

PRODUÇÃO DE AFLATOXINA B₁ PELO *Aspergillus flavus* NRRL 6513 EM TRÊS VARIEDADES DE MILHO (*Zea mays* L.)*

Guilherme PRADO**; M. Berenice C.M. VIEIRA**; Jamilton Pereira SANTOS***; Marize Silva DE OLIVEIRA**.

RESUMO

Foi verificada a produção de aflatoxina B₁ pelo Aspergillus flavus NRRL 6513 em três variedades de milho (Zea mays L.), cultivadas no Centro Nacional de Milho e Sorgo em Sete Lagoas, Minas Gerais. As amostras, em triplicata, foram previamente autoclavadas a 121°C por 20 minutos e inoculadas com 1,0ml de uma suspensão salina de esporos (1,0 x 10⁶ esporos/ml). Após incubação por 14 dias a 26±1°C, em atividade de água 0,97, a aflatoxina B₁ foi quantificada utilizando-se de cromatografia em camada delgada e comparação com padrões. Todas as três variedades apresentaram-se susceptíveis à infecção pelo fungo e à produção de aflatoxina B₁.

Palavras-chave: *Aflatoxina B₁; Aspergillus flavus; milho.*

SUMMARY

AFLATOXIN B₁ PRODUCTION BY *Aspergillus flavus* NRRL 6513 IN THREE VARIETIES OF CORN (*Zea mays* L.). It was verified the production of aflatoxin B₁ by *Aspergillus flavus* NRRL 6513 in three varieties of corn (*Zea mays* L.), cultivated at the National Research Center of Corn and Sorghum in Sete Lagoas, Minas Gerais. The samples, in triplicate, were previously autoclaved at 121°C for 20 minutes and inoculated with 1.0ml of a spore saline suspension (1.0 x 10⁶ spores/ml). After incubation of 14 days at 26±1°C, in water activity of 0.97, the aflatoxin B₁ was quantified using thin layer chromatography and visual comparison with standards. All three varieties showed to be equally susceptible to infections by the fungi and to the production of aflatoxin B₁.

Key-words: *Aflatoxin B₁; Aspergillus flavus; corn.*

* Recebido para publicação em 18/05/93

** Fundação Ezequiel Dias - Divisão de Bromatologia e Toxicologia - Serviços de Microbiologia e Química Especializada - Rua Conde Pereira Carneiro, 80 - Belo Horizonte/MG

*** EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo - Cx. Postal 151, Sete Lagoas/MG

1 — Introdução

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos que contaminam as culturas no campo, os grãos durante o armazenamento e também os produtos alimentícios destinados diretamente ao consumo humano, sendo a aflatoxina B₁ a mais tóxica, com atividade carcinogênica, teratogênica e mutagênica (10).

O milho é um importante cereal para a nutrição humana, sendo o Estado de Minas Gerais um dos maiores produtores do Brasil. Publicações referentes à contaminação de milho com aflatoxinas em nosso país são escassas para se ter uma real dimensão do problema (6) (7) (8). Entretanto, estudos referentes à incidência de aflatoxinas em milho, em outros países, revelam ser esta uma questão de saúde pública (2). Conseqüentemente, pesquisas que envolvem novos conhecimentos sobre produção de aflatoxinas em milho são de grande interesse, e devem ter caráter relevante nos laboratórios analíticos de micotoxinas.

O milho, embora seja uma importante fonte de energia, é relativamente pobre em proteína. Além disso, essa proteína é de baixo valor biológico por apresentar reduzidos teores de lisina e triptofano. Entretanto, o Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, da EMBRAPA - Sete Lagoas, obteve recentemente uma variedade de milho branco (BR 451) que apresenta boa produtividade e cerca de 85% mais lisina e triptofano que o milho comum (3). Porém, estudos com essa variedade, referentes à infecção por fungo e contaminação com aflatoxinas não foram executados, o que acarreta uma incerteza aos produtores para sua utilização em escala comercial.

O objetivo deste trabalho foi verificar a produção de aflatoxina B₁ em milho, após inoculação de *Aspergillus flavus* NRRL 6513, nas variedades BR 451 (milho branco) e BR 201 e 106 (milho amarelo), duas das variedades mais plantadas no Estado de Minas Gerais.

2 — Material e métodos

2.1 – Amostragem e preparo da amostra

Utilizaram-se amostras de milho em grão, cultivadas no Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, da EMBRAPA - Minas Gerais das variedades BR 451, 201 e 106, e nas quais não tinham sido detectadas aflatoxinas. Cada uma das variedades foi plantada em quatro áreas de 100m², sendo o espaçamento entre as fileiras de 1m e a distância entre as covas de 20cm. A produção foi da ordem de 7-8kg/área plantada. Foram coletados 2kg de cada variedade por área plantada. As amostras foram reunidas e homogeneizadas obtendo-se 8kg de cada variedade. Alíquotas de 1kg, em triplicata, foram então autoclavadas a 121°C por 20 minutos para destruição da microbiota natural.

2.2 – Microrganismos

Foi utilizada cepa de *Aspergillus flavus* NRRL 6513, forte produtora de aflatoxina B₁, do Northern Regional Research Laboratory. Com o objetivo de assegurar a toxigenicidade fúngica, a cepa foi mantida em meio de ágar batata (AB) coberto por camada de vaselina estéril e em meio de arroz a 26±1°C. Para a obtenção de inóculos com o fungo, foi feito, assepticamente, o repique para tubo inclinado de AB, o qual foi incubado em estufa B.O.D a 26±1°C durante 10 dias. Após este período de tempo, os esporos foram ressuspensos em 5ml de salina a 0,9%, sendo a concentração, em esporos/ml, determinada através de contagem

em câmara de Neubauer. A suspensão de esporos assim obtida foi empregada para a inoculação das amostras.

2.3 – Metodologia

2.3.1 - De inoculação da cepa de *Aspergillus flavus* NRRL 6513

Em capela de fluxo laminar, procedeu-se à adição de 1,0ml da suspensão salina de esporos (2.2), de concentração $1,0 \times 10^6$ esporos/ml, a 10g de milho em grão, preparado de acordo com o item 2.1. Em seguida, as amostras foram colocadas em câmaras equilibradas a 0,97 de atividade de água (5) e incubadas por 14 dias a $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.3.2 - De determinação de aflatoxina B₁

A aflatoxina B₁ foi quantificada pela técnica descrita por VALENTE SOARES (9) e a confirmação foi efetuada pelo método de PRZYBYLSKI (4).

3 — Resultados e discussão

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da determinação de aflatoxina B₁ nas amostras inoculadas com o *Aspergillus flavus* NRRL 6513.

TABELA 1. Teores de aflatoxina B₁ em amostras autoclavadas de milho em grão inoculadas com *Aspergillus flavus* NRRL 6513.

| Variedade | Aflatoxina B ₁ (µg/kg) ¹ |
|-----------|------------------------------------------------|
| BR 106 | 16300 |
| BR 201 | 19500 |
| BR 451 | 19500 |

1 Média de triplicata

2 Atividade de água: 0,97

Os elevados teores encontrados mostram que o milho, quando presente fungo toxigênico em condições ideais de temperatura e atividade de água, é um excelente substrato para a produção de aflatoxinas, sendo pois motivo real de preocupação das autoridades ligadas à saúde pública. Salienta-se que os valores de aflatoxinas observados foram superiores ao permitido pela legislação brasileira, que fixa em $30\mu\text{g/kg}$ (B₁ + G₁) a tolerância máxima de aflatoxinas em alimentos destinados ao consumo humano (1).

Pode-se observar também que as três variedades de milho mostraram-se igualmente susceptíveis à contaminação por fungo e à produção de aflatoxina B₁, não apresentando variações significativas entre as variedades.

Esses resultados estão coerentes com a contaminação por fungos encontrados por PRADO em 1991 (dados não publicados), quando foi efetuada a contagem de bolores e leveduras e a análise de aflatoxinas em amostras de milho armazenadas por pequenos produtores da região do Alto Paranaíba, MG. Naquela oportunidade, foram analisadas 18

amostras de milho branco (BR 451) e 12 amostras de milho amarelo de diversas variedades, empalhadas e não empalhadas. O nível de contaminação de bolores e leveduras, nos dois tipos de milho, branco e amarelo, era da mesma ordem de grandeza: 10^5 - 10^6 UFC/g. Não foram observadas aflatoxinas em nenhuma das amostras. A não produção de aflatoxinas pode ser explicada pela ausência de fungos toxigênicos e/ou falta de condições ideais (temperatura, atividade de água) para a biossíntese de aflatoxinas pelo fungo.

4 — Conclusão

A nova variedade BR 451 (milho branco) é igualmente susceptível à infecção por fungo e produção de aflatoxina, quando comparada às variedades BR 106 e BR 201 (milho amarelo).

Os resultados do presente estudo sugerem que na presença de uma cepa toxigênica a contaminação por aflatoxinas ocorrerá independente da variedade de milho infectado.

Como no Brasil são poucas as pesquisas referentes à resistência de variedades de milho e outros cereais à invasão fúngica e/ou à produção de micotoxinas, seria interessante que outros trabalhos envolvendo novas variedades e diferentes cepas de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, produtoras de aflatoxinas, sejam desenvolvidos para um maior conhecimento e esclarecimento desse assunto.

5 — Referências bibliográficas

- (1) BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução nº 34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 19 jan. 1977. Seção I, pt. I, p.710. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos.
- (2) JELINEK, C.F.; POHLAND, A.E. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds - An update. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Champaign, v.72, n.2, p.223-230, 1989.
- (3) MOREIRA, H.A.; MONTEIRO, M.A.R.; SACRAMENTO, A.J.R. et al. Desempenho de leitões da raça Piau alimentados com o milho BR 451. *Pesq. And.*, Sete Lagoas, n.8, dezembro/91, 3p.
- (4) PRZYBYLSKI, W. Formation of aflatoxin derivatives on thin layer chromatographic plates. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Champaign, v.58, n.1, p.163-4, 1975.
- (5) ROCKLAND, L.B. Saturated salt solutions for static control of relative humidity between 5° and 40°C. *Anal. Chem.*, Washington, v.32, p.1375-6, 1960.
- (6) SABINO, M.; PRADO, G.; COLEN, G. Ocorrência de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em milho de Minas Gerais. Parte 1. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, v.46, n.1/2, p.65-71, 1986.
- (7) SABINO, M.; PRADO, G.; INOMATA, E.I. et al. Natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in maize in Brazil. Part 2. *Food Add. Contam.*, London, v.6, n.3, 327-31, 1989.

- (8) SCUSSEL, V.M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; DA SILVA, W.J. Incidência de aflatoxinas em milho (*Zea mays* L.) e em seus produtos derivados, comercializados na região de Campinas, São Paulo. *Ciênc. Tecnol. Alimen.*, Campinas, v.6, n.1, p.75-85, 1986.
- (9) VALENTE SOARES, Lúcia Maria. *Micotoxinas: um método para análise simultânea e incidência em alimentos comercializados na região de Campinas*. Tese-Doutorado. UNICAMP/Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Campinas, 1987. 129p.
- (10) WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Mycotoxins*. Geneva: UNEP/WHO, 1979. 127p. (Environmental Health Criteria 11).

Agradecimentos

Os autores agradecem ao **Dr. Benedito Correa** do instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pela cessão da cepa de *Aspergillus flavus* NRRL 6513 e pelas sugestões apresentadas durante o trabalho.