



**6º Simpósio
de Segurança
Alimentar**

Desvendando Mitos

15 a 18 de maio de 2018

FAURGS • Gramado • RS

OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM MILHO NO BRASIL NOS ANOS DE 2016 E 2017

V.Feddern¹, O.F.V. Vieira², J.C. Vieira², G.J.M.M. de Lima.¹

1 - Embrapa Suínos e Aves – BR 153, km 110 – CEP: 89715-899 – Concórdia – SC – Brasil, Telefone: 55 (49) 3441-0400 – Fax: 55 (49) 3441-0497 – e-mail: vivian.feddern@embrapa.br; gustavo.lima@embrapa.br

2 - CBO Análises Laboratoriais – Av. Arquiteto Clayton Alves Corrêa, 327 – CEP: 13279-071 – Valinhos – SP – Brasil, Telefone: 55 (19) 3790-1500 – e-mail: oneida@labco.com; clovis@labco.com

RESUMO – As micotoxinas, metabólitos secundários produzidos por fungos na produção e armazenamento de grãos, podem causar efeitos tóxicos em humanos, animais e plantas. O milho é um dos ingredientes que compõe a dieta de aves/suínos, além do farelo de soja, totalizando 70% dos custos de produção animal. Em virtude desta importância econômica e também nutricional, foram realizadas 1086 avaliações micotoxicológicas das principais micotoxinas: aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina, zearalenona, deoxinivalenol e toxina T2), em 2016 e 2017, procedentes de diferentes regiões brasileiras. As micotoxinas foram determinadas com kits rápidos ELISA e limites de detecção (LD) para aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina, zearalenona, deoxinivalenol e T2 de, respectivamente, 1 ppb, 0,2 ppm, 2 ppb, 20 ppb, 0,2 ppm e 10 ppb. Não foram detectadas micotoxinas em 43,1% das avaliações. A média das análises (2016/2017) com resultados inferiores ao limite tolerável para as micotoxinas acima citadas foram, respectivamente, 92, 92, 100, 99, 78 e 94%.

ABSTRACT – Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi during production and storage of grains, and may cause toxic effects on humans, animals and plants. Corn is one of the main ingredients that constitute the diet of poultry and swine, together with soybean meal, they account for 70% of animal production costs. Due to this economic and nutritional importance, 1086 mycotoxicological evaluations of the main mycotoxins: aflatoxins, fumonisins, ochratoxin, zearalenone, deoxynivalenol and T2 were carried out in 2016 and 2017, from different Brazilian regions. Mycotoxins were determined by ELISA rapid kits, with detection limit (LD) of 1 ppb, 0.2 ppm, 2 ppb, 20 ppb, 0.2 ppm and 10 ppb for, respectively, aflatoxins, fumonisins, ochratoxin, zearalenone, deoxynivalenol and T2. No mycotoxins were detected in 43.1% of the evaluations. The mean of the analyses (2016/2017) with results below the tolerable limit for the abovementioned mycotoxins were, respectively, 92, 92, 100, 99, 78 and 94%.

PALAVRAS-CHAVE: aflatoxinas; fumonisinas, ocratoxina, zearalenona, tricotecenos.

KEYWORDS: aflatoxin; fumonisin, ochratoxin, zearalenone, trichothecenes.

1. INTRODUÇÃO

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos, durante a produção e armazenamento de grãos, passíveis de serem tóxicos em humanos, animais e plantas (Feddern et al., 2013). Existem mais de 200 micotoxinas produzidas por aproximadamente 120 fungos em diferentes



condições (Belitz et al., 2009) de temperatura e umidade. Aliado a isso, o tempo de armazenagem nos silos também pode favorecer o crescimento de fungos potencialmente toxigênicos (Dors et al., 2011).

É praticamente impossível evitar a contaminação dos alimentos pelas micotoxinas; portanto, elas devem ser rigorosamente monitoradas em alimentos de origem animal e vegetal (Amelin et al., 2013). As aflatoxinas estão entre as mais tóxicas, podem ser transferidas ao leite (Dors et al., 2011) e causar câncer, uma vez que promovem alterações no DNA (Belitz et al., 2009). A aflatoxina B1 e a ocratoxina A (OTA) ocorrem com maior frequência e são de alta toxicidade (Gupta et al., 2017).

A OTA é nefrotóxica, carcinogênica e teratogênica, e pode ser transferida principalmente ao sangue, onde possui meia-vida elevada, além de se acumular no tecido renal, músculos, fígado e tecido adiposo de suínos e outras espécies animais (Belitz et al., 2009). A zearalenona (ZEA) causa distúrbios reprodutivos e síndromes hiperestrogênicas em animais e humanos (Xu et al., 2016).

Os tricotecenos têm sido encontrados mundialmente em diversos grãos, sendo os principais, o deoxinivalenol (DON) e as toxinas T2, produzidos por diversas espécies de fungos do gênero *Fusarium* (Santurio, 2000), os quais têm intoxicado animais que consumiram rações contaminadas no sul do Brasil (Badiale-Furlong, 1992). Os tricotecenos inibem a síntese de proteínas, de DNA e RNA e acarretam efeitos imunossupressores e hemorrágicos (Kiessling, 1986).

O grão em que as fumonisinas são mais encontradas é o milho. A contaminação de milho e produtos à base de milho por fumonisina ocorre em muitos países; rações altamente contaminadas podem causar edema pulmonar em suínos. Concentrações de 330 µg/g de fumonisina B1 foram encontradas em dietas de suínos (Shephard et al., 1996).

Desta forma, o presente trabalho visou quantificar a ocorrência das principais micotoxinas em milho e verificar se apresentam risco à saúde humana e animal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O monitoramento foi realizado pelo laboratório de controle de qualidade de alimentos CBO Análises Laboratoriais, Valinhos, SP. As amostras de milho foram recebidas e armazenadas a -20 °C até a realização de 1086 análises micotoxicológicas quanto às aflatoxinas, tricotecenos – T2 e deoxinivalenol, fumonisina, ocratoxina e zearalenona, distribuídas de acordo com a Figura 1.

O método ELISA detecta e amplifica a reação antígeno-anticorpo pela ligação covalente entre enzima e anticorpo, cuja presença é determinada pela adição de enzima ao substrato. A quantidade de substrato convertido a um dado tempo é indicativo da concentração original do extrato a ser analisado.

Para obter os extratos a partir das amostras de milho, foi utilizado o método indicado pelo fabricante dos kits rápidos (Romer Labs). As amostras foram pesadas (20 g), extraídas com 50 mL de solução (álcool metílico 70%), processadas em liquidificador por 3 minutos. O extrato foi filtrado em papel qualitativo, estando pronto para a aplicação nos kits.

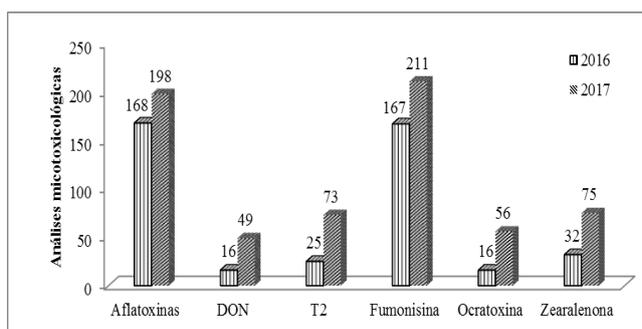


Figura 1 – Análises realizadas quanto ao teor de micotoxinas nos anos de 2016 e 2017.



6º Simpósio de Segurança Alimentar

Desvendando Mitos

15 a 18 de maio de 2018

FAURGS • Gramado • RS

3. RESULTADOS

Os resultados das 1086 análises micotoxicológicas realizadas em milho, durante dois anos, de amostras oriundas de diferentes regiões brasileiras, estão apresentados na Tabela 1. Os limites de detecção (LD) utilizando os kits ELISA para aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina, zearalenona, deoxinivalenol e T2 foram respectivamente, 1 ppb, 0,2 ppm, 2 ppb, 20 ppb, 0,2 ppm e 10 ppb.

Os resultados mostraram que a maioria das amostras (52,4%) estiveram abaixo do LD e 33,9% abaixo do limite máximo tolerável (LMT), de 20 ppb para aflatoxinas em 2016; enquanto que em 2017, similares tendências foram observadas (53,5% abaixo do LD e 44,4% abaixo do LMT).

Para DON, nas 16 amostras analisadas em 2016, todas foram positivas, sendo que 81,3% e 18,7% apresentaram resultados, respectivamente, inferiores e superiores a 1000 ppb, sendo a concentração máxima igual a 1460 ppb. Em 2017, a maioria (75,5%) também apresentou resultados inferiores ao LMT. Comparando-se os dois anos, 78% das análises apresentaram-se abaixo do LMT.

Em relação às toxinas T2, 28% e 61,6% das amostras em 2016 e 2017, respectivamente, não foram detectadas com esta micotoxina. No mesmo período, 60% e 38,3% das amostras, apresentaram, respectivamente, valores inferiores ao limite de 100 ppb; 12% apresentou valores superiores ao LMT em 2016, enquanto que nenhuma amostra superou o LMT, em 2017. Comparados os dois anos, 94% das análises mostraram resultados inferiores ao LMT de 100 ppb.

Quanto à fumonisina, das 167 amostras analisadas, em 41 (24,5%) não houve detecção, sendo que a maioria (65,9%), correspondente a 110 amostras, apresentou valores inferiores ao LMT, de 5000 ppb. Apenas 9,6% das amostras tiveram concentração superior ao LMT. Durante o ano de 2017, a maioria das amostras (69,6%) também ficou abaixo do LMT, enquanto que 7,1% ficou acima deste limite. Comparando os dois anos, a média de resultados abaixo deste limite tolerável foi de 92%.

Para OTA, apenas 3 análises (18,8%) de um total de 16, apresentaram concentrações inferiores ao limite aceitável, de 50 ppb. Nas demais, não houve detecção, em 2016. No ano seguinte, a maioria (95,9%) não foi detectada, enquanto que 7,1% das amostras tiveram abaixo do limite aceitável. Portanto, 100% das análises, para ambos os anos, mostraram resultados inferiores ao limite.

A micotoxina ZEA não foi detectada em 43,8% das amostras em 2016 e 69,3% em 2017. As análises que apresentaram concentração inferior ao limite de 500 ppb no mesmo período, foram respectivamente 56,2% e 29,4%. Não houveram valores acima do limite tolerável em 2016, enquanto que em 2017, apenas uma amostra (1,3%) ficou acima deste limite. Portanto, 99% das análises, comparando os dois anos, tiveram resultados abaixo do limite tolerável.

4. DISCUSSÃO

Quando comparamos nosso total de análises micotoxicológicas com resultados abaixo do LD (0 ppb, Tabela 1), ou seja, 43,1%, ao levantamento realizado por Baldissera et al. (1994) entre os anos de 1987 e 1993, de amostras oriundas também de diversas procedências do Brasil, 46,1% de amostras positivas de um total de 1131 análises realizadas, foram relatadas. Vale ressaltar que as amostras dos autores citados constituíram-se, em sua maioria, de material toxicologicamente suspeito, enquanto os resultados do presente estudo são monitorados para controle de qualidade.

Para frangos de corte, os níveis aceitáveis (não produzem alterações clínicas e de desempenho) de micotoxinas isoladas em dietas animais, compilados de literatura especializada em saúde animal (Leeson e Summers, 2005; Zimmerman et al., 2012) e da legislação brasileira (Brasil, 2011, 2017) são de 20 µg/kg (ppb) para aflatoxinas, 500 ppb para ZEA, 50 ppb para OTA, 5000 ppb para fumonisina, 1000 ppb para DON e 50 ppb para T2 (enquanto que para poedeiras e matrizes o valor é 100 ppb).



6º Simpósio de Segurança Alimentar

Desvendando Mitos

15 a 18 de maio de 2018

FAURGS • Gramado • RS

Tabela 1 – Resultados do monitoramento de micotoxinas em milho no Brasil, em 2016 e 2017.

MILHO*	2016	2017
Aflatoxinas		
ND	88 (0 ppb)	106 (0 ppb)
<20 ppb	57 (1,01 < 2,25 < 9,80 ppb)	88 (1,10 < 2,39 < 14,50 ppb)
20<ppb<1000	23 (26,97 < 61,51 < 127,20 ppb)	4 (27,40 < 49,45 < 78,70 ppb)
≥ 1000ppb	0	0
Total	168 (0 < 9,15 < 127,20 ppb)	198 (0 < 2,06 < 78,70 ppb)
Deoxinivalenol		
ND	0	1 (0 ppb)
≤ 1000 ppb	13 (220,00 < 390,77 < 760,00 ppb)	37 (230,00 < 534,05 < 930,00 ppb) 11 (1010,00 < 1294,55 < 1800,00 ppb)
>1000ppb	3 (1040,00 < 1213,33 < 1460,00 ppb)	
Total	16 (220,00 < 545,00 < 1460,00 ppb)	49 (0 < 693,88 < 1800,00 ppb)
Toxina T2		
ND	7 (0 ppb)	45 (0 ppb)
≤ 100 ppb	15 (11,20 < 25,83 < 68,40 ppb)	28 (10,10 < 17,15 < 53,70 ppb)
>100 ppb	3 (124,60 < 172,67 < 237,20 ppb)	0
Total	25 (0 < 36,22 < 237,20 ppb)	73 (0 < 6,58 < 53,70 ppb)
Fumonisina		
ND	41 (0 ppb)	49 (0 ppb)
≤ 5000 ppb	110 (210,00 < 1792,00 < 4880,00 ppb)	147 (210,00 < 1496,33 < 4910,00 ppb)
> 5000 ppb	16 (5190,00 < 7334,38 < 13880,00 ppb)	15 (5270,00 < 9017,33 < 22490,00 ppb)
Total	167 (0 < 1075,53 < 13880,00 ppb)	211 (0 < 1683,51 < 22490,00 ppb)
Ocratoxina A		
ND	13 (0 ppb)	52 (0 ppb)
≤ 50 ppb	3 (2,10 < 4,38 < 8,85 ppb)	4 (3,00 < 5,23 < 7,61 ppb)
>50 ppb	0	0
Total	16 (0 < 0,82 < 8,85 ppb)	56 (0 < 0,37 < 7,61 ppb)
Zearalenona		
ND	14 (0 ppb)	52 (0 ppb)
≤ 500 ppb	18 (0 < 39,69 < 483,10 ppb)	22 (20,70 < 73,20 < 338, 60 ppb)
>500 ppb	0	1 (857,10 ppb)
Total	32 (0 < 39,69 < 483,10)	75 (0 < 32,90 < 857,10 ppb)

ND = não detectado; * Número de amostras (concentração mínima < média < máxima em ppb).



6º Simpósio de Segurança Alimentar

Desvendando Mitos

15 a 18 de maio de 2018
FAURGS • Gramado • RS

Nossos resultados mostraram que as concentrações de aflatoxinas (AF), que estão entre as mais tóxicas do ponto de vista da saúde humana e animal, foram no máximo 127 ppb, sendo 86% abaixo do LMT de 20 ppb da legislação (Brasil, 2011), mostrando a boa qualidade do milho quanto a estas micotoxinas. Anteriormente, apenas as AF (B1+B2+G1+G2) possuíam legislação. A partir de 01 de janeiro de 2017, nova legislação estabeleceu os seguintes limites máximos tolerados (ppb) para outras micotoxinas em grãos de milho e outros cereais (Brasil, 2017): 20 para OTA, 3000 para DON, 5000 para fumonisina (B1 + B2) e 40 para ZEA. Não há legislação específica para T2.

Em aves, os efeitos primários da aflatoxicose podem ser utilizados como guia para diagnóstico clínico da doença, tais como mudanças no tamanho dos órgãos (fígado, baço e rins) e alterações na coloração e textura (Santurio, 2000). Por exemplo, o fígado de aves com aflatoxicose tem como característica a coloração amarelada e friável, com acentuada infiltração de gordura (Santurio, 2000).

Em relação ao tricoteceno DON, as aves são capazes de tolerar concentrações relativamente altas na dieta e menos em relação à toxina T2. Nos níveis de DON normalmente encontrados em rações contaminadas (0,35 a 8,0 ppm), não houveram problemas com as aves (Santurio, 2000). Em um estudo toxicinético da disponibilidade de DON, T2 e ZEA em frangos de corte, foi observado que após a administração oral destas micotoxinas, em 3,9 min a toxina T2 foi a primeira a ser eliminada do organismo animal, seguido de DON (27,9 min) e ZEA (31,8 min) (Osselaere et al., 2013). O DON é conhecido por causar várias doenças em humanos e animais, tais como êmese, diarreia, anorexia, imunotoxicidade, distúrbios hematológicos, comprometimento do desenvolvimento fetal e reprodução materna; além de deformidades esqueléticas dos fetos em várias espécies animais (Yu et al., 2017).

O suíno é geralmente considerado a espécie mais sensível para a nefrotoxicidade induzida pela OTA e, por isso, a ingestão semanal tolerável provisória para humanos está baseada em estudos de com suínos (Marin et al., 2017). Aves que ingeriram fumonisina B1 na dieta, comparadas às aves controle, tiveram níveis elevados no soro sanguíneo de precursores de esfingosídeos celulares, pois estes são inibidos pelas fumonisinas; para evitar a toxicidade aos pintos, < 75 ppm devem ser ingeridos (Santurio, 2000).

Considerando os resultados obtidos no presente trabalho e as pesquisas realizadas na literatura, é possível afirmar que as quantidades encontradas são difíceis de serem consideradas problemáticas do ponto de vista nutricional, se usadas na ração de animais de produção de alimentos. Por exemplo, certas toxinas (tricotecenos) são mais toleráveis pelos frangos, ao passo que suínos devem receber dietas isentas de outras micotoxinas, pois são mais suscetíveis a doenças.

5. CONCLUSÕES

As análises micotoxicológicas realizadas durante 2016 e 2017 mostraram que 43,1% dos resultados foram negativos. Das amostras positivas, de 78 a 100% estiveram abaixo do limite tolerável, que causaria prejuízo à saúde dos animais ou humana.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amelin, V. G., Karaseva, N. M., & Tret'yakov, A. V. (2013). Chromatographic methods for the determination of mycotoxins in food products. *Journal of Analytical Chemistry*, 68(3), 195–205.
- Badiale-Furlong, E. (1992). *Tricotecenos em trigo: Um estudo de metodologia analítica, incidência, contaminação simultânea por outras micotoxinas e de alguns fatores que influem na produção no campo* (Tese de Doutorado), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.



6º Simpósio de Segurança Alimentar

Desvendando Mitos

15 a 18 de maio de 2018

FAURGS • Gramado • RS

- Baldissera, M. A., Santurio, J. M., Mallmann, C. A., Almeida, C. A. A., Kipper, M., Souza Jr, C. E., Santos, X. C., & Camargo, B. S. (1994). Aflatoxinas, zearalenona e ocratoxina A em alimentos. Resultados de 1987 a 1993. *Anais do I Congresso Latino-Americano de Micotoxicologia e VIII Encontro Nacional de Micotoxinas* (pp. 90–92). Rio de Janeiro, RJ.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry* (4. ed.). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Brasil. (2011). Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. *Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos*.
- Brasil. (2017). Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 138, de 8 de fevereiro de 2017. *Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos*.
- Dors, G. C., Caldas, S. S., Feddern, V., Bemvenuti, R. H., Hackbart, H. C. S., Souza, M. M., Oliveira, M. S., Garda-Bufferon, J., Primel, E. G., & Badiale-Furlong, E. (2011). Aflatoxins: Contamination, analysis and control. In R. G. Guevara-Gonzalez (Ed.), *Aflatoxins - Biochemistry and molecular biology* (1. ed., pp. 415–438). Rijeka, Croatia: InTech.
- Feddern, V., C., G., Tavernari, F. C., Mazzuco, H., Cunha, A., Krabbe, E. L., & Scheuermann, G. N. (2013). Aflatoxins importance on animal nutrition. In M. Razzaghi-Abyaneh (Ed.), *Aflatoxins - Recent advances and future prospects* (1. ed., pp. 171–195). Rijeka, Croatia: InTech.
- Gupta, R. C., Lasher, M. A., Mukherjee, I. R. M., Srivastava, A., & Lall, R. (2017). Aflatoxins, Ochratoxins, and Citrinin. In R. C. Gupta (Ed.), *Reproductive and Developmental Toxicology* (2. ed., pp. 945–962). Cambridge, Massachusetts: Academic Press.
- Kiessling, K. H. (1986). Biochemical mechanism of action of mycotoxins. *Pure & Applied Chemistry*, 58(2), 327–338.
- Leeson, S., & Summers, J. D. (2005). *Commercial Poultry Nutrition* (3. ed.). Guelph, Ontario: Nottingham University Press.
- Marin, D. E., Pistol, G. C., Gras, M. A., Palade, M. L., & Taranu, I. (2017). Comparative effect of ochratoxin A on inflammation and oxidative stress parameters in gut and kidney of piglets. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 89, 224–231.
- Osselaere, A., Devreese, M., Goossens, J., Vandebroucke, V., De Baere, S., De Backer, P., & Croubels, S. (2013). Toxicokinetic study and absolute oral bioavailability of deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenone in broiler chickens. *Food and Chemical Toxicology*, 51(1), 350–355.
- Santurio, J. M. (2000). Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 2(1), 1–12.
- Shephard, G. S., Thiel, P. G., Stockenström, S., & Sydenham, E. W. (1996). Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *Journal of AOAC International*, 79(3), 671–687.
- Xu, J., Wang, H., Zhu, Z., Ji, F., Yin, X., Hong, Q., & Shi, J. (2016). Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* ZDS-1: Exploring the degradation of zearalenone by *Bacillus* spp. *Food Control*, 68, 244–250.
- Yu, M., Chen, L., Peng, Z., Nüssler, A. K., Wu, Q., Liu, L., & Yang, W. (2017). Mechanism of deoxynivalenol effects on the reproductive system and fetus malformation: Current status and future challenges. *Toxicology in Vitro*, 41, 150–158.
- Zimmerman, J. J., Karriker, L. A., Ramirez, A., Schwartz, K. J., & Stevenson, G. W. (2012). *Diseases of swine*. (J. J. Zimmerman, L. A. Karriker, A. Ramirez, K. J. Schwartz, & G. W. Stevenson, Eds.) (10. ed.). Iowa, United States: Wiley-Blackwell.