

Aflatoxina M₁ em queijo prato e parmesão determinada por coluna de imunoafinidade e cromatografia líquida

Aflatoxin M₁ in soft and parmesan cheese by immunoaffinity column and liquid chromatography

Guilherme PRADO¹
Marize S. de OLIVEIRA¹
Eliana P. de CARVALHO²
Thaís VELOSO¹
Leandro A. F. de SOUSA³
Ana Cristina F. CARDOSO³

RIALA6/907

Prado, G. *et al.* Aflatoxina M₁ em queijo prato e parmesão determinada por coluna de imunoafinidade e cromatografia líquida. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):147-151, 2001.

RESUMO: Produtos derivados de leite, como o queijo, podem estar contaminados com aflatoxina M₁ (AFM₁) quando o gado leiteiro consome ração contendo aflatoxina B₁ (AFB₁). Amostras de queijo tipo prato e tipo parmesão ralado foram coletadas na cidade de Belo Horizonte pela Vigilância Sanitária de Minas Gerais – Brasil. Foi obtido um extrato purificado através de extração com diclorometano, seguido de lavagem com n-hexano e purificação em coluna de imunoafinidade. A quantificação da AFM₁ foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando detector de fluorescência. AFM₁ foi detectada em todas as marcas de queijo tipo prato analisadas, em uma faixa de concentração de 0,02 a 0,54 ng/g e média de 0,15 ng/g. Em queijo ralado, tipo parmesão, AFM₁ foi detectada em 13 das 14 marcas de amostras analisadas (93%), em faixa de concentração de 0,04 a 0,30 ng/g e média de 0,14 ng/g.

PALAVRAS-CHAVE. queijo; aflatoxina M₁; coluna de imunoafinidade; CLAE.

INTRODUÇÃO

Aflatoxinas são produtos do metabolismo secundário de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, que contaminam as culturas no campo e durante o armazenamento e também os produtos alimentícios destinados ao consumo humano, apresentando atividade carcinogênica, teratogênica e mutagênica^{22,32}.

Mamíferos que ingerem produtos contaminados com aflatoxina B₁ (AFB₁) excretam pequenas quantidades de aflatoxina M₁ (AFM₁) no leite. Dessa forma, a população pode estar indiretamente exposta a aflatoxina pela ingestão de leite, queijo, carne e ovos, de pessoas e/ou animais que consumiram produtos contaminados^{2,4,6,10,11,15,17,18,20,23,24,26,31}. Alguns relatos da literatura descrevem, inclusive, níveis elevados de AFM₁ em leite materno de populações que ingeriram alimentos contaminados^{8,22,33}.

¹ Fundação Ezequiel Dias – Núcleo de Micologia e Micotoxinas – Rua Conde Pereira Carneiro, 80 – Gameleira- Belo Horizonte/MG 30510-010 – gui@fined.mg.gov.br

² Universidade Federal de Lavras/MG. Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Departamento de Ciência dos Alimentos. Caixa Postal 37. 37200-00. Lavras/MG

³ Bolsistas do CNPq

Recentemente AFM₁ foi classificada na classe 2 B: provável carcinógeno humano, tendo a Organização Mundial de Saúde recomendado à redução dos níveis de AFM₁ ao mínimo, de modo a minimizar o risco potencial, desde que não há suficiente informação para estabelecer um nível de exposição razoável^{16,25,32}.

Em relação ao queijo, a presença de aflatoxina pode ser fundamentalmente devido a três causas: (1) presença de AFM₁ no leite com o qual queijos são elaborados, como consequência de alimentos contaminados com AFB₁ e ingeridos pelo gado leiteiro; (2) síntese de aflatoxinas por fungos que crescem em queijos e (3) o uso de leite de pó com AFM₁ utilizado na elaboração de queijo¹⁶.

Quimicamente, a presença de AFM₁ no queijo pode ser devido por um lado, ao fato da toxina se ligar à caseína^{13,18}, e por outro lado, que parte do soro do leite permanece preso ao coalho. López *et al.*¹⁶ verificaram em uma pequena produção de queijo, a partir de leite artificialmente contaminado com AFM₁, que 60% da AFM₁ se encontrava no soro e 40% no queijo.

Alguns países têm estabelecido níveis de tolerância máxima para AFM₁ em queijo: 0,20-0,25 ng/g⁹. No Brasil, ainda não foi estabelecida nenhuma regulamentação para AFM₁ em queijo.

Uma vez que a pasteurização do leite ou processamento do queijo não destrói completamente a AFM₁, é prudente que se verifique a incidência de AFM₁ nesse alimento^{1,12,13,16}. Deve-se ressaltar que estes produtos são consumidos largamente por crianças, que são consideradas mais susceptíveis aos efeitos adversos das micotoxinas²⁸.

Visto que no Brasil não existem relatos da incidência de aflatoxina M₁ em queijo tipo prato e tipo parmesão ralado, o objetivo deste trabalho foi verificar os níveis de AFM₁ nesses produtos consumidos em Belo Horizonte/MG.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram analisadas amostras de 9 marcas de queijo tipo prato e 14 de queijo tipo parmesão ralado, coletadas no período de agosto/2000 a fevereiro/2001 pelo Serviço de Vigilância Sanitária/MG, representando cerca da totalidade das marcas oferecidas no comércio de Belo Horizonte/MG. A quantidade coletada variou de 1 a 2 kg, sendo que as amostras foram homogeneizadas em liquidificador por 2 minutos e acondicionadas em freezer a -20 °C até o momento da análise.

Extração e quantificação de AFM₁

O método utilizado para a extração da AFM₁ em queijo foi o descrito por Dragacci *et al.*⁷, onde em 10 g de amostra foi efetuada uma extração com diclorometano seguido de uma partição com n-hexano. A purificação do extrato foi executada em coluna de imunoafinidade (Vicam Inc. USA) como recomendado por Tuinstra *et al.*²⁹, sendo o extrato final dissolvido

em 1000 µL da fase móvel de injeção água:acetonitrila (30:70), agitado no ultra-som por 30 segundos e filtrado através de filtro de 0,45 µm.

A separação e a quantificação da AFM₁ foi conduzida em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Shimadzu com detector de fluorescência (excitação: 366 nm e emissão: 428 nm) e com coluna Shim – pack CLC – ODS C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm, precedida de pré-coluna Shim – pack G – ODS, 5 µm, 4 x 10 mm. A coluna foi eluída isocroticamente com água:isopropanol:acetonitrila (80:12:8) a um fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção foi de 100 µL. Nessas condições o tempo de retenção foi aproximadamente 10,3 minutos. Todos os solventes utilizados foram os recomendados para cromatografia líquida e a água purificada pelo sistema de ultrafiltração (MILLI – Q). Durante toda a análise foi borbulhado gás hélio na fase móvel. Para quantificação da AFM₁ foi utilizada uma curva de calibração como descrito por Prado *et al.*²⁰. A partir do cálculo da área do pico da AFM₁ do extrato da amostra e das soluções padrões foi calculado o teor de AFM₁ na amostra. Todas as análises foram efetuadas em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 ilustra a alta seletividade da limpeza através da utilização de coluna de imunoafinidade, onde não se observa interferentes próximos ao tempo de retenção da AFM₁.

Os valores de recuperação após contaminação com 0,1 e 0,3 ng/g de AFM₁ foram 80,0% e 78,9%, respectivamente. Dragacci *et al.*⁷ encontraram em amostras contaminadas com 0,2 e 0,8 ng/g, recuperações na faixa de 72,0 a 87,6% e 71,4 a 81,0%, respectivamente. Os coeficientes de variação encontrados foram 25,0% e 8,3%, para amostras fortificadas com 0,1 e 0,3 ng/g de AFM₁, respectivamente. A linearidade da curva padrão de calibração (0,03 a 0,6 ng/g de AFM₁) foi superior a 0,99 nas condições experimentais desenvolvidas.

Nas Tabelas 1 e 2 estão apresentados os resultados de AFM₁ obtidos em queijo tipo prato e tipo parmesão ralado. Observa-se que em todas as amostras de queijo tipo prato foi detectada AFM₁ em uma faixa de 0,02 a 0,54 ng/g e média de 0,15 ng/g. Duas das amostras (22%) apresentaram valores de AFM₁ superiores a 0,2 ng/g, que é o nível máximo tolerado em queijo na Holanda^{9,30}. Em queijo tipo parmesão ralado os níveis de AFM₁ variaram de 0,04 a 0,30 ng/g e média entre os valores positivos de 0,14 ng/g. Em 4 amostras (29%) os níveis de AFM₁ foram superiores a 0,2 ng/g. Os valores de coeficientes de variação em todas as repetições foram inferiores a 30%, que é o recomendado para análise de micotoxinas¹⁴.

No Brasil, poucos trabalhos relatam a presença de AFM₁ em queijo. Sylos *et al.*²⁸, não detectaram AFM₁ em 36 amostras (12 marcas) nos tipos Minas, Mussarela e Cheddar. Entretanto, a metodologia utilizada foi à cromatografia em camada delgada com quantificação visual baseada na intensidade de fluorescência, técnica de menor sensibilidade,

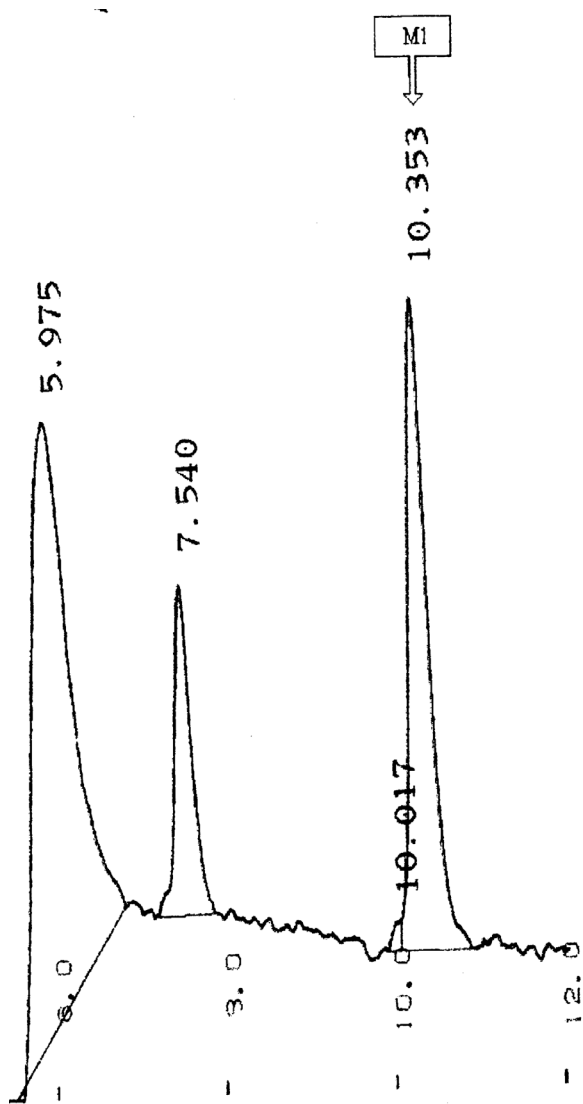


Figura 1. Cromatograma obtido por CLAE em queijo prato naturalmente contaminado (0,18 ng/g).

especificidade e precisão quando comparado a CLAE²⁷. Prado et al.²¹ verificaram a ocorrência de AFM₁ em 75 amostras de queijo Minas (frescal, canastra e padrão) e em 56 (74,7%), a AFM₁ foi detectada em uma faixa de 0,02 a 6,92 ng/g, utilizando coluna de imunoafinidade como etapa de purificação e CLAE como técnica de separação e quantificação. Na Itália, um total de 223 amostras de queijo fabricadas no período de 1991-1994 foram analisadas para AFM₁. A maior parte das amostras (91%) estava na faixa de 5-100 ng/kg e somente 1 (0,5%) apresentou AFM₁ com valor superior a 250 ng/kg¹⁸. Barbieri et al.³ verificaram a ocorrência de AFM₁ em queijo parmesão em Modena, Itália, em 1991, e em somente 18 amostras foi detectado AFM₁ em baixas concentrações: faixa de 0,035 a 0,19 ng/g. Resultados idênticos foram obtidos por Dragacci e Fremy⁵ em um monitoramento na França, no período de 1990 a 1995, em vários tipos de queijo. Somente 3 amostras apre-

Tabela 1. Ocorrência de AFM₁ em queijo tipo prato.

Marca	Níveis de AFM ₁ (ng/g)*	Coefficiente de Variação (%)
A	0,04	19,0
B	0,26	1,3
C	0,07	20,0
D	0,54	0
E	0,18	4,0
F	0,08	25,0
G	0,09	8,0
H	0,02	0
I	0,04	13,0
Média	0,15	

* Média de Triplicata

Limite de Detecção: 0,01 ng/g

Limite de Quantificação: 0,02 ng/g

Tabela 2. Ocorrência de AFM₁ em queijo ralado tipo parmesão.

Marca	Níveis de AFM ₁ (ng/g)*	Coefficiente de Variação (%)
1	0,25	7,0
2	0,26	6,0
3	0,08	9,0
4	0,28	10,0
5	0,05	16,0
6	0,30	10,0
7	0,05	14,0
8	0,04	30,0
9	0,11	13,0
10	0,08	8,0
11	0,15	10,0
12	ND	-
13	0,12	5,0
14	0,10	7,0
Média	0,14	

* Média de triplicata

ND - Não Detectado

Limite de Detecção: 0,01 ng/g

Limite de Quantificação: 0,02 ng/g

sentaram AFM₁ com valor superior a 0,2 ng/g. Da mesma forma, Piva et al.¹⁹ avaliaram em 1984, queijos da França, Alemanha e Dinamarca e detectaram AFM₁ em 19,5%, 26,5% e 53,5% das amostras analisadas, respectivamente, mas somente em 2 amostras da França o valor de AFM₁ excedia 0,25 ng/g. Entretanto, Barrios et al.⁴ no sul da Espanha, em 1995, verificaram a presença de AFM₁ em 16 das 35 amostras (45,7%) em concentrações entre 20 e 200 ng/g.

Apesar da incidência de AFM₁ em queijo tipo prato e ralado tipo parmesão ter sido elevada: presença em 22 das 23 amostras analisadas, os níveis médios registrados, 0,15 ng/g e 0,14 ng/g, respectivamente, estão dentro dos níveis de tole-

rância máxima para AFM₁ em queijo, exigida em outros países: 0,20-0,25 ng/g⁹.

ser considerada um sério problema de saúde pública. Entretanto, mais amostras devem ser analisadas em um período maior de tempo para verificar a tendência observada neste trabalho.

CONCLUSÃO

Os resultados indicam que atualmente, em amostras de queijo tipo prato e ralado tipo parmesão coletadas no comércio de Belo Horizonte/MG, a contaminação com AFM₁ não pode

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e Ministério da Saúde pelo apoio financeiro.

RIALA6/907

Prado, G. *et al.* Aflatoxin M₁ in soft and parmesan cheese by immunoaffinity column and liquid chromatography. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):147-151, 2001.

ABSTRACT. Aflatoxin M₁ was determined in Soft and Parmesan cheese by immunoaffinity column and liquid chromatography. Milk products such as cheese may be contaminated by aflatoxin M₁ (AFM₁) when dairy cattle have consumed feeds contaminated with aflatoxin B₁ (AFB₁). Samples of Soft and Parmesan cheese were collected in Belo Horizonte city, by the Inspection Service of Minas Gerais – Brazil. A purified extract was obtained by extraction with dichloromethane followed by a washing with n-hexane and immunoaffinity column clean-up. The quantification of AFM₁ was done by high performance liquid chromatography (HPLC) using a fluorescence detector. AFM₁ was detected in all soft cheese brands analysed, in concentrations ranging between 0.02 and 0.54 ng/g and mean level of 0.15 ng/g. In grated cheese, Parmesan variety, AFM₁ was detected in 13 of 14 brands analysed (93%), in the range 0.04-0.30 ng/g with mean level of 0.14 ng/g.

KEY WORDS. Cheese; aflatoxin M₁; immunoaffinity column; HPLC.

REFERÊNCIAS

1. Bakirci, I. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey. **Food Control**, 12:47-51, 2001.
2. Baldissera, M.A. *et al.* Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em grãos e rações para consumo animal no sul do Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 12:77-82, 1992.
3. Barbieri, G. *et al.* Aflatoxin M₁ in Parmesan cheese: HPLC determination. **J. Food Sci.**, 59:1313-1331, 1994.
4. Barrios, M.J. *et al.* Occurrence of aflatoxin M₁ in cheeses from the south of Spain. **J. Food Prot.**, 59:898-900, 1996.
5. Dragacci, S.; Fremy, J.M. Application of immunoaffinity column cleanup to aflatoxin M₁ determination and survey in cheese. **J. Food Prot.**, 59:1011-1013, 1996.
6. Dragacci, S.; Fremy, J.M. Contamination du lait par l'aflatoxine M₁. Résultats de quinze années de surveillance. **Sci. Aliments.**, 13:711-722, 1993.
7. Dragacci, S. *et al.* Use of immunoaffinity chromatography as a purification step for the determination of aflatoxin M₁ in cheeses. **Food Addit. Contam.**, 12:59-65, 1995.
8. El-Nezami, H.S. *et al.* Aflatoxin M₁ in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand. **Food Chem. Toxicol.**, 33:173-179, 1995.
9. FAO (Food and Agricultural Organization of The United Nations). **Worldwide regulations for mycotoxins**. 1995. **A compendium**. n.64, 45p. Rome, 1996.
10. Fernandes Oliveira, C.A. *et al.* Immunochemical assessment of aflatoxin M₁ in milk powder consumed by infants in São Paulo, Brazil. **Food Addit. Contam.**, 14:7-10, 1997.
11. Fonseca, H.; Del Nery, H.; Silveira Filho, S. Teor de aflatoxina M₁ no leite de vacas alimentadas com farelo de amendoim tóxico. **O solo**, 66: 33-40, 1974.
12. Galvano, F.; Galofaro, V.; Galvano, G. Occurrence and stability of aflatoxin M₁ in milk and milk products; a worldwide review. **J. Food Prot.**, 59:1079-1090, 1996.
13. Hassanin, N.I. Stability of aflatoxin M₁ during manufacture and storage of yoghurt-cheese and acidified milk. **J. Sci. Food Agric.**, 65:31-34, 1994.
14. Horwitz, W.; Albert, R. The reliability of aflatoxin assays. **Quart. Bull. Assoc. Food and Drug Off. United States**, 46:14-24, 1982.
15. Karaiannoglou, P.; *et al.* Triantafyllou, J. **Milchwissenschaft**, 44:746-748, 1989.
16. López, C. *et al.* Distribution of aflatoxin M₁ in cheese obtained from milk artificially contaminated. **Int J. Food Microbiol.**, 64:211-215, 2001.
17. López-Díaz, T.M. *et al.* Mycotoxins in two Spanish cheese varieties. **Int. J. Food Microbiol.**, 30:391-395, 1996.
18. Pietri, A.; Bertuzzi, T.; Bertuzzi, P.; Piva, G. Aflatoxin M₁ occurrence in samples of Grana Padano cheese. **Food Addit. Contam.**, 14:341-344, 1997.
19. Piva, G.; Pietri, A.; Galazzi, L.; Curto, O. Aflatoxin M₁ in occurrence in dairy products marketed in Italy. **Food Addit. Contam.**, 5:133-139, 1987.
20. Prado, G. *et al.* Ocorrência de aflatoxina M₁ em Belo Horizonte – Minas Gerais/Brasil – agosto/98 a abril/99. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 19:420-423, 1999.
21. Prado, G. *et al.* Aflatoxin M₁ in samples of “Minas” cheese commercialized in the city of Belo Horizonte – Minas Gerais/Brazil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 20:398-400, 2000.

22. Saad, A.M.; Abdelgadir, A.M.; Moss, M.O. Exposure of infants to aflatoxin M₁ from mothers breast milk in Abu Dhabi, UAE. **Food Addit. Contam.**, 12:255-261, 1995.
23. Sabino, M.; Purchio, A.; Zorzetto, M.A.P. Variations in the levels of aflatoxin in cows milk consumed in the city of São Paulo, Brazil. **Food Addit. Contam.**, 6:312-326, 1989.
24. Saitanu, K. Incidence of aflatoxin M₁ in Thai milk products. **J. Food Prot.**, 60:1010-1012, 1997.
25. Smith, J.E. *et al.* Role of mycotoxins in human and animal nutrition and health. **Nat. Toxins**, 3:187-192, 1995.
26. Souza, S.V.C.; Vargas, E.A.; Junqueira, R.G. Eficiência de um *kit* de ELISA na detecção e quantificação de aflatoxina M₁ em leite e investigação da ocorrência no estado de Minas Gerais. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 19:401-405, 1999.
27. Sylos, C.M.; Amaya, D.R. Estudo comparativo de métodos para determinação de aflatoxina M₁. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 56:87-97, 1996.
28. Sylos, C.M.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Carvalho, P.R.N. Occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil. **Food Addit. Contam.**, 13:169-172, 1996.
29. Tuinstra, L.G.M.; Roos, A.H.; Van Trup, J.M.P. Liquid chromatography determination of aflatoxin M₁ in milk powder using immunoaffinity columns for cleanup: interlaboratory study. **J.A.O.C. Int.**, 76:1248-1254, 1993.
30. Van Egmond, H.P. Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. **Food Addit. Contam.**, 6:139-188, 1989.
31. Veldman, A. *et al.* Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. **Anim. Prod.**, 55:163-168, 1992.
32. WHO (World Health Organization). **Mycotoxins**. Geneva: UNEP/WHO, 1979. 127p.(Environmental Health Criteria 11).
33. Zarba, A. *et al.* Aflatoxin M₁ in human breast milk from The Gambia, West Africa, quantified by combined monoclonal antibody immunoaffinity chromatography and HPLC. **Carcinog.**, 13:891-894, 1992.

Recebido em 04/09/2001; Aprovado em 26/03/2002