arroz, castanha-do-pará, nozes, avelã, castanha de caju, amêndoas, frutas secas, temperos, semente de algodão, mandioca, óleos vegetais e cacau, entre outros que, normalmente, são utilizados na composição de alimentos e rações (KWIATKOWSKI; ALVES, 2007).

Além de diversos efeitos tóxicos agudos, estas toxinas podem acarretar problemas crônicos graves, como imunossupressão e carcinogenicidade. Ainda que o fungo possa ser inativado ou retirado durante o processamento e não estar presente no produto manufaturado, as toxinas podem permanecer viáveis, pois não são facilmente degradáveis (NUNES et al., 2003).

A presença de uma micotoxina e o perigo associado somente podem ser determinados depois da extração e da identificação da mesma por quatro razões: a presença do fungo não garante que existe uma micotoxina, a micotoxina continua no alimento mesmo que o fungo tenha desaparecido, um fungo pode produzir mais de uma micotoxina e uma determinada micotoxina pode ser produzida por mais de uma espécie de fungo (MONTAGNA et al., 2004). Diante disso, as micotoxinas produzidas durante a esporulação dos fungos contaminam os animais que consomem alimentos contaminados e, dessa forma,

são transferidas para os seus produtos, tal como o leite ou a carne, consequentemente, prejudicando a saúde humana.

2.4 Aflatoxinas

As aflatoxinas (AFs) são metabólitos secundários produzidos principalmente por fungos de espécies do género *Aspergillus* pertencentes à Seção *Flavi*: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. As espécies menos comuns, produtoras de aflatoxinas são *A. pseudotamarii*, *A. bombycis* e *A. parvisclerotigenus* (KLICH, 2007). Quatro espécies não pertencentes à seção *Flavi* podem produzir aflatoxinas: *A. ochraceoroseus*, *A. rambellii*, *Emericella venezuelensis* e *E. astellata* (FRISVAD; SKOUBOB; SAMSON, 2005). Cerca de 50% das espécies de *A. flavus* e *A. parasiticus* são produtores de AFs, sendo que de 25% a 50% de *A. flavus* são produtores de aflatoxina B1 e B2, e a maioria dos *A. parasiticus* e *A. nomius* produzem as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.

Somente quatro AFs foram identificadas como contaminantes naturais de produtos agrícolas. São denominadas aflatoxina B1 (AFB₁), B2 (AFB₂), G1 (AFG₁) e G2 (AFG₂). A AFB₁ é a mais tóxica do grupo, seguida por AFG₁, AFB₂ e AFG₂, com toxicidade de 50%, 20% e 10%, em relação à primeira, respectivamente (CREPPY, 2002; DILKIN et al., 2000; UNUSAN, 2006). Sua estrutura química está evidenciada na Figura 1.

A estrutura das aflatoxinas B1 e G1 foi determinada por Asao et al. (1963), enquanto B2 foi determinada por Chang et al. (1963). As aflatoxinas são classificadas quimicamente como bisfuranocumarinas derivadas de um decacetídeo, pela via biossintética dos policetídeos, no qual a unidade C2 é perdida durante a formação dos anéis bisfuranos (SMITH; MOSS, 1985). As aflatoxinas apresentam-se extremamente fluorescentes sob luz ultravioleta de ondas longas, o que permite a sua quantificação em concentrações reduzidas e

fornece a fundamentação para quase todos os métodos de detecção e quantificação. Aflatoxinas M_1 e M_2 são metabólitos hidroxilados das aflatoxinas B_1 e B_2 e podem ser encontrados em produtos lácteos obtidos de animais que ingeriram ração contaminada. As principais fontes de aflatoxinas em rações são amendoim, farinha de milho e farinha do caroço de algodão (CREPPY, 2002; UNUSAN, 2006).

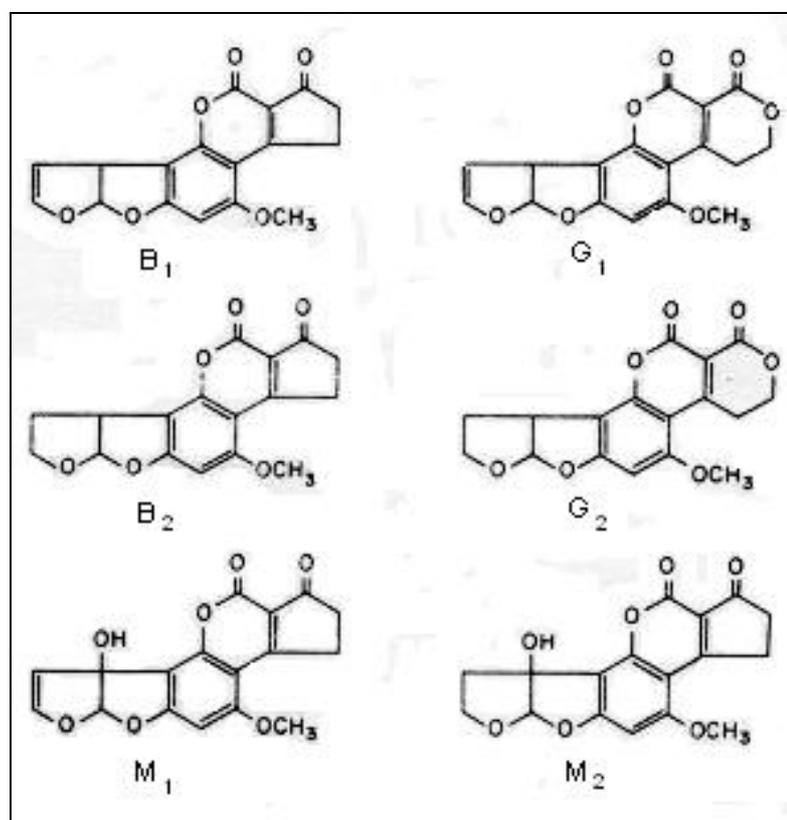


Figura 1 Estrutura química das aflatoxinas

Fonte: Adaptado de Bullerman, Schoereder e Park (1984)

As aflatoxinas receberam essas denominações, B e G, devido às suas características fluorescentes, “blue” (azul) e “green” (verde), quando expostas à luz ultravioleta. A designação M origina-se de “milk toxin”, por ser uma toxina excretada no leite (JAY, 2005).

As aflatoxinas são micotoxinas conhecidas por serem compostos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos (BENNET; KLICH, 2003). A exposição por ingestão de aflatoxinas pode levar ao desenvolvimento de sérias condições clínicas que variam consideravelmente, dependendo da espécie animal, da dose, do estado nutricional, da idade e do gênero (KWIATKOWSKI; ALVES, 2007). Seus efeitos toxicológicos somente ocorrem após a ativação metabólica de suas moléculas pelas enzimas hepáticas.

A aflatoxina B₁ pode ser biotransformada no fígado de animais, incluindo o homem, em vários outros metabólitos tóxicos, como aflatoxina M₁ (HUSSEIN; BRASEL, 2001). A ingestão de alimentos com baixos teores desta micotoxina com uma dada frequência e por tempo prolongado pode levar ao aparecimento de carcinoma hepático (MIDIO; MARTINS, 2000). A intoxicação é chamada de aflatoxicose, que é uma falha do fígado devido à destruição das células parenquimatosas, o que pode ser acompanhado de hemorragias e alterações das funções nervosas em combinação com espasmos. Animais jovens apresentam redução de consumo de ração, redução de crescimento bem como perda de peso. Em humanos, o processo de intoxicação pode dar-se de forma gradual e, dessa forma, os efeitos podem levar anos para se manifestar (TORTAJADA et al., 2001).

O fígado é o órgão alvo para esses compostos. Em diversos casos de morte causada pela destruição desse órgão, foram identificadas aflatoxinas no mesmo. Além de induzir o câncer no fígado, as aflatoxinas podem ocasionar outros efeitos, como cirrose hepática e diminuição da resistência imunológica

propiciando surtos de hepatites virais tipo B, estando também associada à Síndrome de Reye, febre, convulsões, vômito e coma (FERREIRA et al., 2006).

É evidente que as aflatoxinas representam um sério risco para a saúde humana e é praticamente impossível obter certos alimentos isentos dessa contaminação. Devido a esse fato, a grande maioria dos países, inclusive o Brasil, tem se preocupado em estabelecer os limites para a presença destas substâncias nos alimentos (MIDIO; MARTINS, 2000). No Brasil, os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos são determinados pela RDC nº 7, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de 18 de fevereiro de 2011, e estão demonstrados na Tabela 1 (BRASIL, 2011).

Tabela 1 Limites máximos tolerados (LMT) para aflatoxinas, no Brasil (BRASIL, 2011)

Micotoxina	Alimento	LMT (ng/kg)
Aflatoxina M ₁	Leite fluido	50
	Leite em pó	500
	Queijos	250
Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada	500
	Feijão	500
	Castanhas, exceto castanha-do-brasil, incluindo nozes, pistachios, avelãs e amêndoas	1000
	Frutas desidratadas e secas	1000
	Castanha-do-brasil com casca para consumo direto	2000
	Castanha-do-brasil sem casca para consumo direto	1000
	Castanha-do-brasil sem casca para processamento posterior	1500
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	100
	Fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância	100
	Amêndoas de cacau	1000
	Produtos de cacau e chocolate	500
	Especiarias: Capsicum spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão-doce); Piper spp. (o fruto, incluindo a pimenta-branca e a pimenta-preta) <i>Myristica fragrans</i> (noz-moscada) <i>Zingiber officinale</i> (gingibre) e <i>Curcuma longa</i> (cúrcuma). Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas	2000
	Amendoim (com casca) (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim	2000
	Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho	2000

Em estado puro, as aflatoxinas são extremamente estáveis em altas temperaturas, superando até 200°C e não são afetadas pelo frio. São relativamente instáveis, quando expostas à luz e particularmente à radiação ultravioleta (UV). São solúveis em solventes como clorofórmio, benzeno, metanol e etanol, mas insolúveis em gorduras e óleos. Além disso, são incolores, inodoras e não alteram o sabor dos alimentos. Agentes oxidantes, como água oxigenada e hipoclorito de sódio, reduzem o teor de aflatoxinas no alimento,

mas a utilização de tais soluções é impraticável, uma vez que ocorre, além da destruição de nutrientes, sabor, cor, textura e propriedades funcionais do alimento, a formação de resíduos tóxicos (PÁDUA et al., 2002).

2.5 Aflatoxina M1 em leite e produtos lácteos

A presença de aflatoxinas no leite é de extrema relevância, pelo fato de a lactação e a alimentação serem dois processos concomitantes. Além disso, o leite é alimento básico para crianças e recém-nascidos que, por analogia, devem ser mais susceptíveis que os adultos aos efeitos tóxicos das aflatoxinas (PÁDUA et al., 2002).

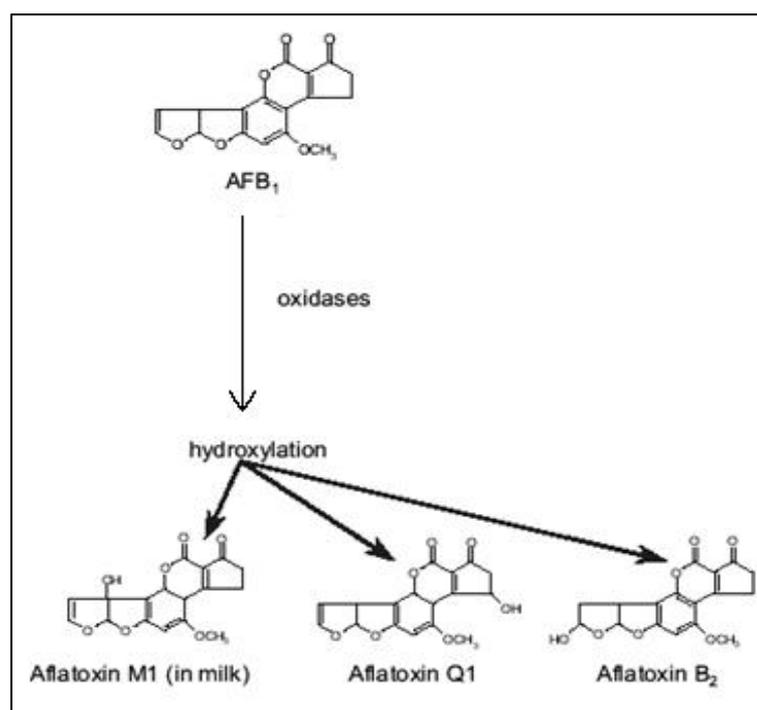


Figura 2 Biotransformação da aflatoxina B₁ em aflatoxina M₁
Fonte: Adaptado de Kensler et al. (2003) e Oliveira e Germano (1997)

As aflatoxinas são absorvidas no trato gastrintestinal e biotransformadas primariamente no fígado por enzimas microsossomais (citocromo P-450) em dois diferentes sentidos. Um é a epoxidação e o outro é a hidroxilação. Estas etapas constituem parte do processo de detoxificação. A hidroxilação, apresentada na Figura 2, é responsável pela formação das aflatoxinas M₁, Q₁ e B₂. Todos estes compostos contêm o grupo hidroxila na molécula, o que permite a conjugação com ácido glicurônico ou sulfatos. Consequentemente, são bastante solúveis em água, possibilitando sua rápida excreção através de urina, bile, leite (no caso de mamíferos) e, em seguida, nas fezes. Este fato sugere que a formação destes derivados pode constituir parte do processo de detoxificação da AFB₁, embora alguns produtos, como a aflatoxina M₁, apresentem, também, toxicidade apreciável (KENSLENER et al., 2003; OLIVEIRA; GERMANO, 1997).

Pesquisas sobre a incidência de aflatoxina M₁ em leite e em produtos lácteos já foram realizadas no Brasil. Prado et al. (2000) verificaram contaminação em 2 das 38 amostras de leite cru do estado de Minas Gerais, não detectando aflatoxina M₁ em 60 amostras de leite em pó analisadas. Prado et al. (2001) avaliaram amostras de queijo tipo prato e parmesão ralado e encontraram AFM₁ em 100% das amostras de queijo tipo prato em concentrações que variaram de 20 a 540 ng kg⁻¹; em 93% das amostras de queijo parmesão ralado foi encontrada concentração que variou de 40 a 300 ng kg⁻¹. Prado et al. (2008) avaliaram, ainda, 88 amostras de queijo parmesão e detectaram AFM₁ em 40 amostras, em concentrações que variaram de 10 a 660 ng kg⁻¹. Sabino, Purchio e Zorzetto (1984) detectaram contaminação em uma das 100 amostras de leite pasteurizado e em nove das 50 amostras de leite cru analisadas no estado de São Paulo.

Entretanto, existe ainda uma lacuna de informações sobre a aflatoxina M₁, tanto em relação à metodologia quanto à sua ocorrência (SYLOS; RODRIGUEZ-AMAYA, 1996). Pereira et al. (2005), analisando a presença de

aflatoxina M₁ em amostras de leite cru provenientes da região de Lavras, em Minas Gerais, verificaram que, em 19 amostras (52,8%), foi detectada a presença da AFM₁, com os valores variando de traços a 74,1 ng/L e em 17 amostras (47,22%) não foi detectada aflatoxina. Na Turquia, Tekinsen e Uçar (2007) avaliaram 100 amostras de *cream cheese*, tendo sido detectada AFM₁ em 99% das amostras, com concentrações variando de não detectável a 4.700 ng kg⁻¹. Fallah et al. (2009) verificaram a presença de AFM₁ em 72,3% das 94 amostras de *cream cheese* avaliadas, apresentando concentrações que variaram de 58 à 785 ng kg⁻¹.

Em trabalho conduzido por El-Nezami et al. (1995) foi verificada a exposição de crianças a AFM₁ e mães lactantes a aflatoxina B₁. Análise de leite de 73 mulheres originárias de Victória (Austrália) e 11 da Tailândia revelaram positividade para AFM₁, em uma concentração média de 71 ng/L e 664 ng/L, respectivamente. No Brasil, no trabalho realizado por Romero et al. (2010), avaliou-se a presença da aflatoxina M₁ na urina de 69 indivíduos da cidade de Piracicaba, SP, relacionando-a aos seus hábitos alimentares. Foram utilizadas colunas de imunoafinidade e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e foi encontrada AFM₁, em níveis detectáveis, em 78% das amostras, em concentrações que variaram de 0,0018ng mL⁻¹ à 0,039ng mL⁻¹. Segundo os autores, estas concentrações são consideradas baixas quando comparadas com trabalhos realizados em outros países da África e da Ásia. Porém, esta avaliação não deixa de trazer preocupações, pois mesmo que as concentrações sejam relativamente baixas, houve grande incidência da presença da aflatoxina M₁.

A estabilidade da aflatoxina no leite e seus derivados, durante processos de tratamento térmico, tem sido pesquisada. Stoloff et al. (1975) estudaram amostras de leite artificialmente contaminadas e submetidas à pasteurização lenta (62°C por 30 minutos), bem como amostras de leite naturalmente contaminadas submetidas à pasteurização rápida (77°C por 16 segundos) e não

observaram redução na concentração de aflatoxina M₁. Entretanto, Purchase et al. (1972) demonstraram que a pasteurização a 62°C, por 30 minutos, causava uma redução de 32% da aflatoxina M₁. A redução foi de 45% e 64%, quando o leite foi submetido a temperaturas de 72°C e 80°C, por 45 segundos, respectivamente. Para Pereira et al. (2005), a redução do nível de aflatoxina M₁ em leite contaminado, submetido a tratamento térmico, foi de cerca de 15,6%.

Estudos sobre a estabilidade da aflatoxina M₁ em leite durante armazenamento sob condições de resfriamento e congelamento apresentam resultados variáveis. A redução na concentração ocorreu rapidamente em amostras de leite cru naturalmente contaminadas e armazenadas a 0°C, por 4 e 6 dias, com perdas de 40% e 80%, respectivamente (MCKINNEY et al., 1973). Já o efeito do congelamento, em amostras naturalmente contaminadas com aflatoxina M₁ e armazenadas a -18°C, apresentou baixa degradação e esta ocorreu lentamente. Os resultados demonstraram que, aos 53 dias, não houve redução, sendo verificada pequena variação aos 68 dias. Aos 120 dias, houve perda de 45% da aflatoxina M₁ (STOLOFF et al., 1975). Em amostras armazenadas a -18°C, por 120 dias, a diminuição na concentração de AFM₁ ocorreu mais lentamente, com perdas de 14%, aos 30 dias e 86%, aos 120 dias (MCKINNEY et al., 1973).

Galvano et al. (1998) observaram que não houve redução do nível de AFM₁ no processo de fermentação de iogurte com leite contaminado artificialmente. A concentração de AFM₁ poderia, até mesmo, aumentar devido ao processo de condensação. Foi demonstrado que, em 114 amostras de iogurte, 91 (80%) apresentavam AFM₁ com concentrações entre 1 e 496,47 ng/kg. Kim et al. (2000) detectaram a presença de AFM₁, com concentrações entre 17 e 124 ng/kg, em 50% das 60 de amostras de iogurte analisadas.

A aflatoxina M₁ no leite associa-se à fração proteica (caseína), ficando nela retida mesmo após a pasteurização e o beneficiamento para a produção de

derivados. Na fabricação de derivados do leite, o desnatamento tem mostrado afetar a distribuição de aflatoxina M_1 no produto final. Como a aflatoxina fica associada à caseína, durante o desnatamento do leite integral, 84% do total do conteúdo de aflatoxina M_1 fica retido no produto desnatado (MARTINS; MARTINS, 1986). A concentração da matéria-prima, como a que se obtém na fabricação de leite em pó, leite condensado, requeijão e queijos, pode aumentar a proporção de aflatoxina M_1 no produto final, em função da diminuição do teor de água (LÓPEZ et al., 2001).

A distribuição da AFM_1 em alguns alimentos elaborados a partir de leite contaminado é, aproximadamente, a seguinte: 40%-60% em queijos, 10% nas natas e <2% na manteiga. A maior parte da AFM_1 passa para o queijo e não para o soro. A associação da AFM_1 com a caseína, quando esta é precipitada, mostra ser uma explicação razoável para este fato (YOUSEF; MARTH, 1989).

Hassanin (1994) investigou a estabilidade da aflatoxina M_1 durante a produção e o armazenamento de iogurte, queijo e leite acidificado e concluiu que a aflatoxina M_1 do leite é passada para os produtos preparados.

Wiseman e Marth (1983) investigaram a estabilidade da aflatoxina M_1 durante a produção e o armazenamento de manteiga, leite em pó desnatado e leitelho (leite ácido semidesnatado) em pó. Embora com valores variados, a aflatoxina M_1 permanecia estável nos produtos, confirmando, dessa forma, a transmissão.

Vários pesquisadores notaram uma tendência sazonal na contaminação do leite por AFM_1 . Os índices menores ocorreram durante os meses de verão, quando os animais são comumente alimentados com pastagens, o contrário do que acontece no inverno, quando os animais são alimentados com rações (GALVANO et al., 1998).

Como o leite existente no comércio é uma mistura de leites de diferentes procedências, os níveis de aflatoxina M_1 são, muitas vezes, inferiores aos limites

de detecção dos métodos de análise utilizados (SABINO et al., 1997). De acordo com Visconti e Pascale (1998), a maioria dos resultados negativos obtidos em estudos sobre incidência de aflatoxina M_1 pode ser atribuída à baixa sensibilidade dos métodos analíticos empregados. Portanto, um controle eficiente da aflatoxina M_1 em leite requer métodos analíticos de elevada sensibilidade, especificidade, precisão e exatidão, além de rapidez e facilidade (DOMINGUEZ et al., 1987). Segundo Sylos e Rodriguez-Amaya (1996), estudos relativos às metodologias para a determinação de micotoxinas em alimentos são necessários e urgentes, visando à confiabilidade dos resultados relativos à ocorrência.

A contaminação do leite de consumo humano por AFM_1 assume destacada relevância ao se considerar que seus efeitos tóxicos e carcinogênicos têm sido extensivamente demonstrados em diversas espécies, sobretudo em animais jovens. Consequentemente, torna-se indispensável a adoção de técnicas analíticas exequíveis e confiáveis para a detecção e o controle desta toxina no leite (FUJI; GARCIA; HIROOKA, 2004).

Em relação ao queijo, a presença de aflatoxina pode ser, fundamentalmente, devido a três causas: (1) presença de AFM_1 no leite com o qual queijos são elaborados, como consequência de alimentos contaminados com AFB_1 e ingeridos pelo gado leiteiro; (2) síntese de aflatoxinas por fungos que crescem em queijos e (3) o uso de leite de pó com AFM_1 utilizado na elaboração de queijo (LOPEZ et al., 2001).

A presença de aflatoxina M_1 em queijos é de extrema importância por ser altamente resistente aos processamentos realizados no leite, como tratamento térmico e desnatado, por exemplo. Dessa forma, se esperam altas concentrações de aflatoxina M_1 em requeijão cremoso e queijo ralado, quando proveniente de leites contaminados, pois ela tem afinidade de complexar-se sobre as micelas de caseína, principal proteína encontrada em queijos.

2.6 Queijo ralado

De acordo com a legislação brasileira, o queijo ralado é o produto obtido por esfarelamento ou ralagem da massa de uma ou até quatro variedades de queijos de baixa umidade aptos para o consumo humano, podendo ser parcialmente desidratado ou não. Devem apresentar aspectos e textura de grânulos ou filetes mais ou menos finos; cor branco-amarelada a amarelo e odor característico, de acordo com as variedades de queijos da qual provenha. Com relação ao alto teor de umidade, os queijos ralados desidratados com predominância (>50% m/m) de queijos com baixa umidade deverão apresentar umidade máxima 20g/100g. Entretanto, se houver predominância (>50% m/m) de queijos de média umidade, deverão apresentar umidade máxima de 30g/100g (BRASIL, 1997a).

Quanto aos critérios microbiológicos, está em vigor a Resolução nº12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a ANVISA (BRASIL, 2001), que prevê limites para coliformes a 45°C de 10^3 NMP/g, *Staphylococcus* coagulase positiva de 10^3 UFC/g e ausência de *Salmonella* sp./25g. A Portaria nº451 (BRASIL, 1997b), revogada por esta resolução, quanto aos padrões microbiológicos, previa também a determinação de bolores e leveduras e de *Listeria monocytogenes*. A retirada destes microrganismos como critérios microbiológicos não parece coerente, pois os fungos filamentosos, referidos na legislação revogada como bolores, são os mais susceptíveis de sobrevivência nestes alimentos de baixa atividade de água (aw) e podem estar ligados à contaminação ambiente e pelo ar. E o alimento contaminado com *Listeria monocytogenes* traz sérios riscos à saúde dos consumidores.

Segundo Mosquim (1998), o queijo ralado é um dos produtos mais fraudados, principalmente no Brasil, entretanto, são poucos os trabalhos disponíveis na literatura científica sobre a sua qualidade.

2.7 Requeijão

A tecnologia de queijos fundidos surgiu no início do século XX, com a necessidade de se deter os processos microbianos e enzimáticos de queijos suíços e alemães, de forma a viabilizar a exportação para países de clima quente (GARRUTI et al., 2006). O requeijão é um produto tipicamente brasileiro, fabricado em todo o território nacional, com algumas variações de tecnologia e características. Esse tipo de queijo é fabricado a partir de leite desnatado, cru ou pasteurizado, com ou sem adição de cultura láctica (fermentação lenta natural). A massa para a sua fabricação pode ainda ser obtida por adição de ácidos orgânicos e por coagulação enzimática (coalho). Trata-se de um produto obtido por fusão normalmente acompanhada pela adição de sais fundentes e destinado ao consumo imediato (SOARES et al., 2002). O requeijão cremoso é um tipo de queijo fundido cremoso (GARRUTI et al., 2006).

O requeijão cremoso é um queijo de consumo expressivo no mercado nacional. Nos últimos anos, tem sido observado um crescente interesse dos fabricantes pelos análogos de queijo ou queijos imitação.

De acordo com Brasil (1997b), entende-se por requeijão o produto obtido pela fusão da massa coalhada, cozida ou não, dessorada e lavada, obtida por coagulação ácida e/ou enzimática do leite, opcionalmente adicionada de creme de leite e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite e ou *butter oil*. Brasil (1997b) estabelece como requisitos físico-químicos o teor de matéria gorda no extrato seco variando de 45,0 a 54,9g/100g e o teor de umidade máximo de 60,0g/100g. O requeijão *light*, ou com baixo teor de gordura, deve obedecer à classificação estabelecida, ou seja, deverá sofrer redução mínima de 25% em gorduras totais e diferença maior que três gramas de gordura/100g de sólidos em relação ao produto tradicional.

Segundo Moreno, Vialta e Valle (2002), a presença de vários tipos de microrganismos no requeijão, seja por contaminação das matérias-primas ou por falhas durante o processamento, origina vários tipos de deteriorações, com prejuízos sensíveis para a sua qualidade.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A partir desta revisão, pode-se verificar que a contaminação de queijos por microrganismos e metabólitos é um problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Apesar de no Brasil existirem legislações e regulamentações para o controle de qualidade dos alimentos, ainda existem falhas nessas normas e, junto com isso, falta a fiscalização efetiva e permanente na produção, na conservação e na comercialização destes produtos.

Assim, os queijos devem ser inspecionados pelos órgãos competentes em todas as fases, desde a propriedade rural, onde o leite ou o queijo é obtido, até as indústrias e os locais onde são expostos ao consumidor, com a finalidade de prevenir as doenças veiculadas pelos alimentos, assim como toxinas e metabólitos, como a aflatoxina M₁. A legislação vigente deve ser avaliada, a fim de ser complementada e nivelada com as legislações internacionais, para que se reduzam as limitações impostas à exportação, pela falta de qualidade dos produtos alimentícios direcionados para estes fins.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, I. P. S.; RODRIGUES, M. A. M. Qualidade microbiológica do queijo tipo mussarela artesanal comercializado em Uberlândia, MG. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 22, n. 162, p. 101-105, jun. 2008.

ARAÚJO, W. N. et al. Isolamento e identificação de coliformes no queijo Minas comercializados na região metropolitana de Salvador, Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 2, n. 2, p. 37-42, 2001.

ASAO, T. et al. Aflatoxins B and G. **Journal of American Chemical Society**, Easton, v. 85, p. 1706-1707, 1963.

AYCICEK, H.; AKSOY, A.; SAYGI, S. Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. **Food Control**, Guildford, v. 16, n. 3, p. 263-266, June 2005.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, n. 10, p. 1-10, Nov. 2000.

BALBANI, A. P. S.; BUTUGAN, O. Contaminação biológica de alimentos. **Pediatria**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 320-328, jul./ago. 2001.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 3, p. 497-516, May 2003.

BORGES, M. F. et al. Contamination profile for staphylococci and its enterotoxins and Monitorization of the conditions of hygiene in a 'coalho' cheese production line. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1431-1438, set./out. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 357**, de 8 de agosto de 1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo ralado. Brasília, 1997a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/348_97.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2011.

_____. **Portaria nº 359**, de 31 de maio de 1997. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de leite e produtos lácteos. Brasília, 1997b. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=2467>>. Acesso em: 10 fev. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução RDC nº 7**, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/anvisa/107378-7.html>>. Acesso em: 15 jun. 2011.

_____. **Resolução RDC nº 12**, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Brasília, 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 15 fev. 2011.

BULLERMAN, L. B.; SCHOEREDER, L. L.; PARK, K. Y. Formation and control of mycotoxins in food. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 47, n. 8, p. 637-646, Aug. 1984.

CARDOSO, L.; ARAÚJO, W. M. C. Parâmetros de qualidade em queijos comercializados no Distrito Federal, no período de 1997-2001. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 123, p. 49-53, 2004.

CHANG, S. B. et al. Aflatoxin B2: chemical identity and biological activity. **Science AAAS**, London, v. 142, n. 3596, p. 1191-1192, 1963.

CONTE, V. D. et al. Qualidade microbiológica de águas tratadas e não tratadas na região nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Informa**, Porto Alegre, v. 16, n. 11/12, p. 83-84, 2004.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 127, n. 8, p. 19-28, Sept. 2002.

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

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, Minneapolis, v. 13, n. 1, p. 16-34, Jan. 2000.

DOMINGUEZ, L. et al. Determination of aflatoxin M1 in milk and milk products contaminated at low levels. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, v. 70, n. 3, p. 470-472, June 1987.

EL-NEZAMI, H. S. et al. Aflatoxin M1 in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 173-179, Mar. 1995.

ELZUPIR, A. O.; ELHUSSEIN, A. M. Determination of aflatoxin M1 in dairy cattle milk in Khartoum State, Sudan. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 122, p. 945-946, Mar. 2010.

FALLAH, A. A. A. et al. Determination of aflatoxin M1 levels in Iranian white and cream cheese. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 8, p. 1872-1875, Sept. 2009.

FEITOSA, T. et al. Pesquisa de *Salmonella* sp, *Listeria* sp e microrganismos indicadores higiênicosanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 6, p. 162-165, jun. 2003.

FERNANDES, A. M.; ANDREATTA, E.; OLIVEIRA, C. A. F. de. Ocorrência de bactérias patogênicas em queijos no Brasil: questão de saúde pública. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 144, p. 44-56, 2006.

FERREIRA, H. et al. Aflatoxinas: um risco à saúde humana e animal. **Ambiência**, Guarapuava, v. 6, n. 3, p. 113-127, mar. 2006.

FLEET, G. H. Spoilage yeasts. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 12, n. 1, p. 1-44, Jan. 1992.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 216 p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 196 p.

FRISVAD, J. C.; SKOUBOB, P.; SAMSON, R. A. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambelli* sp. **Systematic and Applied Microbiology**, London, v. 28, n. 10, p. 442-453, Oct. 2005.

FUJII, S.; GARCIA, B. L.; HIROOKA, E. Y. Metodologia analítica imunoquímica com ênfase na detecção de micotoxinas. **Alimentos e Nutrição**, Marília, v. 15, n. 3, p. 273-284, 2004.
FURTADO, M. M. **Principais problemas do queijos**: causas e prevenção. São Paulo: Fonte, 1999. 56 p.

GALVANO, F. et al. Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Italy. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 6, p. 738-741, June 1998.

GARRUTI, D. S. et al. Desenvolvimento do perfil sensorial e aceitação de requeijão cremoso. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 434-440, jun. 2006.

HASSANIN, N. I. Stability of aflatoxin M₁ during manufacture and storage of yoghurtcheese and acidified milk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 65, n. 12, p. 31-34, Dec. 1994.

HOFFMANN, F. L. et al. Qualidade microbiologia de queijos ralados de diversas marcas comerciais, obtidos do comércio varejista do município de São José do Rio Preto, SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 122, p. 62-66, 2004.

HUSSEIN, S. H.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, Limerick, v. 167, n. 8, p. 101-134, Aug. 2001.

IKEDA, T. et al. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of Staphylococcal enterotoxins A and H. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 5, p. 2793-2795, May 2005.

JAY, J. M. **Microbiologia dos alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712 p.

KENSLER, T. W. et al. Translational strategies for cancer prevention in liver. **Nature Reviews: Cancer**, London, v. 3, n. 1, p. 321-329, Jan. 2003.

KIM, E. K. et al. Occurrence of aflatoxin M₁ in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 17, n. 1, p. 59-64, Jan. 2000.

KLICH, M. A. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Mycoscience**, Tokyo, v. 48, n. 8, p. 71-80, Aug. 2007.

KOMATSU, R. S. et al. Occurrence of *Staphylococcus coagulase positiva* in fresh Minas cheese produced in Uberlândia, MG. **Bioscience**, Washington, v. 26, n. 2, p. 316-321, Mar. 2010.

KWIATKOWSKI, A.; ALVES, A. P. F. Importância da detecção e do controle de aflatoxinas em alimentos. **Revista Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 2, n. 2, p. 45-54, 2007.

LEITE, M. M. D.; LIMA, M. G.; REIS, R. B. dos. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas tipo Frescal. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 132, p. 89-93, jan. 2005.

LÓPEZ, C. et al. Distribution of aflatoxin M₁ in cheese obtained from milk artificially contaminated. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 1/2, p. 211-215, Apr. 2001.

MALLOZZI, A. B.; CORRÊA, B. Fungos toxigênicos e micotoxinas. **Boletim Técnico do Instituto de Biologia**, São Paulo, n. 12, p. 5-26, dez. 1998.

MARTINS, J. L. S.; MARTINS, I. S. Aflotoxina M₁ no leite tipo B comercializado no município de São Paulo, SP, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 20, n. 4, p. 303-308, 1986.

MCKINNEY, J. D. et al. Effects of ammoniation on aflatoxins in rations fed lactating cows. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 50, n. 3, p. 79-84, 1973.

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. 295 p.

MINERVINI, F. et al. Survey on mycoflora of cow and buffalo dairy products from Southern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 69, n. 5, p. 141-146, Dec. 2001.

MONTAGNA, M. et al. Investigation of fungal contamination in sheep and goat cheeses in southern Italy. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 158, n. 12, p. 245-249, Dec. 2004.

MORENO, I.; VIALTA, A.; VALLE, J. L. E. Microrganismos responsáveis pela principais deteriorizações do requeijão e outros queijos fundidos. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, v. 41, n. 6, p. 72-75, nov./dez. 2002.

MOSQUIM, M. C. Queijo ralado. In: SANTOS, J. A. (Ed.). **Nova legislação comentada**. São Paulo: Fonte, 1998. p. 95-100.

MURPHY, P. A. et al. Food mycotoxins: an update. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 71, n. 5, p. 51-65, May 2006.

NUNES, I. L. et al. Arroz comercializado na região Sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 190-194, fev. 2003.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 32-37, 1997.

PÁDUA, I. P. M. et al. Aflatoxinas e risco de contaminação do leite humano. **Pro Homine**, Lavras, v. 1, n. 1, p. 59-66, jul./dez. 2002.

PELCZAR, J. M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia, conceitos aplicações: doenças transmitidas por água e alimentos**. São Paulo: Makron Books, 1996. 517 p.

PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; PEREIRA, J. L. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas em alimentos experimentalmente inoculados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 171-175, mar./abr. 2001.

PEREIRA, M. M. G. et al. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais, Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 106-112, jan./fev. 2005.

PIETROWSKI, G. A. M. et al. Evaluation of quality of microbiological mozzarella cheese kind of town marketed in Ponta Grossa, Paraná. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 2, n. 2, p. 25-31, 2008.

PIMENTEL, E. F. et al. Evaluation of the labelling and physico-chemical and microbiological quality of grated cheese. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 114-120, 2002.

PITT, J. I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British Medical Bulletin**, Edinburgh, v. 56, n. 5, p. 184-292, Dec. 2000.

PRADO, G. et al. Aflatoxin M1 in samples of “Minas” cheese commercialized in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 3, p. 398-400, maio/jun. 2000.

_____. Aflatoxina M1 em queijo prato e parmesão determinada por coluna de imunoafinidade e cromatografia líquida. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 147-151, 2001.

PRATA, A. F. G. et al. Fungos toxigênicos e proteolíticos isolados de queijo tipo parmesão ralado e embalado, comercializado em Niterói, RJ. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 6, p. 49-52, nov./dez. 2001.

PURCHASE, I. F. et al. Reduction of the aflatoxin M content of milk by processing. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 383-387, 1972.

RODRÍGUEZ-AMAYA, D. B.; SABINO, M. Pesquisa em micotoxinas no Brasil: a última década em foco. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 1-11, 2002.

ROHM, H.; ELISKASES-LECHNER, F.; BRÄUER, M. Diversity of yeasts in selected dairy products. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 72, n. 1, p. 370-376, Jan. 1992.

ROMERO, A. C. et al. Occurrence of AFM1 in urine samples of a Brazilian population and association with food consumption. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 3, p. 554-558, June 2010.

ROSA, V. P.; PORTO, E.; SPOTO, M. H. F. Avaliação microbiológica e sensorial de queijos Minas frescal embalados sob atmosfera modificada. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 132, p. 58-64, 2005.

SABINO, M. et al. Avaliação da eficiência de dois kits comerciais para detecção de AFB1 em amostras de milho, ração e amendoim e seus produtos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 6, p. 107-110, nov./dez. 1997.

SABINO, M.; PURCHIO, A.; ZORZETTO, M. A. P. Separação e determinação das aflatoxinas M1 e M2 em amostras de leite de vaca por cromatografia líquida de alta resolução. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 87-100, 1984.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. 144 p.

SHEPHARD, G. S. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 25, n. 2, p. 146-151, Feb. 2008.

SMITH, J. E.; MOSS, M. O. **Mycotoxins: formation, analysis, and significance**. New York: Wiley, 1985. 148 p.

SOARES, F. M. et al. Influência do concentrado protéico de soro na composição do requeijão em barra com teor reduzido de gordura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 6, p. 91-96, 2002.

STOLOFF, L. et al. Stability of aflatoxin M₁ in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 58, n. 12, p. 1789-1793, Dec. 1975.

SYLOS, C. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Estudo comparativo de métodos para determinação de aflatoxina M₁. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 56, n. 3, p. 87-97, set. 1996.

TEKINSEN, K. K.; UÇAR, G. Aflatoxin M1 levels in butter and cream cheese consumed in Turkey. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 6, p. 346-349, Dec. 2008.

TORKAR, K. G.; VENGUST, A. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 2, p. 570-577, Mar. 2008.

TORTAJADA, J. F. et al. Micotoxinas y cáncer pediátrico. **Revista Espanola de Pediatria**, Madri, v. 57, n. 1, p. 279-280, 2001.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: UFSM, 1997. 206 p.

UNUSAN, N. Occurrence of aflatoxina M1 in UHT milk in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 44, n. 2, p. 1897-1900, Apr. 2006.

VISCONTI, A.; PASCALE, M. Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 815, n. 3, p. 133-140, May 1998.

WISEMAN, D. W.; MARTH, E. H. Stability of aflatoxin-M₁ during manufacture and storage of a butter-like spread, non-fat dried milk and dried buttermilk. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 46, n. 7, p. 633-636, Sept. 1983.

YAZICI, Y. et al. Resistance rates for various antibiotic Enterobacter strains isolated from clinical specimens. **Turk Tip Cemiyeti Mecmuasi**, Istanbul, v. 34, n. 6, p. 29-32, June 2004.

YOUSEF, A. E.; MARTH, E. H. **Stability and degradation of aflatoxin M₁ in mycotoxins in dairy products**. London: Elsevier Applied Science, 1989. 161 p.

CAPÍTULO 2

Contagem microbiana e incidência de aflatoxina m_1 em queijo ralado e requeijão comercializados em diferentes cidades do estado de Minas Gerais

RESUMO

A qualidade e a segurança dos alimentos constituem preocupações do consumidor atual. O consumo de alimentos contaminados causadores de diversas patologias ao ser humano é, hoje, um dos principais problemas de saúde pública. O queijo ralado e o requeijão são produtos consumidos em baixas quantidades, porém, com certa frequência. Sendo assim, oferecem grande risco de causar toxinfecções alimentares e podem ser muito importantes no acúmulo de toxinas, como a aflatoxina M_1 . O presente trabalho foi realizado com os objetivos de realizar a contagem microbiana e determinar a incidência da AFM_1 em queijo ralado e requeijão comercializados em cidades do estado de Minas Gerais, Brasil. Avaliou-se a presença de *Staphylococcus* spp., enterobactérias e fungos filamentosos e quantificou-se a AFM_1 com colunas de imunoafinidade, por cromatografia de alta eficiência (CLAE). Nas amostras de queijo ralado foi determinada a presença de *Staphylococcus* spp. em 32% das amostras, de enterobactérias em 36% e de fungos filamentosos em 77%. A presença da AFM_1 foi detectada em 72,73% das amostras, variando de não detectável a $244,6 \text{ ng kg}^{-1}$. As amostras de requeijão apresentaram, para *Staphylococcus* spp., contagens de 10^4 UFC.g^{-1} em apenas uma amostra e 10^5 UFC.g^{-1} para uma amostra, em relação às enterobactérias. Não foi detectada a presença nem de fungos filamentosos e nem de AFM_1 em nenhuma das amostras de requeijão avaliadas. Estes resultados indicam que as amostras de queijo ralado podem apresentar algum risco à saúde do consumidor. Porém, o requeijão demonstrou bom padrão de qualidade em todos os itens avaliados.

Palavras-chave: Aflatoxina M_1 . Qualidade Microbiológica. Requeijão. Queijo Ralado.

ABSTRACT

Food quality and safety are primary concerns of consumers today. The consumption of contaminated food that causes various diseases to humans is now a major public health issue. The grated cheese and creamy cheese are consumed in small amounts, but with some frequency. Thus, they offer great risk of causing food poisoning, and can be very important in the accumulation of toxins such as Aflatoxin M1. This study aimed to evaluate the microbiological quality and the presence of Aflatoxin M1 in the creamy cheese marketed in the State of Minas Gerais, Brazil. The presence of *Staphylococcus* spp., Enterobacteria and filamentous fungi has been evaluated and AFM1 has been quantified with immunoaffinity columns by high-performance liquid chromatography (HPLC). The grated cheese samples presented high counts of *Staphylococcus* spp., Enterobacteria and Filamentous Fungi in 18%, 9% and 23% of the samples, respectively. And the presence of Aflatoxin M1 was detected in 72.73% of the samples, ranging from undetectable to 244,6 ng Kg⁻¹. Creamy cheese samples submitted for *Staphylococcus* spp., presented counts of 104 UFC.g⁻¹ only in one sample and 105 UFC.g⁻¹ for one sample in relation to Enterobacteria. The presence of filamentous fungi was not detected, neither was of AFM1 in the studied samples of creamy cheese.

Keywords: Aflatoxin M1. Microbiological Quality. Creamy Cheese. Grated Cheese.

1 INTRODUÇÃO

O queijo ralado e o requeijão são ingredientes amplamente utilizados na culinária brasileira, sendo consumidos em baixas quantidades, porém, de modo frequente. O queijo ralado é um produto obtido por esfarelamento ou ralagem da massa de uma ou até quatro variedades de queijo de baixa umidade e aptos para o consumo humano, podendo ser parcialmente desidratado ou não (BRASIL, 1997a). O requeijão é um produto tipicamente brasileiro e é definido como um produto obtido pela fusão da massa coalhada, cozida ou não, dessorada e lavada, obtida por coagulação ácida e/ou enzimática do leite, opcionalmente adicionada de creme de leite e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite ou *butter oil* (BRASIL, 1997b).

Contudo, estes alimentos podem oferecer alguns riscos à saúde por causa de contaminações provenientes da matéria-prima ou do processamento. Dentre essas contaminações podem-se destacar alguns grupos de microrganismos importantes, indicadores de manipulação deficiente, como *Staphylococcus* spp., enterobactérias e deterioradores, como fungos filamentosos, além das micotoxinas, como a aflatoxina M₁ (AFM₁).

As micotoxinas são contaminantes naturais que ocorrem frequentemente em uma grande variedade de alimentos, levando sérios riscos à saúde humana e animal, após a ingestão de produtos contaminados. São metabólitos secundários produzidos principalmente por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, sob condições apropriadas de temperatura e umidade (FALLAH, 2010). As aflatoxinas (AFs) são as micotoxinas mais estudadas e consistem, principalmente, de quatro compostos naturais, as aflatoxinas B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂). São altamente tóxicas, mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas, e têm sido apontadas como causadores de câncer hepático em humanos (SIDHU; CHANDRA; BEHL, 2009). Os principais

fungos filamentosos produtores de aflatoxinas são: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus bombycis*, *Aspergillus ochraceoroseus*, *Aspergillus nomius* e *Aspergillus pseudotamari* (BENNET; KLICH, 2003; CHERAGHALI et al., 2007). A aflatoxina M₁ é um metabólito proveniente da hidroxilação da AFB₁ ingerida em alimentos ou rações, originada pelo seu metabolismo no organismo humano e animal. A AFM₁ pode estar presente nos fluidos corporais, como urina, no leite e no sangue (ROMERO et al., 2010). A ingestão diária aceitável de aflatoxina M₁ é de 6,8 ng/pessoa, na Europa; de 3,5 ng/pessoa, na América Latina; de 12 ng/pessoa no Extremo Oriente e de 0,7 ng/pessoa na África (CREPPY, 2002).

A presença de microrganismos patogênicos como *Staphylococcus* spp. é de grande importância em alimentos por apresentarem risco para a saúde pública, estando frequentemente associados com casos e surtos de intoxicação alimentar em todo o mundo, devido à capacidade de algumas cepas de produzir vários tipos de enterotoxinas (VERAS et al., 2008). Este grupo de bactérias encontra-se largamente distribuído no meio ambiente e tem como principais habitats a pele, as glândulas e as membranas mucosas, além do trato intestinal do homem e dos animais. A presença de *Staphylococcus* spp. em alimentos sugere uma provável participação de manipuladores portadores desse microrganismo (BALABAN; RASOOLY, 2000).

As enterobactérias estão amplamente distribuídas no solo, na água, nas plantas e no intestino do homem e animais e podem causar infecções intestinais e extraintestinais. Na família das enterobactérias incluem-se alguns gêneros importantes, como *Escherichia* spp. e *Salmonella* spp., que podem causar graves doenças, além dos grupos de coliformes a 35°C e coliformes termotolerantes que são frequentemente utilizados como indicadores das condições sanitárias no controle da qualidade de água e alimentos (SILVA et al., 2007; SOUZA, 2006).

Por centenas de anos têm-se observado as diferentes alterações que ocorrem no sabor e na qualidade dos alimentos, devido ao crescimento de fungos. Em muitos casos, os fungos podem causar transformações indesejáveis nos alimentos, produzindo sabores e odores desagradáveis, além da decomposição em graus variáveis; eventualmente, também podem acarretar consequências danosas e prejudiciais à saúde do homem e dos animais. Os fungos filamentosos são provenientes, principalmente, do solo, do ar e de produtos deteriorados. A presença desses microrganismos indica que o produto pode estar em fase de deterioração, mesmo que esta possa não ser visível. Os principais gêneros de fungos filamentosos envolvidos na deterioração de queijos pertencem aos gêneros *Mucor* spp., *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Geotrichum* spp., *Aspergillus* spp. e *Moniliella* sp. (FLEET, 1992; ROHM; ELISKASES-LECHNER; BRÄUER, 1992; TORKAR; VENGUST, 2008). Em queijo ralado foram isolados os seguintes gêneros de fungos filamentosos: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Phoma*, *Trichosporon* e *Ulocladium* (KURE; SKAAR, 2000; PRATA et al., 2001).

As toxinfecções alimentares devem ser preocupações constantes na indústria de laticínios, pois a chance de contaminação desses produtos é muito alta. Com isso, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de realizar a contagem de *Staphylococcus* spp., *Enterobactereaceas* e de fungos filamentosos, e avaliar a incidência de AFM₁ em queijo ralado e requeijão comercializados em diferentes cidades do estado de Minas Gerais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

Foram analisadas 22 amostras de queijo ralado e 13 amostras de requeijão, adquiridas nas cidades de Arinos, Barbacena, Juiz de Fora, Lavras, Matipó, Manhumirim, São João Del Rei, Unai e Varginha, no estado de Minas Gerais, Brasil, no período de setembro de 2009 a novembro de 2010. Foram utilizadas amostras de 200 g do mesmo lote e as análises foram realizadas respeitando-se o prazo de validade indicado pelo fabricante.

4.2 Determinação de aflatoxina M₁

Os métodos analíticos empregados nas análises de AFM₁ foram previamente avaliados com a utilização de queijos ralados contaminados artificialmente em triplicata, com 0,34 e 0,68 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFM₁. Os percentuais de recuperação apresentaram média de 84,75%. Para as análises de requeijão, a amostra isenta de aflatoxina M₁ foi contaminada em quatro repetições, com 0,77 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxina M₁ e a recuperação da toxina foi de 84%, em média. As concentrações das soluções estoques foram determinadas de acordo com a Association of Official Analytical Chemistry - AOAC (1995). O limite de detecção foi de 10 ng kg^{-1} e o de quantificação foi de 20 ng kg^{-1} . Os valores de recuperação e coeficientes de variação foram superiores a 70% e inferiores a 20%, respectivamente, de acordo com o estabelecido pela Lei N° 401/2006 de 23/2/2006 da Commission Regulation - EC (2006) e Horwitz, Kamps e Boyer (1980).

As amostras foram analisadas na Fundação Ezequiel Dias, em Belo Horizonte, MG, em duplicatas, de acordo com os métodos utilizados por Dragacci et al. (1995) e Prado et al. (2000, 2001), como descrito abaixo.

4.2.1 Preparo da curva de calibração

A partir da solução estoque (SE) de aflatoxina M₁ (8,519 µg mL⁻¹), foi preparada uma solução de trabalho (ST) com concentração de 8,519 ng mL⁻¹ de aflatoxina M₁ (água:acetonitrila; 70:30). A partir da ST foi preparada a curva padrão. A linearidade foi avaliada na faixa de 0,10 a 26,82 ng mL⁻¹ e calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Foi utilizado o coeficiente de correlação linear (r²) como indicador da reta como modelo matemático. O valor encontrado foi maior que 0,99, como recomendado por Green (1996).

Os valores de recuperação e coeficientes de variação foram superiores a 70% e inferiores a 20%, respectivamente, de acordo com o estabelecido pela Lei N.º 401/2006 de 23/2/2006 da EC (2006).

4.2.2 Extração da aflatoxina M₁

Foram pesados 10 g da amostra, adicionadas 10 g de celite e 80 mL de diclorometano. Essa solução foi levada para um agitador, por 45 minutos, filtrada em papel filtro n.º 4 e, em seguida, foi lavada com 40 mL de diclorometano. O filtrado foi evaporado em banho-maria, à temperatura entre 35° e 40°C. O resíduo foi dissolvido em uma solução de 1 mL de metano, 30 mL de água e 50 mL de n-hexano. Esta solução foi transferida para um funil de separação, agitada vigorosamente e a fase aquosa foi recolhida. Com a

finalidade de lavar a solução do funil, foram adicionados 10 mL de água, por duas vezes e a fase aquosa foi recolhida, juntamente com a primeira.

4.2.3 Purificação da amostra em coluna de imunoafinidade

Foram utilizadas colunas de imunoafinidade AFM₁ da Vicam Inc. (USA). As colunas foram adaptadas a uma seringa de vidro e um sistema de bomba a vácuo. O extrato foi passado por esse sistema e a eluição ocorreu gravitacionalmente. Após esse processo, a coluna foi lavada com 2 mL de água e o eluato foi esgotado à vácuo. Foram adicionados 4 mL de acetonitrila à coluna, por 7 minutos e o eluato foi recolhido em frasco âmbar. Esta solução foi aquecida em atmosfera de nitrogênio até a secagem e guardada em freezer até o momento da quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência.

4.2.4 Quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Aflatoxina M₁ foi quantificada por CLAE, utilizando um cromatógrafo líquido LC-10 AD, Shimadzu, Japão, acoplado a um amostrador automático SIL 10 AF e a um detector de fluorescência (excitação 366 nm, emissão 428 nm), usando uma coluna Shim-Pack CLC-ODS, 5 µm, 250 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro interno, precedida por uma pré-coluna Shim-Pack G-ODS, 5 µm, 10 mm de comprimento x 4 mm de diâmetro interno. A fase móvel utilizada foi acetonitrila:isopropanol:água (8:12:80, v/v/v), filtrada em uma membrana de 0,45 µm, degaseificada e em um fluxo de 1 mL/min. Nestas condições, o tempo de retenção foi de, aproximadamente, 11-13 minutos, conforme o mês de análise. Para a quantificação da aflatoxina M₁ nas amostras, foi utilizada uma curva de calibração preparada como descrito acima. A partir do cálculo da área do pico da aflatoxina M₁ (Figura 1) do extrato da amostra e das soluções

padrões, foi calculado o teor da aflatoxina M1 na amostra. Todas as análises foram efetuadas em duplicata e cada extrato foi injetado duas vezes.

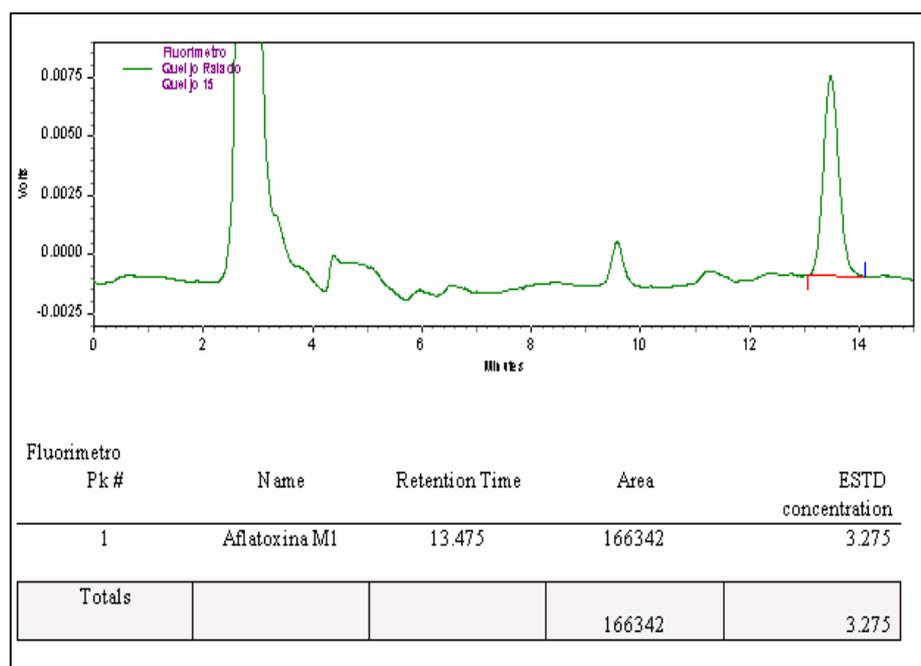


Figura 1 Cromatograma de amostra de queijo ralado contaminada

4.3 Análises microbiológicas

Todas as amostras foram analisadas no Laboratório de Micologia, no Departamento de Ciências dos Alimentos, da Universidade Federal de Lavras, em triplicatas e em três diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), de acordo com Wehr e Frank (2004). Para a detecção de enterobactérias foi utilizado o meio de cultura *violet red bile agar glucose* (VRBG) (Himedia). Foi plaqueado 1 mL das diluições, em profundidade com sobrecamada, e as placas foram incubadas, por 24 horas, em estufa, a 35°C. Em seguida, foram feitas contagens de colônias típicas.

A contagem de *Staphylococcus* sp. foi realizada em meio ágar Baird-Parker (BP) (Himedia), inoculando-se 0,1 mL em superfície, sendo as placas incubadas a 37°C e, após 48 horas, foi realizada a contagem de colônias (WEHR; FRANK, 2004).

A contagem de fungos filamentosos foi realizada em meio dicloran glicerol 18 (DG-18) (Himedia), para as amostras de queijo ralado e *dichloran rose bengal chloramphenicol* (DRBC), para as amostras de requeijão, plaqueando-se 0,1 mL das diluições em superfície. As amostras foram incubadas, a 25°C, por sete dias, conforme Silva et al. (2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A incidência de AFM_1 em queijo ralado foi relativamente alta (Gráfico 1), pois 72,73% das amostras estavam contaminadas. Níveis que variaram de 10 a 99 ng kg^{-1} foram detectados em 9 amostras (40,9%); 7 (31,82%) continham níveis que variaram de 100 a 250 ng kg^{-1} e nenhuma delas ultrapassou 250 ng kg^{-1} , que é o limite máximo tolerado pela legislação brasileira, regulamentada pela RDC n°7, de 22 de fevereiro de 2011 (BRASIL, 2011), e pela maioria dos países europeus. A origem desta contaminação está relacionada à presença da aflatoxina B_1 na alimentação de gado leiteiro. A AFB_1 é biotransformada no fígado, formando a toxina AFM_1 , que é excretada no leite e em outras secreções. Durante o processamento de queijos, a AFM_1 não reduzida e nem eliminada. Ao contrário, ela é concentrada por se ligar à caseína. Sendo a toxina um metabólito termoestável, ela não é eliminada no processamento, permanecendo no produto final (LÓPEZ et al., 2001).

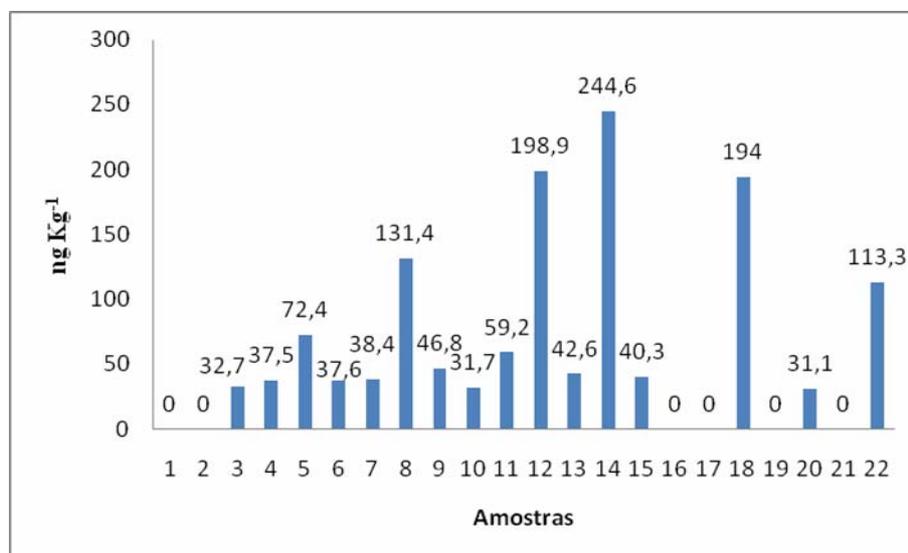


Gráfico 1 Resultados de AFM1 para queijo ralado

No Brasil, Prado et al. (2008) avaliaram, com a mesma metodologia, 88 amostras de queijo parmesão e encontraram a toxina em 46,4% das amostras, em níveis que variaram de 10 a 660 ng kg⁻¹, tendo apenas duas amostras ultrapassaram 250 ng kg⁻¹. Já o trabalho de Dashti et al. (2009) apresentou maior proximidade com este trabalho. Estes autores analisaram 40 amostras de diferentes queijos comercializados no Kuwait, pelo método de imunoafinidade tipo ELISA, e constataram que 80% das amostras estavam contaminadas com AFM₁, em concentrações que variaram de 23,8 a 452 ng kg⁻¹, e apenas uma amostra estava acima de 250 ng kg⁻¹. Torkar e Vengust (2008) avaliaram 40 amostras de diferentes queijos na Eslovênia, por meio de colunas de imunoafinidade e quantificação por CLAE, e encontraram níveis que variaram de 25 a 223ng kg⁻¹ em seis amostras. Os resultados deste estudo, comparados aos estudos citados, demonstram não ser comum o nível de aflatoxina M₁ em queijos

acima de 250ng kg^{-1} , porém, como visto, as amostras estão, frequentemente, contaminadas.

Nas análises microbiológicas do queijo ralado, foi detectada a presença de *Staphylococcus* spp. em 32% das amostras (Gráfico 2). A origem da contaminação com *Staphylococcus* spp. pode estar na matéria-prima ou em falha na higienização de equipamentos, utensílios e/ou dos manipuladores. Embora a produção de enterotoxinas estafilocócicas esteja geralmente associada à *Staphylococcus* coagulase positiva, algumas espécies não produtoras da enzima coagulase (*Staphylococcus* coagulase negativa) também produzem enterotoxinas (BORGES et al., 2008). Isso justifica a não realização do teste de coagulase. Pimentel et al. (2002) analisaram 18 amostras de queijo ralado comercializado em Belo Horizonte, MG, e os resultados foram negativos para *Staphylococcus* coagulase positiva. Isso pode ser justificado pela boa qualidade do processamento e da matéria-prima. Já Hoffmann et al. (2004) avaliaram 100 amostras de queijo ralado obtido em São José do Rio Preto, SP, e encontraram 10 amostras que apresentaram contagens acima de 10^3 UFC. g^{-1} para *Staphylococcus* spp., resultado acima do encontrado neste trabalho. Essa diferença de resultados pode ser explicada pela diferença na qualidade das amostras.

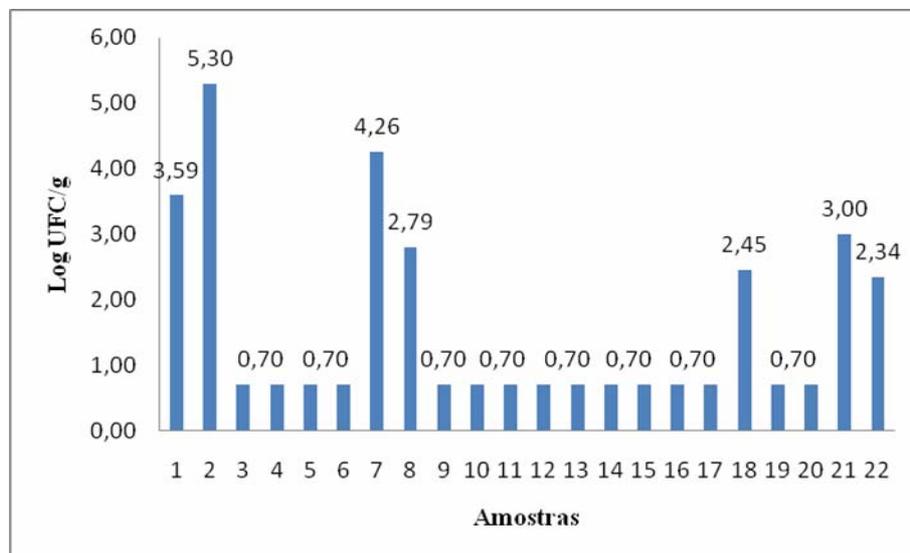


Gráfico 2 Resultados, em Log UFC.g⁻¹, de *Staphylococcus* spp. das amostras de queijo ralado

A presença de enterobactérias em 36% das amostras (Gráfico 3) indica possível contaminação de origem fecal e presença de bactérias patogênicas. No grupo das enterobactérias incluem-se patógenos tipicamente oportunistas, que causam algumas doenças. Desde os anos 1980 as enterobactérias têm sido documentadas como sendo importante fonte de infecções do trato urinário, endocardite e septicemia (YAZICI et al., 2004). No estudo realizado por Pimentel et al. (2002), não foram encontradas enterobactérias em amostras de queijo ralado. Porém, Tornadijo (2001) avaliou amostras de queijos tipo San Simón, que é considerado um queijo duro, e encontraram contagens que variaram de 10² UFC.g⁻¹ a 10⁴ UFC.g⁻¹. Essas variações encontradas podem ser justificadas pela qualidade do processamento dos queijos e, principalmente, pela higiene na produção.

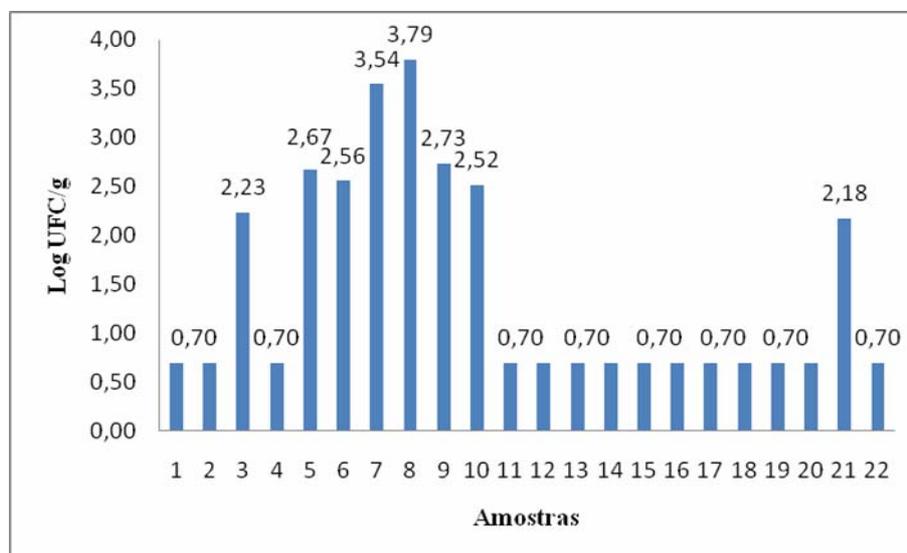


Gráfico 3 Resultados, em Log UFC.g⁻¹, de enterobactérias das amostras de queijo ralado

A presença de fungos filamentosos (Gráfico 4) em 32% das amostras indica contaminação ambiente e possíveis falhas de higienização no processamento. Também dá indícios de que o produto poderia estar em estado de deterioração, mesmo que ainda não visível. Torkar e Vengust (2008) analisaram 60 amostras de queijo, na Eslovênia e encontraram fungos filamentosos em 60% das amostras. Os autores identificaram os gêneros *Geotrichum* (51,5%), *Aspergillus* (33,8%), *Mucor* (5,9%), *Fusarium* (2,9%) e *Penicillium* (2,9%). No Brasil, Prata et al. (2001) analisaram amostras de queijo parmesão ralado e encontraram fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichosporon*, *Cladosporium* e *Mucor*. Já Kure e Skaar (2000) avaliaram 10² amostras de queijo na Noruega e encontraram fungos em 93,6% das amostras e isolaram fungos dos gêneros *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Phoma* e *Ulocladiumem*. A presença de fungos em alimentos pode ser justificada pela má higienização de

máquinas e do ambiente, e por falhas no processamento. Apesar dos grandes problemas toxicológicos causados pela produção de micotoxinas e dos prejuízos econômicos causados pela presença desses microrganismos, existem poucos trabalhos publicados relacionados à presença e à identificação de fungos filamentosos presentes em queijo. Na legislação brasileira não existem parâmetros para análise de fungos filamentosos em queijos, o que não parece coerente, pelo fato de estes microrganismos serem os mais susceptíveis de sobrevivência nestes alimentos de baixa atividade de água (aw) e por poderem estar ligados à contaminação ambiente e pelo ar.

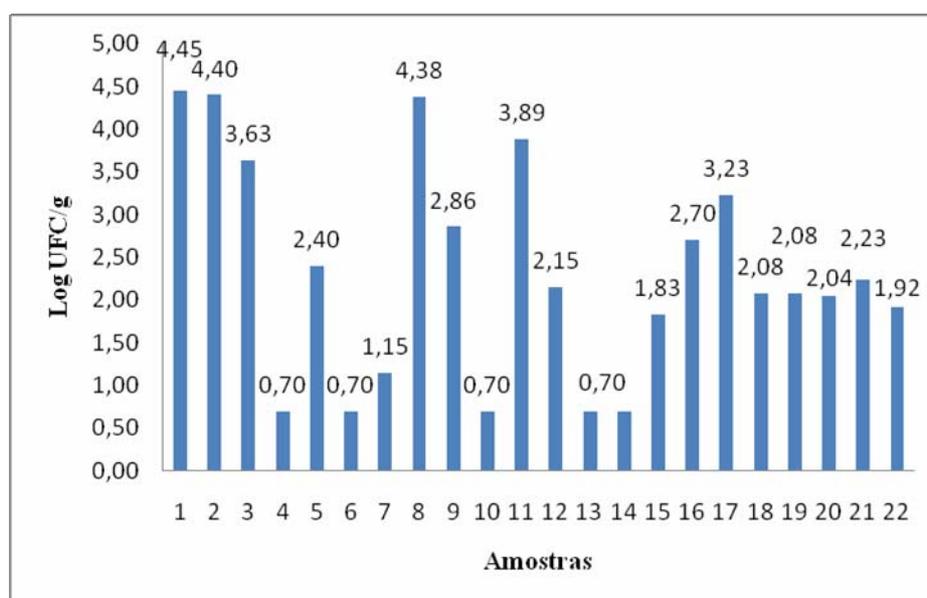


Gráfico 4 Resultados, em Log UFC.g⁻¹, de fungos filamentosos das amostras de queijo ralado

Os resultados das análises das amostras de requeijão foram bastante satisfatórios, em todas as análises. Não foi detectada AFM₁ em nenhuma das amostras. Para as avaliações microbiológicas houve crescimento significativo apenas para duas amostras; uma amostra apresentou contagem de 10^4 UFC.g⁻¹, para *Staphylococcus* spp. e outra amostra apresentou contagens de 10^5 UFC.g⁻¹, nas análises para enterobactérias. Para fungos filamentosos, não houve contagens significativas. Estes resultados mostram que, para a maioria das amostras avaliadas, a qualidade do leite e do processamento do requeijão está em boas condições. Para as duas amostras que estão fora do padrão estabelecido como apto para consumo, pode-se dizer que podem estar ocorrendo falhas nas boas práticas de fabricação, como má higienização, contaminações cruzadas, falhas no processamento e/ou falhas dos manipuladores e de armazenamento.

6 CONCLUSÕES

Os resultados da avaliação toxicológica e microbiológica indicam que o queijo ralado comercializado em algumas cidades do estado de Minas Gerais pode estar deteriorado ou, principalmente, representar um risco à saúde dos consumidores. Difere, assim, do requeijão, que apresentou, em sua maioria, boa qualidade microbiológica e toxicológica.

De maneira geral, os dados apresentados demonstram que há a necessidade de uma maior fiscalização em relação à aplicação das boas práticas de fabricação desses produtos, do controle de qualidade da matéria-prima e das condições higiênico-sanitárias do processamento e da produção.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. Arlington, 1995. 1066 p.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins: a review. **International Journal Food of Microbiology**, Amsterdam, v. 61, n. 4, p. 1-10, Aug. 2000.
- BENNET, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 7, p. 497-516, Sept. 2003.
- BORGES, M. F. et al. Contamination profile for staphylococci and its enterotoxins and Monitorization of the conditions of hygiene in a 'coalho' cheese production line. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1431-1438, set./out. 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 357**, de 8 de agosto de 1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo ralado. Brasília, 1997a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/348_97.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2011.
- _____. **Portaria nº 359**, de 31 de maio de 1997. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de leite e produtos lácteos. Brasília, 1997b. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=2467>>. Acesso em: 10 fev. 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução RDC nº 7**, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/anvisa/107378-7.html>>. Acesso em: 15 jun. 2011.
- CHERAGHALI, A. M. et al. Incidence of aflatoxins in Iran pistachio nuts. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 4, p. 812-816, Apr. 2007.
- COMMISSION REGULATION. **Laying down the methods of sampling and analysis for the official of the levels of mycotoxins in foodstuffs: nº 401/2006**, from 23/2/2006. Brussels, 2006. Disponível em: <<http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/usefulinf/files/es401-2006.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2010.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 127, n. 8, p. 19-28, Sept. 2002.

DASHTI, B. et al. Levels of aflatoxin M1 in milk, cheese consumed in Kuwait and occurrence of total aflatoxin in local and imported animal feed. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 12, p. 686-690, Aug. 2009.

DRAGACCI, S. et al. Use of immunoaffinity chromatography as purification step for the determination of aflatoxin M1 in cheeses. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 12, n. 1, p. 59-65, Jan. 1995.

FALLAH, A. A. Assessment of aflatoxin M1 contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 1, p. 988-991, Jan. 2010.

FLEET, G. H. Spoilage yeasts. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 12, n. 11, p. 1-44, Nov. 1992.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry News & Features**, Washington, v. 68, n. 1, p. 305-309, Feb. 1996.

HOFFMANN, F. L. et al. Microbiological quality of cheeses grated of diverse commercial marks, obtained of the commerce retailer of the local government of São José do Rio Preto, SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 188, p. 62-66, 2004.

HORWITZ, W.; KAMPS, L. R.; BOYER, K. W. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. **Journal Association Official and Analytical Chemists**, Washington, v. 63, n. 1, p. 1344-1354, Jan. 1980.

KURE, C. F.; SKAAR, I. Mould growth on the Norwegian semi-hard cheeses Norvegia and Jarlsberg. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 62, n. 7, p. 133-137, Sept. 2000.

LÓPEZ, C. et al. Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 1/2, p. 211-215, Apr. 2001.

PIMENTEL, E. F. et al. Evaluation of the labelling and physico-chemical and microbiological quality of grated cheese. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 132-137, maio/jun. 2002.

PRADO, G. et al. Aflatoxin M1 in samples of “Minas” cheese commercialized in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 3, p. 398-400, maio/jun. 2000.

_____. Aflatoxina M1 em queijo prato e parmesão determinada por coluna de imunoafinidade e cromatografia líquida. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 147-151, 2001.

_____. Occurrence of aflatoxin M1 in parmesan cheese consumed in Minas Gerais, Brazil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1906-1911, set./out. 2008.

PRATA, A. F. G. et al. Fungos toxigênicos e proteolíticos isolados de queijo tipo parmesão ralado e embalado, comercializado em Niterói, RJ. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 6, p. 49-52, nov./dez. 2001.

ROHM, H.; ELISKASES-LECHNER, F.; BRÄUER, M. Diversity of yeasts in selected dairy products. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 72, n. 3, p. 370-376, May 1992.

ROMERO, A. C. et al. Occurrence of AFM1 in urine samples of a Brazilian population and association with food consumption. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 2, p. 554-558, June 2010.

SIDHU, O. P.; CHANDRA, H.; BEHL, H. M. Occurrence of aflatoxins in mahua (*Madhuca indica* Gmel.) seeds: synergistic effect of plant extracts on inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 774-777, July 2009.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. 624 p.

SOUZA, C. P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista de Atenção Primária à Saúde**, Juiz de Fora, v. 9, n. 2, p. 1-11, mar. 2006.

TORKAR, K. G.; VENGUST, A. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 5, p. 570-577, Nov. 2008.

TORNADIJO, M. Study of *Enterobacteriaceae* during the manufacture and ripening of San Simón cheese. **Food Microbiology**, London, v. 18, n. 3, p. 499-509, Mar. 2001.

VERAS, J. F. et al. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infection Disease**, New York, v. 12, n. 2, p. 410-415, Mar. 2008.

WEHR, H. M.; FRANK, J. F. **Standard methods for the examination of dairy product**. Washington: APHA, 2004. 570 p.

YAZICI, Y. et al. Resistance rates for various antibiotic *Enterobacter strains* isolated from clinical specimens. **Turk Mik Cem Drugs**, Istambul, v. 34, n. 1, p. 29-32, Jan. 2004.