

Área: Ciência dos Alimentos

CO-OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM GRÃOS E QUIRERA DE MILHO (*Zea mays* L.) EM AMOSTRAS DESTINADAS À FABRICAÇÃO DE RAÇÃO ANIMAL

Darlina Mello Souza*, **Jaqueline Fabiane Reichert**, **Rudinei Boss**, **Fábio Garske da Fonseca**, **Vanessa Klein**, **Cesar Augusto Pierazan**, **Cassiano Vasconcelos dos Santos**,
Ionara Regina Pizzutti

Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Química, Santa Maria, RS

**E-mail: darliana.ms@gmail.com*

RESUMO – As micotoxinas são substâncias produzidas por fungos, altamente tóxicas para o homem e os animais. As de maior incidência em milho são, principalmente, as fumonisinas, aflatoxinas, zearalenona e a ocratoxina. O objetivo deste estudo foi avaliar quantitativamente a presença de 12 micotoxinas em amostras de grãos e quirera de milho, oriundos de distintos lotes de recebidos em uma fábrica de ração animal (80 amostras). As amostras foram coletadas no período de 10 meses, a cada 15 dias e analisadas por LC-MS/MS, empregando-se extração por QuEChERS modificado. Todas as amostras apresentaram contaminação por fumonisinas. Além disto a co-ocorrência destes contaminantes foi recorrente em 100% das amostras. Algumas amostras também apresentaram contaminação por aflatoxinas, desoxinivalenol e zearalenona.

Palavras-chave: Fumonisinas; Desoxinivalenol; Micotoxinas; Alimentação animal; Milho.

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.), pertencente à família das Poáceas (LUIZ et al., 2003). É o cereal mais cultivado no mundo (MINAMI et al., 2004). A importância econômica do milho é caracterizada pelas diversas formas de sua utilização, que vai desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia (MIRANDA; DUARTE; GARCIA, 2012), participando em mais de 500 produtos alimentícios (MINAMI et al., 2004). Cerca de 66% da produção mundial destina-se à alimentação animal, 20% ao consumo humano direto e 8% à indústria. Os 6% restantes constituem a somatória de perdas e produção de semente (LUIZ et al., 2003).

Como outros cereais, o milho é muitas vezes exposto a contaminação fúngica, (OLIVEIRA; LORINI; MALLMANN, 2010) seja no campo ou durante o armazenamento (MAGAN; OLSEN, 2004). *Fusarium* spp. está associado com a ocorrência de doenças em todas as fases de desenvolvimento da planta de milho, infectando as raízes, caule e sementes (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997). Esse patógeno é o principal responsável pela produção de micotoxinas em grãos de milho e nos subprodutos oriundos desse cereal, destacando-se aquelas do

grupo das fumonisinas (FILHO, 2012). Os fatores que contribuem para a ocorrência são temperatura, umidade, estresse hídrico, danos causados por insetos, outras doenças fúngicas e genótipo de milho (CALVO, 2005).

Em grãos, a presença destes contaminantes é imperceptível visualmente no produto final, tornando-se um grande desafio para produção de alimentos seguros (TIBOLA et al., 2011). Como essas substâncias tóxicas são contaminantes naturais e não podem ser completamente removidas dos alimentos, muitos países têm imposto limites máximos de tolerância (MAGAN; OLSEN, 2004). A segurança do alimento se tornou um importante atributo de qualidade. Portanto, todos os aspectos da produção de alimentos devem ser considerados para garantir a segurança da alimentação tanto humana quanto animal (CHELI et al., 2012).

Assim, devido aos potenciais prejuízos que essas substâncias podem causar para o agronegócio e para a saúde animal, devido ao elevado consumo de produtos à base de milho destinados a alimentação animal, o objetivo deste trabalho foi avaliar amostras de milho e quirera de milho destinados à ração animal, amostrados no período de 10 meses em uma fábrica de ração animal localizada na região noroeste do Rio Grande do Sul.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo, foram selecionadas 12 micotoxinas. A escolha dos analitos se deve a relevância dos mesmos na contaminação em milho e por serem os de incidência mais comumente relatados neste tipo de matriz. As micotoxinas em estudo foram: Aflatoxinas (AFLA's B₁, B₂, G₁, G₂), Ocratoxina A (OTA), Fumonisinas (FB₁ e FB₂), Desoxinivalenol (DON), Diacetoxiscirpenol (DAS) e Zearalenona (ZEA), Toxina T-2 e Toxina HT-2.

Utilizou-se um sistema de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) acoplado ao Espectrômetro de Massa (Xevo TQS, Waters), com ionização por eletronebulização no modo positivo (ESI⁺). A separação analítica foi realizada utilizando coluna cromatográfica C18 (100 mm x 2,1 mm x 1,7 µm), mantida a temperatura constante de 60 °C. A fase móvel foi composta de acetonitrila (contendo ácido fórmico a 0,1%) e água (contendo ácido fórmico a 0,1%). Com modo de gradiente de eluição, e vazão constante de 0,45 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 2 µL. O tempo total de corrida foi de 13 minutos.

Foram realizadas coletas de amostras de grãos e quirera de milho destinadas a fabricação de ração animal, no período de 10 meses. A frequência de coleta foi quinzenal, sendo que as amostras eram a matéria prima recebida pela fábrica. Foram coletadas 40 amostras ao longo do período mencionado. Cada amostra foi composta de 2 kg, representando lotes de $1 \leq 3$ toneladas.

As amostras foram homogeneizadas com água, a fim de obter uma suspensão homogênea (*slurry*). A proporção entre a amostra e a água para a preparação da suspensão foi, respectivamente, de 1:1,5. Pesaram-se 12,5 g de *slurry*, seguida da adição de 10 mL de acetonitrila (contendo 1% de ácido acético) e do padrão interno do procedimento (P.I.P.) (quinalfós), na concentração de 12,5 µg L⁻¹. Após fechar os tubos, os mesmos foram colocados na mesa agitadora por cerca de 1 minuto. Em seguida, acrescentou-se 5 g de MgSO₄ anidro e repetiu-se a agitação novamente por um minuto. Posteriormente, efetuou-se uma etapa de centrifugação por 3 minutos, a 4000 rpm. Por fim, transferiu-se 500 µL deste extrato para o vial e adicionou-se 500 µL de metanol contendo o padrão interno do instrumento (P.I.I.) (propoxur), na concentração de 10 µg L⁻¹. Seguiu-se diretamente para análise por UPLC-MS/MS.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A co-ocorrência de micotoxinas foram evidenciadas em todas as amostras de grãos de milho e de quirera de milho (Tabela 1). Foram determinadas aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) e fumonisinas (B_1+B_2) em todas as amostras de grãos e quirera de milho. DON foi determinada em 100% das amostras de grãos de milho e em 75% das amostras de quirera de milho, enquanto ZEA foi determinada em 65% e 85% de amostras de grão e quirera de milho, respectivamente.

Em grãos de milho, as concentrações de FB_1 variaram entre 92 e 1517 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com concentração média de 612 $\mu\text{g kg}^{-1}$. As concentrações de FB_2 variaram de 64 a 927 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com concentração média de 356 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Nas amostras de quirera de milho as concentrações encontradas de FB_1 variaram de 92 a 1096 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com concentração média de 510 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e de FB_2 64 a 619 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com concentração média de 327 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Todos estes valores são inferiores aos estabelecidos pela legislação brasileira quanto à presença de fumonisinas em grãos de milho para posterior processamento (concentração máxima permitida de 5000 $\mu\text{g kg}^{-1}$)

Os dados obtidos neste estudo estão em conformidade com a literatura, na qual é evidenciado distribuição de fumonisinas generalizada (SILVA et al., 2007). Em comparação com outros grãos, a contaminação do milho por fumonisinas é a mais frequente, assim como também apresentam as maiores concentrações desta micotoxina. Geralmente as concentrações de FB_1 são superiores às concentrações FB_2 e FB_3 .

Aflatoxinas foram determinadas em todas as amostras de grãos e quirera de milho neste estudo. Em grãos de milho, contaminação por AFLA B_1 , AFLA B_2 , AFLA G_1 e AFLA G_2 foram determinadas respectivamente em 100%, 30%, 10% e 45% das amostras analisadas. Em amostras de quirera de milho, a contaminação por AFLA B_1 , AFLA B_2 , AFLA G_1 e AFLA G_2 foram verificadas em 100%, 45%, 20% e 35% das amostras, respectivamente.

Resultados obtidos por Santurio e colaboradores no Rio Grande do Sul (SANTURIO et al., 1992), com cerca de 15600 amostras de alimentos destinados principalmente ao consumo animal, evidenciaram contaminação por aflatoxinas em 41,9% das amostras de milho e em 36,9% das amostras de ração destinadas ao consumo animal.

A ingestão de rações contaminadas com AFLA B_1 e AFLA B_2 por mamíferos, pode ocasionar o aparecimento de metabólitos hidroxilados no leite, tais como a aflatoxina M_1 e a aflatoxina M_2 (micotoxinas do leite) (GALVANO; GALOFARO; GALVANO, 1996). Assim, quando o gado leiteiro consome ração contaminada com aflatoxinas precursoras, há degradação parcial destas no rúmem e o animal pode se intoxicar ou transmitir as micotoxinas através do leite. (CREPPY, 2002; GALTIER, 1998)

O presente estudo também avaliou a presença de outras toxinas de *Fusarium*, em que DON foi encontrada em todas as amostras de grãos de milho em concentrações de até 668 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e em 65% das amostras de quirera de milho em concentrações de até 564 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Tais concentrações de DON não excederam os limites máximos permitidos pela legislação brasileira em milho para posterior processamento, o qual estabelece como valor máximo a concentração de 3000 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Tabela 1. Concentração de micotoxinas em grãos e quirera de milho utilizados para fabricação de ração animal.

Amostra	FB ₁	FB ₂	DON	ZEA	AFLA B ₁	AFLA B ₂	AFLA G ₁	AFLA G ₂	Micotoxinas (µg kg ⁻¹)
Grãos de milho	1	92	64	<LOQ	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.
	2	535	355	79	76	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.
	3	286	172	<LOQ	n.d.	2.4	n.d.	n.d.	1.5
	4	753	414	<LOQ	<LOQ	2.0	n.d.	n.d.	n.d.
	5	573	311	<LOQ	n.d.	9.2	1.2	n.d.	n.d.
	6	456	259	83	<LOQ	4.2	n.d.	n.d.	1.1
	7	489	291	88	<LOQ	5.7	<LOQ	n.d.	1.3
	8	349	217	89	<LOQ	13.1	1.0	n.d.	n.d.
	9	298	171	<LOQ	<LOQ	3.6	n.d.	n.d.	1.1
	10	517	265	<LOQ	<LOQ	5.4	<LOQ	n.d.	1.3
	11	480	298	221	<LOQ	4.5	n.d.	21.1	n.d.
	12	567	419	274	110	<LOQ	n.d.	n.d.	1.3
	13	470	280	271	405	8.2	n.d.	n.d.	1.5
	14	1517	927	<LOQ	51	32.3	1.5	n.d.	1.3
	15	787	472	<LOQ	n.d.	3.6	n.d.	7.4	2.0
	16	827	442	<LOQ	n.d.	1.4	<LOQ	n.d.	n.d.
	17	1058	572	<LOQ	n.d.	1.1	n.d.	n.d.	n.d.
	18	956	505	<LOQ	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.
	19	688	402	668	156	1.3	n.d.	n.d.	n.d.
	20	544	280	607	493	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.
Quirera de milho	1	589	349	n.d.	<LOQ	11.7	1.1	n.d.	1.6
	2	406	255	n.d.	n.d.	2.4	n.d.	n.d.	n.d.
	3	777	514	302	184	2.0	n.d.	n.d.	1.4
	4	1096	619	358	146	3.2	<LOQ	n.d.	n.d.
	5	802	412	492	194	1.1	n.d.	n.d.	1.4
	6	532	349	564	231	1.3	n.d.	n.d.	1.5
	7	584	366	50	50	7.2	<LOQ	n.d.	n.d.
	8	324	207	92	52	2.3	n.d.	n.d.	2.3
	9	688	459	287	111	0.9	n.d.	n.d.	n.d.
	10	524	306	<LOQ	<LOQ	9.8	1.2	5.0	n.d.
	11	672	455	58	<LOQ	10.1	1.0	n.d.	n.d.
	12	424	284	n.d.	<LOQ	8.5	1.0	n.d.	1.9
	13	648	425	n.d.	<LOQ	38.3	3.6	20.3	n.d.
	14	431	308	102	<LOQ	9.7	1.1	n.d.	n.d.
	15	489	330	92	60	5.5	<LOQ	n.d.	2.0
	16	570	394	92	62	3.6	n.d.	n.d.	n.d.
	17	235	157	72	<LOQ	7.9	n.d.	3.5	n.d.
	18	387	303	556	424	3.9	n.d.	n.d.	n.d.
	19	357	253	195	n.d.	2.5	n.d.	3.0	n.d.
	20	92	64	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. = menor que o limite de detecção do método; <LOQ = menor que o limite de quantificação do método

A presença de ZEA foi evidenciada em 55% das amostras de milho com concentração máxima de 493 $\mu\text{g kg}^{-1}$, assim como em 65% das amostras de quirera de milho com concentração máxima de 424 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Duas amostras de grãos de milho (405 e 495 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e uma amostra de quirera de milho (424 $\mu\text{g kg}^{-1}$) apresentaram valores superiores aos estabelecidos pela legislação brasileira (ANVISA, 2013), que é de 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para grãos de milho para posterior processamento. A frequente co-ocorrência de micotoxinas reforça a importância da realização de monitoramentos utilizando métodos multi-micotoxinas.

4 CONCLUSÃO

Pode-se evidenciar que nenhuma das amostras estava isenta de micotoxinas, independente da origem. Este estudo mostrou que mesmo em concentrações abaixo dos limites legais na maior parte das amostras, a exposição animal a estas toxinas podem ocorrer constantemente via ração com a matéria prima contaminada.

Todas as amostras avaliadas apresentaram contaminação por fumonisinas. Além disto a co-ocorrência destes contaminantes foi recorrente em 100% das amostras. Algumas amostras também apresentaram contaminação por aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂), DON e ZEA nas amostras destinadas à alimentação animal.

Apesar dos níveis dessas toxinas se apresentarem na maioria das amostras em concentrações inferiores aos limites estabelecidos pelas legislações vigentes, considerando sua ocorrência isoladamente, deve haver um monitoramento constante, visto os riscos potenciais da co-ocorrência de micotoxinas, o que pode aumentar a probabilidade de morbidade e mortalidade animal, visto os possíveis efeitos sinérgicos ou aditivos nas rações contaminados.

5 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, I. et al. Co-occurrence of mycotoxins in swine feed produced in Portugal. *Mycotoxin Research*, v. 27, p. 177–181, 2011.
- ANVISA. **Resolução - RDC nº59, de 26 de dezembro de 2013. Dispõe sobre a prorrogação dos prazos estabelecidos para os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos.** Brasília - DF: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2013.
- CALVO, Ana M. Mycotoxins. In: DABROWSKI, Waldemar M.; SIKORSKI, Zdzislaw E. (Eds.). **Toxins in food.** Boca Raton, Florida - USA: CRC Press, 2005. p. 220–240.
- CHELI, Federica et al. Rapid methods as analytical tools for food and feed contaminant evaluation: Methodological implications for mycotoxin analysis in cereals. In: **Food production - Approaches, challenges and tasks.** First ed. Roma - Italy: InTech Published, 2012. p. 185–204.
- CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, v. 127, n. 1–3, p. 19–28, 2002.
- DRIEHUIS, F. et al. Occurrence of Mycotoxins in Feedstuffs of Dairy Cows and Estimation of Total Dietary Intakes. *Journal of Dairy Science*, v. 91, p. 4261–4271, 2008.
- FILHO, João Américo Wordell. **Fusariose ou podridão-de-fusarium na cultura do milho.** Revista Plantio. s.131. p.1-5, 2012.

- GALTIER, P. Biological fate of mycotoxins in animals. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 149, n. 6, p. 549–554, 1998.
- GALVANO, F.; GALOFARO, V.; GALVANO, G. Occurrence and stability of Aflatoxin M1 in milk and milk products: a worldwide review. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 10, p. 1079–1090, 1996.
- GRIESSLER, K. et al. Occurrence of mycotoxins in Southern Europe. **World Mycotoxin Journal**, [s. l.], v. 3, p. 301–309, 2010.
- LABUDA, R. et al. Incidence of trichothecenes and zearalenone in poultry feed mixtures from Slovakia. **International journal of food microbiology**, v. 105, p. 19–25, 2005.
- LUIZ, Edson et al. Milho : riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 2, p. 359–378, 2003.
- MAGAN, N.; OLSEN, M. **Mycotoxins in food: Detection and control**. 1^a ed. Cambridge - England: Woodhead Publishing Limited, 2004.
- MINAMI, Luciana et al. Fumonisinas : efeitos toxicológicos , mecanismo de ação e biomarcadores para avaliação da exposição. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 25, n. 3, p. 207–224, 2004.
- MIRANDA, Rubens Augusto De; DUARTE, Jason de Oliveira; GARCIA, João Carlos. **Cultivo do milho**. 2012. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_8_ed/index.htm>. Acesso em: 22 set. 2013.
- MONBALIU, S. et al. Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, p. 66–71, 2010.
- OLIVEIRA, M. A.; LORINI, I.; MALLMANN, C. A. As micotoxinas e a segurança alimentar na soja armazenada. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. EE01, p. 87–91, 2010. Disponível em: <http://www.ital.sp.gov.br/bj/artigos/especiais/2010/artigos_bjb_v70ne/15_bjft_v13ne_13e0113.pdf>. Acesso em: 3 set. 2013.
- RAFAI, P. et al. Evaluation of mycotoxin-contaminated cereals for their use in animal feeds in Hungary. **Food Additives & Contaminants**, v. 17, p. 799–808, 2000.
- SANTURIO, J. M. et al. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em grãos e rações destinadas ao consumo animal no sul do Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS 1992, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Anais., 1992.
- SCUDAMORE, K. A.; NAWAZ, S.; HETMANSKI, M. T. Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: II. Determination of mycotoxins in maize and maize products. **Food Additives & Contaminants**, v. 15, p. 30–55, 1998.
- SILVA, L. J. G. et al. Occurrence of fumonisins B1 and B2 in Portuguese maize and maize-based foods intended for human consumption. **Food Additives and Contaminants**, v. 24, n. 4, p. 381–390, 2007.
- TIBOLA, Casiane Salette et al. Micotoxinas em trigo no Brasil: causas, panorama atual e perspectivas para o manejo. **Revista Plantio Direto**, São Paulo, p. 1–5, 2011. Disponível em: <http://www.plantiodireto.com.br/?body=cont_int&id=1066>