

## Teores de ocratoxinas em milho armazenado com palha na região Central de Minas Gerais

Renata R. P. da Conceição<sup>1</sup>, Valéria A. V. Queiroz<sup>2</sup>, Josilaine S. C. Saraiva<sup>1</sup>, Gilberto L. de O. Alves<sup>3</sup>, Prisciula Ferreira<sup>1</sup>, Simone M. Mendes<sup>2</sup> e Rodrigo V. Costa<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Bolsistas CNPq-PIBIC/ Embrapa Milho e Sorgo, Cx. Postal 151, renataponts@yahoo.com.br, josii4p@hotmail.com, pris71@hotmail.com; <sup>2</sup>Pesquisadores Embrapa Milho e Sorgo, valeria@cnpms.embrapa.br, simone@cnpms.embrapa.br, veras@cnpms.embrapa.br; <sup>3</sup>Bolsista FAPEMIG/UNIFEMM/Embrapa Milho e Sorgo, lulaalves@yahoo.com.br

**Palavras-chave:** *Zea mays*, *Aspergillus alutaceus*, OchraTest

### Introdução

O milho (*Zea mays* L.) está entre os cereais mais importantes do mundo e constitui a base da alimentação animal e de muitos povos. Para suprir uma demanda gerada pelo crescimento da população e pelo consumo de fontes de energias renováveis há uma forte demanda para aumento da produção do milho (NERI et al., 2005).

O Brasil é um dos líderes na produção de alimentos agrícolas, porém possui também condições ambientais excelentes para o desenvolvimento de fungos (FREIRE et al., 2007). O milho é um dos cereais mais vulneráveis ao desenvolvimento de fungos toxigênicos, responsáveis pela síntese de metabólitos secundários denominados micotoxinas. O crescimento fúngico e a contaminação dos alimentos com essas toxinas dependem de fatores como práticas agrícolas, colheita, pós-colheita, transporte, processamento e armazenamento do produto (KAWASHIMA et al., 2006).

No milho são encontradas micotoxinas originadas, principalmente, pelas espécies de fungos dos gêneros *Fusarium* (fumonisinas, deoxinivalenol, toxina T-2 e zearalenona), *Aspergillus* (aflatoxinas e ocratoxina) e *Penicillium* (ocratoxina). O gênero *Fusarium*, de acordo com relatos, é predominante no Brasil, seguido de *Penicillium* e *Aspergillus*. Vários estudos realizados no Brasil e em outros países apontam um índice considerável de amostras de milho e de produtos derivados contaminados por micotoxinas (KAWASHIMA et al., 2006).

Devido à elevada toxicidade, a exposição do homem ao consumo de alimentos que contenham micotoxinas trata-se de questão de saúde pública. Por isto, há uma preocupação quanto à presença de micotoxinas nos alimentos e os países importadores estão elaborando leis mais rígidas quanto aos níveis máximos permitidos dessas substâncias. Estudos têm comprovado que os níveis de contaminação por micotoxinas em produtos brasileiros estão superiores ao permitido pela legislação, sendo prejudicial também à exportação dos mesmos. No entanto, há uma dificuldade quanto à implementação das leis existentes para controle de micotoxinas no país (FREIRE et al., 2007).

Das sete ocratoxinas existentes, a ocratoxina A é o composto mais tóxico deste grupo. É principalmente produzida pelo *Aspergillus alutaceus* (*Aspergillus ochraceus*), embora também a produzam *Aspergillus melleus*, *Aspergillus sulphureus*, *Penicillium viridicatum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium commune*, *Penicillium purpurecens*, *Penicillium palitans*, *Penicillium verrucosum*, entre outros. A ocratoxina A é predominantemente produzida pelo



*Penicillium viridicatum* em climas frios e *Aspergillus alutaceus* em climas quentes (KAWASHIMA et al., 2006).

A ocratoxina A normalmente é encontrada na pós-colheita do milho, podendo ser encontrada também na pré-colheita e na colheita. Os grãos colhidos no campo sem a toxina, quando armazenados com umidade abaixo de 15%, podem ser preservados da contaminação (MOLIN, 1999).

O Brasil não possui uma legislação específica para os níveis máximos de ocratoxina A nos produtos, sendo que a União Europeia estabelece o nível máximo permitido de Ocratoxina nos cereais de 5µg kg<sup>-1</sup> (FAO, 2004).

Várias doenças encontram-se associadas a esta toxina, como a nefropatia, que ocorreu em todos os animais estudados até o momento que ingeriram produtos contaminados com essa micotoxina. Além disso, a ocratoxina comporta-se como hepatóxica, cancerígena, teratogênica e imuno-supressora (FREIRE et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de ocratoxinas totais 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 ha	30/11/2008	30/05/2009	Tela/Madeira/Alvenaria
2	Esmeraldas	1 ha	30/10/2008	30/04/2009	Alvenaria
3	Funilândia	ni*	ni*	ni*	Alvenaria/Madeira
4	Funilândia	3 ha	30/10/2008	15/06/2009	Madeira
5	Funilândia	3 ha	30/10/2008	30/05/2009	Alvenaria
6	Pedro Leopoldo	1 ha	15/11/2008	15/06/2009	Alvenaria/Madeira
7	Pedro Leopoldo	ni*	15/10/2008	30/05/2009	Lona
8	Pedro Leopoldo	0,5 ha	10/10/2008	30/03/2009	Alvenaria
9	Pedro Leopoldo	0,3 ha	10/10/2008	30/03/2009	Alvenaria
10	Sete Lagoas	ni*	ni*	ni*	Paioi Balaio de Milho**

\*ni = não identificado

\*\* tipo de paioi 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 de 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 porcentagem 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 = porcentagem 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 zearalenona.

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 ocratoxinas totais foram determinados em fluorímetro marca VICAN, de acordo com os procedimentos descritos nos manuais VICAN, utilizando colunas de imunoafinidade OchraTest para purificação da amostra.

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 ocratoxinas 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 ocratoxinas 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.
<b>Total</b>	79	34,31989			
<b>Total de Redução</b>	39	33,25664	0,8527343	32,08	0,0000
<b>Coleta</b>	3	2,262214	0,7540712	28,37	0,0000*
<b>Local</b>	9	7,331201	0,8145779	30,64	0,0000*
<b>Coleta x Local</b>	27	23,66322	0,8764157	32,97	0,0000*
<b>Resíduo</b>	40	1,063250	0,2658125E-01		

\* Significativo em nível de 5% de probabilidade,

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

Propriedade	Ocratoxinas Totais ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )							
	Coleta							
	Junho (1)		Agosto (2)		Outubro (3)		Dezembro (4)	
<b>1</b>	1,80	Aa	0,00	Bb	0,00	Ba	0,29	Ba
<b>2</b>	0,00	Ab	0,00	Ab	0,00	Aa	0,00	Aa
<b>3</b>	0,00	Ab	0,00	Ab	0,00	Aa	0,00	Aa
<b>4</b>	0,00	Ab	0,00	Ab	0,00	Aa	0,00	Aa
<b>5</b>	0,00	Ab	0,00	Ab	0,00	Aa	0,00	Aa
<b>6</b>	0,00	Bb	3,75	Aa	0,00	Ba	0,00	Ba
<b>7</b>	0,00	Ab	0,00	Ab	0,00	Aa	0,00	Aa
<b>8</b>	0,00	Ab	0,00	Ab	0,00	Aa	0,00	Aa
<b>9</b>	0,00	Ab	0,00	Ab	0,00	Aa	0,00	Aa
<b>10</b>	0,00	Bb	0,50	Ab	0,00	Ba	0,00	Ba

Valores seguidos de mesma letra maiúscula na coluna ou minúscula na linha não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey,



Verificou-se que, para a maioria dos produtores (2, 3, 4, 5, 7, 8, e 9), não foi detectada presença de ocratoxina nas amostras de milho analisadas. No caso do produtor 1 foi encontrada contaminação na 1ª coleta com valor de  $1,80 \mu\text{g kg}^{-1}$  e na 4ª com valor de  $0,29 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Nas amostras coletadas nos paióis dos produtores 6 e 10 foi observada presença dessa micotoxina nas amostras da 2ª coleta com teores de  $3,75$  e  $0,50 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. Assim, de um modo geral, não foi observado aumento de ocratoxina ao longo do período de armazenamento do milho nas propriedades avaliadas.

Entre os diferentes produtores, notou-se pouca diferença no que tange aos teores de ocratoxinas em cada coleta realizada. A coleta 3 revelou 2 produtores com amostras contaminadas (6 e 10) e as coletas 1 e 4 apenas um em cada. No entanto, de acordo com a legislação da União Europeia, os teores de ocratoxina detectados encontravam-se abaixo do limite máximo permitido, que é de  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  para cereais (FAO, 2004).

Corroborando com os resultados desse trabalho, Sekiyama et al. (2005) constataram uma baixa contaminação por ocratoxina A em produtos derivados do milho ao analisarem 121 amostras coletadas de 2002 a 2003 pela Vigilância Sanitária Municipal em Maringá-PR. Kawashima (2004) também relatou que, das 74 amostras de produtos à base de milho encontradas no comércio de Recife-PE nos anos de 1999 a 2001, a ocratoxina A não foi detectada em nenhuma delas. Assim, nota-se que a ocratoxina A não é uma micotoxina que predomina no milho e seus derivados, já que apresenta baixo índice de contaminação nesses produtos.

## Conclusão

Foi detectada presença de ocratoxina em apenas quatro das 40 amostras analisadas. Os teores encontravam-se abaixo do limite estabelecido, não oferecendo, portanto, riscos à saúde do homem e dos animais.

## 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

FAO. **Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003**. Roma, 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.HTM>>. Acesso em: 28 maio 2010.

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). Disponível em: <[http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Dc\\_110.pdf](http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Dc_110.pdf)>. Acesso em: 19 maio 2010.



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.

KAWASHIMA, L. M. **Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil**. 2004. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. Disponível em: <[http://www.flavorfood.com.br/artigos/perigos\\_quimicos/Contaminantes%20formados%20durante%20o%20processamento/Micotoxinas%20em%20alimentos%20e%20bebidas%20nacionais%20produzidos%20e%20comercializados%20em%20diferentes.pdf](http://www.flavorfood.com.br/artigos/perigos_quimicos/Contaminantes%20formados%20durante%20o%20processamento/Micotoxinas%20em%20alimentos%20e%20bebidas%20nacionais%20produzidos%20e%20comercializados%20em%20diferentes.pdf)>. Acesso em: 19 maio 2010.

MOLIN, R. Ocorrência de micotoxinas em estágios fenológicos próximos da colheita de milho. In: SIMPÓSIO SOBRE MICOTOXINAS EM GRÃOS, 1999, São Paulo. [Anais]. São Paulo: Fundação Cargill, 1999. p. 57-80.

NERI, D. K. P.; MORAES, J. C.; GAVINO, M. A. Interação silício com inseticida regulador de crescimento no manejo da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith. 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1167-1174, 2005.

SEKIYAMA, B. L.; RIBEIRO, A. B.; MACHINSKI, P. A.; MACHINSKI JUNIOR, M. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em produtos alimentícios à base de milho. **Revista Brasileira de Microbiologia**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 289-294, 2005.

