

Teores de aflatoxinas totais em milho armazenado em paióis da região Central de Minas Gerais

Prisciula Ferreira¹, Valéria A. V. Queiroz², Gilberto L. de O. Alves³, Josilainne S. C. Saraiva⁴, Renata R. P. Conceição⁴, Simone M. Mendes², Rodrigo V. Costa², Lauro J. Guimarães² e Paulo E. A. Ribeiro²

¹UNIFENAS/Bolsista CNPq/ITI-A ²Pesquisador/Embrapa Milho e Sorgo, C.P. 151, Sete Lagoas, MG, CEP 35701-970, ³UNIFEMM/Bolsista BIC-Fapemig ⁴UNIFEMM/Bolsista PIBIC-CNPq. E-mails: pris71@hotmail.com, queiroz@cnpms.embrapa.br, lulaalves@yahoo.com.br, josii4p@hotmail.com, renatapontes@hotmail.com, simone@cnpms.embrapa.br, veras@cnpms.embrapa.br, lauro@cnpms.embrapa.br, pauloedu@cnpms.embrapa.br.

Palavras-chave: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, micotoxina, *Zea mays*

O milho (*Zea mays*) tem sido amplamente cultivado em várias regiões do mundo em função de diversos fatores, dentre eles a utilização na alimentação humana e animal e como matéria-prima para a fabricação de diversos produtos. No ranking dos maiores produtores de milho, o Brasil posiciona-se em terceiro lugar, precedendo a primeira posição aos Estados Unidos e a segunda à China (DUARTE et al., 2009).

As diversas condições climáticas brasileiras, em especial a tropical, juntamente com técnicas de manuseio inadequadas, propiciam a contaminação de diversos cereais por alguns fungos toxigênicos. O milho possui uma vulnerabilidade a gêneros fúngicos produtores de metabólitos secundários tóxicos denominados micotoxinas, dentre os quais os mais habituais são *Fusarium* (micotoxinas fumonisinas, deoxinivalenol, toxina T-2 e zearalenona), *Aspergillus* (micotoxinas aflatoxinas e ocratoxina) e *Penicillium* (micotoxina ocratoxina) (KAWASHIMA; SOARES, 2006).

Existem várias espécies de *Aspergillus* capazes de produzir metabólitos tóxicos, porém destacam-se *A. flavus* e *A. parasiticus* que produzem as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, grupo identificado como grandes contaminantes naturais de produtos agrícolas. As aflatoxinas podem ser produzidas no milho ainda no campo ou durante o armazenamento (FREIRE et al., 2007). Estas são as micotoxinas que podem causar os maiores danos aos seres humanos e animais pela sua alta toxidez e ampla ocorrência, possuindo propriedades carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas e imunossupressoras. Dentre o grupo das aflatoxinas, ressalta-se que a AFB1 é a mais perigosa devido à sua alta toxicidade e poder carcinogênico (DILKIN et al., 2000; CREPPY, 2002).

As aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na legislação brasileira. O limite estabelecido pelo Ministério da Saúde em alimentos de consumo humano é de 30 µg kg⁻¹ de aflatoxinas B1 + aflatoxinas B2 e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelece o limite de 20 µg/kg de aflatoxinas totais para matérias-primas alimentares e rações (CALDAS et al., 2002).

Análises de aflatoxinas realizadas no Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC) da Universidade Federal de Santa Maria-RS, entre os anos de 1986 e janeiro de 2000, demonstraram que em 15.600 amostras de milho destinados principalmente ao consumo animal, 41,9% estavam contaminadas por aflatoxinas (SANTURIO, 2000). Estes números



justificam a grande preocupação atual com relação à elevada contaminação por micotoxinas no milho produzido no Brasil, uma vez que esse é o principal cereal destinado à produção de rações para alimentação de suínos e aves.

Considerando a periculosidade para a saúde humana e animal objetivou-se avaliar a incidência de aflatoxinas em milho empalhado, armazenado por agricultores familiares de propriedades localizadas em municípios da região Central de Minas Gerais.

Materiais e Métodos

Contando com o apoio de técnicos da Emater-MG (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais) foram selecionados três municípios da região Central de Minas Gerais para escolha dos produtores familiares.

Foi usado como critério para seleção dos agricultores a disponibilidade de apoio à pesquisa nos meses de maio, julho, setembro e novembro do ano de 2009 (período em que foram realizadas as coletas), produtores que armazenavam o milho na forma empalhada e os que se enquadravam na classificação de agricultores familiares (Tabela 1).

Tabela 1 – Produtor, local de realização das coletas, área plantada, data de plantio e de colheita e tipo de armazenamento utilizado pelos produtores

Produtor	Local	Área Plantada	Data do Plantio	Data da Colheita	Tipo de Armazenamento
1	Esmeraldas	1,5 há	30/11/2008	30/05/2009	Tela/Madeira/Alvenaria
2	Esmeraldas	1 há	30/10/2008	30/04/2009	Alvenaria
3	Funilândia	ni*	ni*	ni*	Alvenaria/Madeira
4	Funilândia	3 há	30/10/2008	15/06/2009	Madeira
5	Funilândia	3 há	30/10/2008	30/05/2009	Alvenaria
6	Pedro Leopoldo	1 há	15/11/2008	15/06/2009	Alvenaria/Madeira
7	Pedro Leopoldo	ni*	15/10/2008	30/05/2009	Lona
8	Pedro Leopoldo	0,5 há	10/10/2008	30/03/2009	Alvenaria
9	Pedro Leopoldo	3mil m ²	10/10/2008	30/03/2009	Alvenaria
10	Sete Lagoas	ni*	ni*	ni*	Paiol Balaio de Milho**

*ni = não identificado

** tipo de paiol desenvolvido pela Embrapa Milho e Sorgo em parceria com a Emater-MG.

As amostras foram coletadas a cada intervalo de dois meses em paióis de nove propriedades rurais que praticam a agricultura familiar nos municípios mineiros de Esmeraldas, Pedro Leopoldo e Funilândia, além do paiol Balaio de Milho localizado na Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas-MG. A coleta ocorreu em 2009 nos meses de junho (T1), agosto (T2), outubro (T3) e dezembro (T4), seguindo metodologia abaixo descrita.

As amostras foram retiradas ao acaso até a quantidade de um saco de espigas (aproximadamente 150) no centro e nos quatro cantos do paiol e procedeu-se a separação e a contagem das espigas mal e bem-empalhadas em local limpo: (1) Espigas bem-empalhadas (BE) foram consideradas aquelas cujas palhas protegiam muito bem os grãos, estendendo-se



de 2 a 3 cm além da ponta do sabugo; (2) Espigas mal-empalhadas (ME) foram consideradas aquelas cujas palhas não cobriam totalmente a ponta do sabugo, expondo-se os grãos. Nessa categoria incluíram-se também as espigas já despalhadas. Após a contagem, fez-se o cálculo da percentagem de espigas mal e bem-empalhadas. Em seguida, retirou-se, ao acaso, 10 espigas de cada tipo (BE e ME), debulhou-se e acondicionou-se, separadamente, os grãos de cada categoria de espigas em sacolas plásticas.

Com a finalidade de compor uma amostra representativa do paiol seguiu-se a proporção (%) das espigas BE e ME do saco de espigas coletado no paiol e o peso dos grãos das 10 espigas de cada tipo (BE e ME) encontrado no mesmo. Para se calcular a quantidade proporcional de amostras mal-empalhadas que deveriam ser misturadas às bem-empalhadas utilizou-se a equação abaixo:

$$PPME(g) = \frac{PmME \times \%ME}{(PmME \times \%ME) + (PmBE \times \%BE)} \times 1000$$

$$PPBE(g) = 1000 - PPME$$

Onde: PPME = peso (g) proporcional de grãos originários de espigas mal-empalhadas (ME) a misturar na composição de uma amostra de 1000 g; % ME = percentagem de espigas mal-empalhadas do saco de espigas coletado no paiol; PmME e PmBE = peso médio dos grãos das 10 espigas ME e BE, respectivamente; PPBE = peso (g) proporcional de grãos originários de espigas bem-empalhadas (BE) a misturar na composição de uma amostra de 1000g. Após a homogeneização da amostra de 1000 g, retirou-se 3 subamostras de 100 gramas que foram usadas para a análise de aflatoxinas totais.

Com a finalidade de homogeneizar o teor de água das amostras, os grãos foram previamente secos em estufa a 65°C por 96 horas. Em seguida foram moídos em moinho marca Trapp – modelo TRF 90 – e armazenados a -18 °C até o dia da análise.

Os teores de aflatoxinas totais nas amostras foi determinado em fluorímetro marca VICAN de acordo com os procedimentos descritos nos manuais VICAN, utilizando colunas de imunoafinidade AflaTest.

Os resultados foram avaliados por análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Os resultados da análise de variância (ANOVA) e dos teores de aflatoxinas totais em milho em função do local (propriedades familiares) e da época de coleta das amostras encontram-se nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Observa-se que houve interação significativa entre os locais e época de coleta ao nível de 5% de probabilidade; assim, as médias dos dados foram comparadas por meio das interações coleta x local e local x coleta .



Tabela 2 – ANOVA dos teores de aflatoxinas totais em milho em função do local (propriedades familiares) e da época de coleta das amostras

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.
Total	79	126.7842			
Total de Redução	39	126.7710	3.250538	9850.12	0.0000
Coleta	3	8.225215	2.741738	8308.30	0.0000*
Local	9	27.39135	3.043483	9222.68	0.0000*
Coleta*Local	27	91.15444	3.376090	*****	0.0000*
Resíduo	40	0.1320000E-01	0.3300000E-03		

* Significativo em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 3- Teores de aflatoxinas totais ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em milho de dez propriedades familiares da região Central de Minas Gerais em quatro épocas de coleta de amostra

Propriedades	Aflatoxinas Totais ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
	Coleta							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0.91	Ab	nd	Ba	nd	Bb	nd	Ba
2	nd	Bc	nd	Ba	7.85	Aa	nd	Ba
3	nd	Ac	nd	Aa	nd	Ab	nd	Aa
4	nd	Aa	nd	Ba	nd	Bb	nd	Ba
5	nd	Ac	nd	Aa	nd	Ab	nd	Aa
6	nd	Ac	nd	Aa	nd	Ab	nd	Aa
7	nd	Ac	nd	Aa	nd	Ab	nd	Aa
8	nd	Ac	nd	Aa	nd	Ab	nd	Aa
9	nd	Ac	nd	Aa	nd	Ab	nd	Aa
10	nd	Ac	nd	Aa	nd	Ab	nd	Aa

Valores seguidos da mesma letra maiúscula na linha ou minúscula na coluna não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.
nd = não detectado

A metodologia utilizada foi capaz de detectar presença de aflatoxinas totais em apenas duas das 40 amostras de milho coletadas. É possível que, nas demais amostras, os níveis desta micotoxina estivessem abaixo do limite de detecção do aparelho que é de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Analisando-se cada propriedade ao longo do período de armazenamento (cerca de 8 meses), observa-se que o milho do produtor 1 apresentou contaminação com aflatoxinas totais apenas na primeira coleta, com valor de $0,91 \mu\text{g kg}^{-1}$. No caso do produtor 2 foi detectada presença destas micotoxinas em nível de $7,85 \mu\text{g kg}^{-1}$ nas amostras da terceira coleta e não nas demais. As amostras dos produtores 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 não apresentam resultados para aflatoxinas totais em nenhuma coleta.



Analisando-se cada coleta observa-se que a primeira apresenta teores de aflatoxinas totais somente em amostra da propriedade 1 ($0,91 \mu\text{g kg}^{-1}$) e a terceira apenas para o produtor 2 ($7,85 \mu\text{g kg}^{-1}$). As amostras provenientes das coletas 2 e 4 não apresentam teores de aflatoxina para nenhum produtor. A presença de aflatoxinas nestas amostras pode ter ocorrido por contaminação do milho ainda no campo ou na pós-colheita devido às más condições de armazenamento. Entretanto, o fato de não ter sido detectada presença dessas micotoxinas em nenhuma amostra das coletas 2 e 4 pode ser atribuído à dificuldade de se obter uma amostragem homogênea nesse tipo de armazenamento (espigas empalhadas). A contaminação, possivelmente, pode ter ficado restrita a apenas algumas espigas, sem disseminação para outras; assim, a coleta aleatória de espigas diferentes ao longo do armazenamento pode ter favorecido a detecção de aflatoxinas em determinadas coletas e não em outras.

Verificou-se que os teores de aflatoxinas totais nas amostras de milho analisadas no presente trabalho encontravam-se abaixo do limite estabelecido pelo Ministério da Saúde para alimentos para o consumo humano ($30 \mu\text{g kg}^{-1}$) e inferiores ao limite estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$). Corroborando com estes resultados, Amaral et al. (2006) também observaram baixa ocorrência de aflatoxinas nos produtos à base de milho analisados em Maringá e Marialva, no estado do Paraná. Entretanto, estes autores concluíram que, devido ao elevado consumo de produtos à base de milho na região Sul do país, a Ingestão Diária Provável Média (IDPM) de AFB1 estava acima da Ingestão Diária Tolerável (IDT), indicando risco para esta população. Kawashima e Soares (2006), em análises de amostras de produtos de milho coletados no período de 1999 a 2001 em Recife-PE, verificaram que apenas cinco amostras apresentaram-se positivas para aflatoxinas B1 e B2. Destas amostras, duas ultrapassaram o limite de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$, permitido pela legislação brasileira para a somatória das aflatoxinas.

Em contrapartida, Caldas et al. (2002) relataram que no período de 1998 a 2000 foram detectadas aflatoxinas em 60 amostras de amendoim e derivados, castanha-do-pará, milho de pipoca e milho em grão, correspondendo a 26,4% das 227 amostras analisadas. Segundo estes autores, milho em grão foi o produto com maior incidência de contaminação, correspondendo a 60% das amostras analisadas, e concluíram que o milho deve ser alvo da Vigilância Sanitária, pois pode apresentar riscos à saúde humana e animal.

Conclusão

Foi detectada presença de aflatoxinas totais em apenas duas das 40 amostras de milho coletadas em paióis de agricultores familiares da região Central de Minas Gerais. Os teores destas micotoxinas encontravam-se abaixo dos limites estabelecidos tanto pelo Ministério da Saúde para alimentos para o consumo humano quanto pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para matérias-primas alimentares e rações, não oferecendo, desta forma, risco à saúde humana ou animal.

Agradecimentos



À Embrapa pela oportunidade de estágio, à Fapemig e ao CNPq pela concessão das bolsas de iniciação científica, à Emater-MG pelo apoio técnico e aos produtores familiares da região Central de Minas Gerais pelo apoio e amostras cedidas.

Referências

AMARAL, K. A. S.; NASCIMENTO, G. B.; SEKIYAMA, B. L.; JANEIRO, V.; MACHINSKI JUNIOR, M. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 336-342, 2006.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.

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

DILKIN, P.; MALLMANN, C. A.; SANTURIO, J. M.; HICKMANN, J. L. Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de alfa toxinas em híbridos de milho. **Ciência Rural**, Santa Rural, v. 30, n. 1, p. 137-141, 2000.

DUARTE, R. P.; JULIATTI, F. C.; LUCAS, B. V.; FREITAS, P. T. Comportamento de diferentes genótipos de milho com aplicação foliar de fungicida quanto a incidência de fungos causadores de grãos ardidos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 4, p. 112-122, 2009.

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. **Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 48 p.(Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 110).

KAWASHIMA, L. M.; SOARES, L. M. V. Incidência de fumonisina B₁, aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 516-521, 2006.

SANTURIO, J. M. Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2000000100001&lng=en&nrm=isso>. Acesso em: 07 jun. 2010.

Apoio: FAPEMIG

