

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DA
SAÚDE
MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA

Fernanda Conegatto Paim

**OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS EM AMOSTRAS
BRASILEIRAS DE MILHO NO PERÍODO DE JULHO DE 2016 A
JULHO DE 2017**

Santa Maria, RS
2018

Fernanda Conegatto Paim

**OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS EM AMOSTRAS BRASILEIRAS DE
MILHO NO PERÍODO DE JULHO DE 2016 A JULHO DE 2017**

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde - Medicina Veterinária/Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Especialista em Medicina Veterinária Preventiva.**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Dilkin

Santa Maria, RS
2018

Fernanda Conegatto Paim

**OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS EM AMOSTRAS BRASILEIRAS DE
MILHO NO PERÍODO DE JULHO DE 2016 A JULHO DE 2017**

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde - Medicina Veterinária/Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Especialista em Medicina Veterinária Preventiva.**

Aprovado em 1º de março de 2018:

Paulo Dilkin, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Maristela Lovato, Dra. (UFSM)

Camila Tonini, MSc. (UFPEL)

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Sergio e Adriana, que sempre me apoiaram em minhas decisões e quase sempre entenderam o que é realizar uma Residência. À minha irmã Renata, que mesmo distante em alguns momentos sempre esteve ao meu lado para compartilhar comigo suas experiências. E aos meus animais de estimação, que em muitas noites de cansaço foram meus companheiros sempre me dando alegrias.

Ao meu orientador, Dr. Paulo Dilkin, que com sua orientação me mostrou quais caminhos seguir sempre pensando no futuro.

As minhas amigas e colegas residentes, Amanda Lovato Oliveira, Franciely Alves Costa e Evelyn Kaus Dotto, que por dois anos foram minhas irmãs nessa rotina tão pesada que foi a Residência Multiprofissional.

As amigas e parceiras de LAMIC, Camila Tonini, Vanessa Kaminski, Érika Stefanello, Ana Beatriz Benevides, Denize Tyska, Raquel Martins, Cristiane Rosa, Fabiana Portela, Mara Luciane Weise e Dima Quatrin por todas as conversas, apoio, e ombro amigo nas vezes que mais precisei, contem sempre comigo.

A todos os professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFSM, doutorandos, mestrandos e estagiários dos respectivos laboratórios – Virologia, LABAC, LAMIC, LADOPAR, LCDPA – pelos ensinamentos, conversas, risadas e experiências.

Ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde – Medicina Veterinária/ Medicina Veterinária Preventiva, pela oportunidade e estrutura oferecidas para a realização deste trabalho.

E a Deus, pois Ele que me proporcionou saúde, confiança, sabedoria e juízo para viver tudo isso e seguir sempre em frente.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS EM AMOSTRAS BRASILEIRAS DE MILHO NO PERÍODO DE JULHO DE 2016 A JULHO DE 2017

AUTORA: Fernanda Conegatto Paim

ORIENTADOR: Paulo Dilkin

As micotoxinas são metabólitos fúngicos tóxicos produzidos por algumas espécies de fungos e são de extrema importância em saúde pública devido ao seu potencial de contaminação de alimentos destinados ao consumo humano e animal. A aflatoxina, produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*, é uma das substâncias cancerígenas mais potentes encontradas na natureza. Neste trabalho será apresentada a ocorrência da aflatoxina em amostras de milho através de um levantamento com base em informações obtidas das análises, realizada no Laboratório de Análises Micotoxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria, no período de um ano. Foram submetidas a ensaio 1200 amostras de milho para a detecção e quantificação de micotoxinas e foram conhecidas todas as etapas realizadas neste processo com a finalidade de obter alimentos destinados ao mercado interno e externo de consumo humano e animal. Também foi estudada a legislação vigente no Brasil no âmbito das aflatoxinas, a importância das micotoxinas no contexto atual da saúde pública e no que implica o consumo de produtos com a presença destes agentes contaminantes para a população humana e também para o consumo animal. Portanto, foi comprovado que 69% das amostras analisadas para aflatoxinas totais apresentaram contaminação maior que 1 µg/kg e 36% das amostras analisadas possuem concentração de aflatoxinas totais superior ao limite permitido pela legislação brasileira.

Palavras-chave: Micotoxinas; Saúde pública; Alimentos; Análise cromatográfica.

ABSTRACT

OCURRENCE OF AFLATOXINS IN BRAZILIAN MAIZE SAMPLES IN THE PERIOD FROM JULY 2016 TO JULY 2017

AUTHOR: Fernanda Conegatto Paim

ADVISOR: Paulo Dilkin

Mycotoxins are toxic fungal metabolites produced by some species of fungi and are extremely important in public health because of their potential for contamination of food intended for human and animal consumption. Aflatoxin, produced by the fungus *Aspergillus flavus*, is one of the most potent carcinogenic substances found in nature. In this work, the occurrence of aflatoxin in maize samples will be presented through a survey based on information obtained from the analyzes, carried out at the Laboratory of Micotoxicological Analyzes of the Federal University of Santa Maria, in a period of one year. 1200 maize samples were tested for the detection and quantification of mycotoxins and all the steps performed in this process were known in order to obtain food destined for the internal and external market of human and animal consumption. The current legislation on aflatoxins in Brazil, the importance of mycotoxins in the current context of public health and on the consumption of products with the presence of these contaminating agents for the human population and also for animal consumption were also studied. Therefore, it was verified that 69% of the analyzed samples for total aflatoxins presented contamination higher than 1 µg/kg and 36% of the samples analyzed had a total aflatoxin concentration higher than the limit permitted by Brazilian legislation.

Key words: mycotoxins; Public health; Food; Chromatographic analysis.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 8 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 10 |
| 2.1 MILHO..... | 10 |
| 2.2 FUNGOS E MICOTOXINAS PRODUZIDAS..... | 10 |
| 2.3 AFLATOXINAS E SEUS EFEITOS EM ANIMAIS E HUMANOS..... | 11 |
| 2.4 LEGISLAÇÃO SOBRE LIMITES MÁXIMOS TOLERADOS PARA MICOTOXINAS EM ALIMENTOS..... | 13 |
| 2.5 DIAGNÓSTICO DE AFLATOXINAS EM ALIMENTOS..... | 14 |
| 3METODOLOGIA..... | 15 |
| 3.1 LOCAL DO ESTUDO | 15 |
| 3.2 OPERACIONALIZAÇÃO DA COLETA DE DADOS | 15 |
| 3.2.1 RECEBIMENTO E REGISTRO DE AMOSTRAS..... | 15 |
| 3.2.2 PREPARO E EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS DE MILHO | 15 |
| 3.2.3 DILUIÇÃO DE AMOSTRAS..... | 16 |
| 3.2.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA..... | 16 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 17 |
| 5 CONCLUSÕES | 19 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 20 |

1 INTRODUÇÃO

O milho é uma das principais culturas brasileiras e possui extrema importância econômica. É utilizado principalmente para consumo humano e animal, sendo um alimento essencialmente energético, pois seu principal componente é o amido. Devido à problemas de armazenagem, o milho é vulnerável ao crescimento de fungos produtores de micotoxinas e entre elas, destacam-se as aflatoxinas.

Micotoxinas são compostos tóxicos produzidos por algumas espécies fúngicas e podem causar danos à saúde humana e animal. As micotoxinas têm recebido atenção considerável nas últimas décadas, constituindo um tema relevante. São conhecidas em torno de 500 destas substâncias, mas apenas um pequeno grupo recebe a devida atenção por representar maiores ameaças à saúde humana e dos animais. Entre os fatores envolvidos no processo de formação de micotoxinas destacam-se: temperatura, umidade elevada, pH, entre outros.

Em animais, são conhecidos diversos efeitos causados pelas micotoxinas, sendo um dos principais os efeitos carcinogênicos, com o fígado sendo o órgão mais comprometido. No homem, as aflatoxinas são as principais responsáveis pela origem de câncer hepático, sendo consequência da ingestão de alimentos contaminados, mostrando a importância deste tema em saúde pública.

Devido à importância deste tema, o Ministério da Agricultura e o Ministério da Saúde elaboraram legislações pertinentes aos níveis de micotoxinas existentes em rações animais e em alimentos para consumo humano, que desde então, passaram a vigorar no Brasil e foram base para o presente trabalho.

Para a realização do diagnóstico de micotoxinas em grãos é realizada uma técnica de detecção sensível e seletiva: a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). O uso de Cromatografia Líquida permite uma análise quantitativa dos componentes em questão em concentrações extremamente baixas, tornando a identificação destes, limitada. Assim, é necessário a utilização da Espectrometria de massas para a identificação da composição e também a elucidação estrutural do composto analisado.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar a ocorrência de aflatoxinas presentes em amostras de milho no período de julho de 2016 a julho de 2017 utilizando Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS).

Tais amostras são utilizadas na fabricação de alimentos de consumo humano e também na utilização de rações para animais, justificando a preocupação quanto aos resultados encontrados nas amostras analisadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MILHO

O milho (*Zea mays L.*) é um dos principais cereais produzidos no mundo e o segundo grão mais produzido no Brasil, com previsão de produção estimada no ano de 2016/17 em 92,8 milhões de toneladas (MAPA, 2017).

Em razão de sua riqueza nutricional, é utilizado na alimentação humana e animal, e é o ingrediente predominante na formulação de rações. Para atender às demandas ao longo do ano, este cereal fica armazenado e, portanto, predisposto à perda de qualidade e a contaminações fúngicas (SCHUH et al., 2011).

Entre as principais micotoxinas detectadas em milho estão as aflatoxinas, produzidas por diversas espécies do gênero *Aspergillus* (MAZIERO & BERSOT, 2010). Antes de 1960, o interesse nas espécies do grupo *Aspergillus flavus* se concentrava apenas no uso de algumas espécies no processamento de alimentos na Europa e no Oriente, além da habilidade de alguns isolados no parasitismo de insetos (BEUCHAT, 1978). Na verdade, o termo micotoxina foi criado em 1962, quando ocorreu a famosa mortalidade de perus jovens, na Inglaterra, após a ingestão de torta de amendoim proveniente do Brasil e da África. Após a confirmação de que um metabólito secundário produzido por *A. flavus* era o responsável pelas mortes das aves, iniciaram-se diversos estudos dessas toxinas. O termo aflatoxina foi formado a partir do nome do seu principal agente produtor (*Aspergillus flavus* toxina). As principais aflatoxinas conhecidas são denominadas de B1, B2, G1 e G2, com base na fluorescência delas sob luz ultravioleta (B = Blue, G = Green) e na sua mobilidade durante a realização de cromatografia de camada delgada (FREIRE et al., 2007).

Alguns substratos são extremamente favoráveis ao crescimento de fungos aflatoxigênicos e à formação de aflatoxinas. A contaminação natural de cereais, sementes oleaginosas, amêndoas e especiarias é de ocorrência comum em inúmeros países (FREIRE et al., 2007).

2.2 FUNGOS E MICOTOXINAS PRODUZIDAS

As micotoxinas são metabólitos tóxicos produzidas principalmente por cinco gêneros de fungos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* e *Alternaria* (MAZIERO & BERSOT, 2010). Existem ao menos 350 espécies de fungos (SABINO,

2004), e segundo BANDO et al., (2007), dentre as mais de 500 substâncias identificadas como micotoxinas, as mais estudadas são: aflatoxinas, tricotecenos, fumonisinas, zearalenona e ocratoxina A.

A contaminação de rações e outros alimentos por micotoxinas pode variar de acordo com as condições ambientais (umidade do substrato e temperatura do ambiente), métodos de processamento, produção e armazenamento dos produtos. A temperatura é um dos principais fatores envolvidos nesse processo e, em grãos, a faixa viável para a sua produção situa-se entre 11 e 37°C. Os fungos toxigênicos podem infectar os cultivos em crescimento, em consequência de danos causados por insetos e outros agentes e produzir toxinas antes da colheita, durante essa e após seu armazenamento. Períodos de seca durante o cultivo do milho também são apontados como predisponentes a produção de aflatoxinas (ZLOTOWSKI et al., 2004).

2.3 AFLATOXINAS E SEUS EFEITOS EM ANIMAIS E HUMANOS

A aflatoxina B1 (AFB1) é a mais comum e mais tóxica produzida principalmente por fungos filamentosos como *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Os efeitos tóxicos das aflatoxinas incluem atividade imunossupressora, mutagênica, teratogênica e hepatocarcinogênica. O agente hepatocarcinogênico mais potente descrito em mamíferos é AFB1, que é classificado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer como Grupo 1 (carcinógeno provável) (PRADO et al., 2012).

A ingestão de alimentos que contenham micotoxinas pode causar graves efeitos sobre a saúde animal e humana. Tais efeitos são conhecidos como micotoxicoses, cuja gravidade depende da toxicidade da micotoxina, grau de exposição, idade e estado nutricional do indivíduo, e dos possíveis efeitos sinérgicos de outros agentes químicos aos quais está exposto. Muitas destas toxinas têm afinidade por determinado órgão ou tecido, sendo o fígado, os rins e o sistema nervoso frequentemente os mais atingidos (MAZIERO & BERSOT, 2010). De maneira geral, o impacto sobre os animais irá depender da idade dos mesmos e da concentração da toxina ingerida, uma vez que animais jovens são mais sensíveis (BÜNZEN & HAESE, 2006).

De maneira semelhante, na saúde pública, as aflatoxinas são as principais responsáveis pela origem de câncer hepático no homem, consequência da ingestão contínua de alimentos contaminados (OLIVEIRA & GERMANO, 1997). A aflatoxicose aguda pode causar morte; seu quadro se inicia após 6 horas da ingestão da micotoxina e

seus sintomas incluem apatia, presença de sangue nas fezes, tremores musculares, hipertermia (até 41°C), e a aflatoxicose crônica desencadeia alterações patológicas mais prolongadas, como o câncer e imunossupressão. Muitas vezes a aflatoxicose aguda se manifesta como hepatite aguda, pois o principal órgão afetado pela aflatoxina B1 é o fígado (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006).

Suínos e caninos são as espécies mais sensíveis, sendo normalmente animais jovens os mais afetados pela aflatoxicose. Em suinocultura, a aflatoxicose subclínica é responsável por desempenho produtivo baixo e também pela ocorrência de doenças oportunistas associadas com imunossupressão, levando a grandes prejuízos econômicos (MALLMANN et al., 1994).

Os efeitos deletérios das aflatoxinas em frangos são maiores na fase inicial de criação, até os 21 dias de vida; porém o reflexo negativo sobre o ganho de peso é persistente até a fase final de criação (HUFF et al., 1986). Os efeitos primários da aflatoxicose em aves podem ser utilizados como guia para diagnóstico clínico da doença. A primeira mudança é alteração no tamanho dos órgãos internos como fígado, baço e rins, enquanto a “bursa de Fabricius” e o timo diminuem (TESSARI & CARDOSO, 2012).

O fígado é o órgão mais lesado resultando em uma série de danos ao metabolismo das proteínas, carboidratos e lípidos (HOERR, 1997), a degeneração gordurosa hepática e proliferação dos ductos biliares induzem diversas alterações séricas, principalmente constatadas pelo aumento da atividade das enzimas, coagulopatias e diminuição na produção de proteínas (OLIVEIRA & GERMANO, 1997). Outros órgãos como intestino, baço, linfonodos e rins também podem sofrer alterações, principalmente em animais monogástricos como aves e suínos (MARIN et al., 2002). Alterações histopatológicas no fígado de frangos de corte como degeneração hepática com reação proliferativa ductal, hiperplasia, proliferação dos ductos biliares e infiltração de heterófilos, foram observadas por TESSARI (2004).

Atualmente, entre todos os efeitos tóxicos causados pela aflatoxina a supressão do sistema imunológico e conseqüentemente a diminuição da resistência a outras enfermidades, tem sido relevante. Em frangos de corte, os efeitos causados pela aflatoxina estão relacionados com baixas respostas vacinais e ao surgimento de doenças inespecíficas (TESSARI & CARDOSO, 2012).

O melhor método para controlar micotoxinas em alimentos é prevenir o crescimento de fungos, ou seja, evitar que os fungos encontrem condições favoráveis de crescimento seja no campo ou durante a estocagem. A contaminação dos grãos pode

ocorrer devido a condições inadequadas de armazenamento. Procedimentos para redução da umidade dos grãos colhidos e a armazenagem dentro dos padrões recomendados, são fundamentais para o controle (TESSARI & CARDOSO, 2012).

Um método muito utilizado, particularmente no caso das aflatoxinas é o uso de argilas de origem vulcânica, os aluminossilicatos e as bentonitas, comercialmente conhecidos como aditivos antimicotoxinas, que funcionam como um ímã que atraem as micotoxinas, este processo ocorre no intestino do animal, evitando a absorção da micotoxina. Os adsorventes têm uma vasta área de superfície e moléculas específicas para se ligarem as micotoxinas, neutralizando-as. A eliminação ocorre através das fezes e urina (SANTURIO, 2002).

O Brasil, devido ao seu clima predominantemente tropical, propicia condições ideais para a proliferação de fungos toxigênicos. Além disso, observam-se frequentemente condições inadequadas de plantio, colheita, secagem, transporte e armazenamento de produtos agrícolas. Desse modo, a adoção de práticas agrícolas que previnam a contaminação e o desenvolvimento de fungos é fundamental para garantir a obtenção de insumos de boa qualidade para a elaboração de rações empregadas em avicultura (ROSMANINHO; OLIVEIRA; BITTENCOURT, et al., 2001).

2.4 LEGISLAÇÃO SOBRE LIMITES MÁXIMOS TOLERADOS PARA MICOTOXINAS EM ALIMENTOS

Em 1988, pela resolução nº 7 de 09/11/1988, o Ministério da Agricultura estabeleceu o nível máximo de tolerância de 50 ppb ($50\mu\text{g}/\text{kg}$), dada pela somatória de AFB1+ AFB2 + AFG1+ AFG2, sendo válido para qualquer matéria prima utilizada como ingrediente para rações destinadas ao consumo animal (BRASIL, 1988).

Atualmente no Brasil está em vigor a RDC nº 7 de 2011, que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos (BRASIL, 2011). Esta resolução possui anexos que listam e classificam os alimentos e estabelece os LMT de aflatoxinas (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2 e AFM1), ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON), fumonisinas (FB1 + FB2), patulina (PAT) e zearalenona (ZON). Os limites foram baseados em resultados obtidos a partir de critérios estabelecidos pelo Codex Alimentarius, uma coletânea de orientações e recomendações sobre a segurança de alimentos reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS). No entanto, esta

resolução está relacionada com alimentos destinados a alimentação humana, não fazendo nenhuma menção aos LMT recomendados para alimentação animal (RIBEIRO, 2015).

2.5 DIAGNÓSTICO DE AFLATOXINAS EM ALIMENTOS

Os primeiros métodos para determinação de aflatoxinas em alimentos foram desenvolvidos em 1960, logo após a descoberta da toxina. Estes métodos tinham como base a propriedade fluorescente das toxinas, quando expostas à luz ultravioleta (OPAS,1983). A Cromatografia em camada delgada (CCD) foi uma técnica de identificação e quantificação utilizada inicialmente e ainda é largamente utilizada na atualidade. Tem um custo relativamente baixo, apresenta repetibilidade e reprodutividade adequadas ao nível de análise, geralmente em partes por bilhão (ppb) ou $\mu\text{g}/\text{kg}$ (MAZIERO & BERSOT, 2010).

Atualmente existem kits de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) para análise das principais micotoxinas, porém, as reações falso-positivas dificultam ainda, a sua utilização como alternativa aos métodos reconhecidos pela AOAC (Association of official analytical chemists), sendo necessária a confirmação por métodos químicos como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (MAZIERO & BERSOT, 2010).

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica de separação bem estabelecida e é empregada nas mais diversas áreas, entre elas, química, forense, toxicológica, clínica e ambiental, para solucionar inúmeros problemas analíticos (MALDANER & JARDIM, 2012).

Os métodos convencionais atuais para a determinação das micotoxinas em baixas concentrações dependem da cromatografia líquida de alta eficiência acoplado com um detector ultravioleta ou de fluorescência e mais recentemente a detecção por espectrometria de massa (MS). O uso do detector de MS oferece o efeito de alta sensibilidade, seletividade, exatidão na identificação do analito e quantificação precisa (BOUSIADOU-THEURILLAT et al., 2014).

A cromatografia líquida acoplada a detectores de massas resulta em uma poderosa ferramenta em análise alimentar devido à capacidade de separação da cromatografia combinadas a alta sensibilidade e seletividade do espectrômetro de massas (GRANDE, 1990). A técnica consiste em ionizar as moléculas, a fim de que as mesmas gerem fragmentos definidos como íons, carregados positiva ou negativamente, que são detectados e quantificados (WENTZ, 2013).

3 METODOLOGIA

3.1 LOCAL DO ESTUDO

Laboratório de Análises Micotoxicológicas – LAMIC, localizado no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFSM, no município de Santa Maria - RS.

3.2 OPERACIONALIZAÇÃO DA COLETA DE DADOS

Todos os dados foram coletados a partir do recebimento de amostras de grãos de milho e milho moído para a realização de ensaios no LAMIC no período de um ano (julho de 2016 a julho de 2017). O número total de amostras foi de 1200, com amostras de milho grão e amostras de milho moído. Foram realizadas as seguintes etapas:

- Recebimento de amostras;
- Registro de amostras;
- Preparação e extração de amostras;
- Diluição de amostras;
- Análise para detecção e quantificação de aflatoxinas através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrometria de massas;

3.2.1 Recebimento e registro de amostras

Na rotina diária do LAMIC são recebidas amostras nacionais e internacionais. Após o recebimento, é realizado o registro da amostra, de acordo com o pedido de solicitação de ensaio da mesma. O registro da amostra é parte crucial no processo de ensaio, pois todas as informações necessárias à identificação da amostra devem ser conhecidas. No registro, a amostra recebe um número do laboratório, que serve para identificação da mesma durante todo o processo.

3.2.2 Preparo e extração de amostras de milho

Após o registro de uma amostra de milho, é realizado o processo de moagem. A amostra recebida apresenta-se na forma de grãos e para a realização do processo de extração, é necessário a moagem. O processo de moagem facilita a homogeneização da amostra e também a extração da micotoxina, uma vez que aumenta a superfície de contato da amostra com o solvente. A moagem é realizada em um moinho ultracentrífugo, que realiza a trituração da amostra. A amostra permanece em uma caixa coletora e é removida para a posterior pesagem e limpeza do equipamento.

Para a realização da pesagem utiliza-se balança de precisão. É necessária uma completa homogeneização da amostra de milho moído para que facilite a dispersão da micotoxina. Para a análise de aflatoxina, pesa-se 5 g da amostra em um tubo falcon de 50 mL previamente descontaminado.

Na etapa de extração, é adicionado à amostra um solvente previamente preparado, contendo acetonitrila e água ultra-pura. O tubo contendo a amostra e solução passa então, pelo processo propriamente nomeado extração: é agitado em uma mesa agitadora pelo período de 1 hora e tem por finalidade de extrair a micotoxina presente naquela quantidade de amostra por afinidade molecular com determinado solvente.

3.2.3 Diluição de amostras

Com o término da etapa de extração, a amostra de milho em questão é conduzida à sala de cromatografia onde é realizada a etapa de diluição da amostra. O objetivo da diluição é reduzir a amostra obtida inicialmente na etapa de extração à um volume reduzido mas ainda assim capaz de reproduzir a quantidade de aflatoxina existente na amostra.

O processo de diluição inicia-se com a preparação do *vial* que receberá a amostra: é identificado com um número que a amostra recebeu no ato do registro. Após, adiciona-se o diluente para aflatoxina, também previamente preparado; um padrão interno e finalmente a amostra. Após a pipetagem destes componentes, o *vial* é agitado em um agitador magnético e conduzido ao responsável por iniciar o processo de diagnóstico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS).

3.2.4 Análise Cromatográfica

Após a diluição, o extrato diluído será submetido à separação por cromatografia líquida, seguido de detecção por espectrometria de massas. O equipamento empregado é um cromatógrafo HPLC 1290 Infinity (Agilent Technologies) acoplado a um Espectrômetro de Massas Triplo Quadrupólo 5500 TRAP.

Para composição das fases móveis foram utilizados metanol, água, acetonitrila, acetato de amônio, ácido fórmico e ácido acético. As colunas para a separação cromatográfica são: Gemini C₁₈ Phenomenex (50 x 4,6 mm 5 µm), Agilent Zorbax Eclipse C₈ (4,6 x 150 mm 5 µm), Agilent Zorbax Eclipse C₁₈ (4,6 x 150 mm 5 µm), Agilent Zorbax Eclipse C₁₈ (2,1 x 100 mm 1,8 µm).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram recebidas 1200 amostras de milho no período de um ano com solicitação para ensaio de aflatoxinas. Após realizadas todas as etapas do processo, para as 1200 amostras de milho processadas para a análise de aflatoxinas, foram encontrados os seguintes resultados: 836 amostras apresentaram pelo menos 1 µg/kg de contaminação para aflatoxinas totais (B1, B2, G1 e G2) (69%); 362 amostras apresentaram contaminação para aflatoxinas totais menor que 1ppb (30%); 768 amostras dentro do limite estabelecido pela legislação, ou seja, com até 20 µg/kg de contaminação para aflatoxinas totais (64%) com média de contaminação de 4 µg/kg e 433 amostras com contaminação superior a 20 µg/kg (36%) com média de contaminação em 61 µg/kg; tais amostras estão acima dos limites permitidos pela legislação brasileira. Foram observados níveis de contaminação variando de 1 µg/kg a 1418,4 µg/kg.

O milho é um dos principais cereais afetados por aflatoxinas. Analisando amostras de milho do estado do Rio Grande do Sul, Santurio et al. (1992) observaram 28,9% de amostras contaminadas por aflatoxinas, encontrando valores de até 1906 µg/kg, e Hennigen & Dick (1995) observaram aflatoxinas em 34,8% delas, em níveis variando de 12 µg/kg a 906 µg/kg. Gunther et al. (2002), em Santa Catarina, encontraram 12% de amostras contaminadas destinadas ao consumo humano, e uma amostra com 128,2 µg/kg, para consumo animal.

Vários estudos na literatura demonstram que a temperatura elevada é o principal fator responsável pelo aumento de aflatoxinas em milho (KARANARATNE et al. 1990;

LILLEHOJ et al. 1975, 1980; PAYNE et al. 1988; VIQUEZ, 1994; ZUBER & LILLEHOJ 1979). Jones et al. (1980) e Payne et al. (1988) demonstraram que o máximo de contaminação por *A. flavus*, em sementes de milho, ocorre em temperaturas de 30°C a 38°C.

Bento et al. (2012), encontrou resultados positivos nas análises de aflatoxinas (B1+B2+G1+G2) nas 84 amostras de grãos de milho das diferentes regiões do estado de Mato Grosso; com 21,4% de contaminação positiva para aflatoxinas na safra de 2012. Na safra de 2009, foi detectada a presença de aflatoxinas totais em 8,3% das amostras da região norte, 25% da região sul, 16,7% da região leste e 33,33% da região oeste. Os níveis de contaminação variaram de 1 a 12,2 µg/kg de aflatoxina B1, de 1 a 1,1 µg/kg de aflatoxina B2 e as aflatoxinas G1 e G2 não foram detectadas.

Pesquisas realizadas em várias regiões no Brasil demonstraram a presença de altos teores de AFB1 em grãos de milho antes e após a colheita e em ingredientes de rações (RODRÍGUEZ-AMAYA & SABINO 2002, ROCHA et al. 2009)

A análise de 1.263 amostras de grãos de milho e 1.006 amostras de rações à base de milho em vários estados no Brasil, num período de dez anos, revelou a presença das aflatoxinas em quase 50% dos alimentos analisados, com níveis máximos de 14,4 µg/kg (SANTURIO et al., 1996). Os altos níveis de contaminação por AFB1 encontrados nas dietas foram semelhantes aos encontrados por Almeida et al., (2009) que, analisando amostras de milho utilizado na formulação de ração animal, encontraram 10% das amostras contaminadas com teores entre 1 a 5µg/kg.

Marques et al. (2009) analisaram a incidência de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* e as contaminações com micotoxinas em grãos de cinco híbridos comerciais de milho em função da umidade de colheita, e observaram que a produção de aflatoxinas ocorreu em grãos ainda nas espigas, no campo, devido a condições ambientais favoráveis aos patógenos.

5 CONCLUSÕES

Após um ano e meio de trabalho, foi possível a participação na rotina do laboratório, através de todas as etapas de realização dos ensaios;

Foram realizados estudos pertinentes à legislação para micotoxinas em alimentos e também sobre micotoxicoses e sua importância em saúde pública;

Constatou-se a presença de aflatoxinas totais em concentração maior que 1ppb em 69% das amostras recebidas e analisadas;

Constatou-se que 36% das amostras analisadas possuem concentração para aflatoxinas totais acima do limite de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ permitido pela legislação brasileira.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA A.P. et al., Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Braz. J. Microbiol.** v.31, p.321-326, 2009.

BANDO, E. et al. Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. **Revista Bras. de Patologia Médica.** v. 43, n. 3, p. 175-180, jun. 2007.

BENTO, L.F. et al., Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz,** v.71, p.44-49, 2012.

BEUCHAT, L. R. Traditional fermented food products. In: BEUCHAT, L. R. **Food and beverage mycology.** [s.n]. Westport, 1978. p. 224-253. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?isbn=1420094963>>. Acesso em: 11 dez. 2016.

BOUTSIADOU-THEURILLAT, X.; MEIER, P.; RICHARD, C. Development and in-house Validation of a Rapid LC-MS/MS Method for the semi quantification of eleven mycotoxins in maize samples. **Food analyses,** v.68, n.10, p.716-720, 2014. Disponível em: <www.ingentaconnect.com/content/scs/chimia/2014/.../art00009?...>. Acesso em: 05 nov. 2017.

BRASIL. Portaria n. 07, de 9 de setembro de 1988. **Diário Oficial da União,** Brasília, DF, 9 set. 1988. Disponível em: <<https://www.jusbrasil.com.br/diarios/DOU/1988/11/09>>. Acesso em 10 fev. 2018.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada n. 07, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União,** Brasília, DF, 22 fev. 2011. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_07_2010_COMP.pdf/7041373a-6319-4251-9a03-0e96a72dad3b?version=1.0>. Acesso em: 23 out. 2017.

BÜNZEN, S. & HAESE, D. Controle de micotoxinas na alimentação de aves e suínos. **Revista Eletrônica Nutritime,** v.3, n° 1, p.299-304, 2006. Disponível em: <http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/030V3N1P299_304_JAN2006.pdf>. Acesso em: 09 out. 2017.

FREIRE, F. C. O. et al. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. **Embrapa Agroindústria Tropical.** Fortaleza, 48 p., 2007 Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/cd/jss/acervo/Dc_110.pdf>. Acesso em: 11 dez. 2016.

GRANDE, S.M.B.; NETO, F.R.A. A espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massas EM-EM. **Química Nova,** v. 13, 1990. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol13No3_191_v13_n3_%286%29.pdf>. Acesso em: 29 out. 2017.

GUNTHER, T. M. F.; SUCHARA, E. A.; SCUSSEL, V. M. Avaliação do nível de contaminação por aflatoxinas, zearalenona, esterigmatocistina e ocratoxina A em milho (*Zea mays* L.) cultivado no Estado de Santa Catarina. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 24, 2002, Florianópolis. **Anais...** Sete Lagoas: ABMS/Embrapa Milho e Sorgo/Epagri, 2002. p.125.

HENNIGEN, M. R.; DICK, T. Incidence and abundance of mycotoxins in maize in Rio Grande do Sul. Brazil. **Food Additives and Contaminants,** London, v. 12, n. 5, p. 677-681, 1995. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652039509374356>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

HOERR, F. J. Mycotoxicoses. **Diseases of Poultry** 1997. 1080p. Disponível em: <<https://himakahaunhas.files.wordpress.com/2013/03/disease-of-poultry.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

HUFF, W. E.; KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; JONES, F. T.; HAGLER, W. H. Progression of aflatoxicosis in broiler chickens. **Poultry Science,** v.65, p.1891-1899. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3797371>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

JONES, R. K.; DUNCAN, H. E.; PAYNE, G. A.; LENARD, K. J. Factors influencing infection by *Aspergillus flavus* in silk-inoculated corn. *Plant Disease*, **American Phytopathological Society**, St. Paul, v. 64, n.9, p.859-863, 1980.

KARANARATNE, A.; WEZENBERG, E.; BULLERMAN, L. B. Inhibition of mold growth and aflatoxin production by *Lactobacillus* spp. **Journal of Food Protection**, Des Moines, Iowa, v. 53, n. 3, p. 230-236, 1990.

LILLEHOJ, E. B. et al. Aflatoxin contamination of preharvest corn: role of *Aspergillus flavus* inoculum and insect damage. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 57, n. 4, p. 255-257, 1980.

LILLEHOJ, E. B. et al. Aflatoxin production in *Aspergillus flavus* inoculated ears of corn grown at diverse locations. **Crop Science**, Madinson, v. 15, n. 2, p. 267-270, 1975.

MALDANER, L.; Jardim, Isabel C. S. F. .UHPLC Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 197-207, 2012. Disponível em: <<http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/sc.2012.014>>. Acesso em: 29 out. 2017.

MALLMANN C.A., SANTURIO J.M., WENTZ I. Aflatoxinas - Aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.24, p.635-643, 1994.

MAPA, 2017. Projeções do agronegócio. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/projecoes-do-agronegocio-2017-a-2027-versao-preliminar-25-07-17.pdf/>>. Acesso em: 24 out. 2017.

MARIN, D. E. Changes in performance, blood parameters, humoral and celular immune responses in weanling piglets exposed to lowdoses of aflatoxin. **Revista American. Society of Animal Science**, v. 80, n.5, p. 1250-1257, 2002. Disponível em: <https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/42433935/Changes_in_performance_blood_parameters_20160208-1018-rkntct.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1519516249&Signature=4mxKEJzDSm9C8%2BSlgp%2BoM1X1rzw%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DChanges_in_performance_blood_parameters.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2018.

MARQUES O. J. et al., Incidência fúngica e contaminações por micotoxinas em grãos de milho em função da umidade de colheita. **Act Scient Agro**, 2009;31(4):667-75. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/article/view/5690/5690>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

MAZIERO, M. T; BERSOT, L. DOS S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. v. 12, p. 89-99, 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/228448438_Micotoxinas_em_alimentos_produzidos_no_brasil>. Acesso em: 11 dez. 2016.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A., **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 2006.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista Saúde Pública**. São Paulo, v. 31, n. 4, p. 417-424, ago. 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-89101997000400011&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 11 dez. 2016.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Micotoxinas**, Criterios de Salud Ambiental. Washington, v.11, 131p. 1983. Disponível em:<bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah>. Acesso em: 10 fev. 2018.

PAYNE, G. A. et al. Effect of temperature on the preharvest infection of maize kernels by *Aspergillus flavus*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 10, p. 1376-1380, 1988.

- PRADO, G. et al. Occurrence of aflatoxin B1 in natural products. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 1428-1435, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822012000400026&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 11 dez. 2016.
- RIBEIRO, C.L.N. , BARRETO, S. L. T. , HANNAS, M. I. . Micotoxinas encontradas em rações e alimentos utilizados na produção comercial de aves no Brasil. *Revista Eletrônica Nutritime*, v. 12, p. 3910-3924, n. 2015. Disponível em: <http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/ARTIGO292.pdf>. Acesso em: 29 out. 2017.
- ROSMANINHO, J. F.; OLIVEIRA, C. A. F.; BITTENCOURT, A. B. F. Efeitos das micotoxicoses crônicas na produção avícola. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 2, p. 107-114, 2001. Disponível em: < <http://revistas.bvs-vet.org.br/arqib/article/view/25839/26728>>. Acesso em: 10 fev 2018.
- SABINO, M. Retrospectiva e situação atual das micotoxinas. In: **Encontro Nacional de Micotoxinas**. Piracicaba, v. 11, p. 10-12, 2004.
- SANTURIO, J. M. et al. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em grãos e rações destinados ao consumo animal no Sul do Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 7., 1992, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1992. p. 12.
- SANTURIO J. M., et al., Qualidade micotoxicológica do milho, sorgo e rações produzidos no Brasil. **Anais XXI Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, Embrapa, Londrina, SC, p.132, 1996.
- SANTURIO, J. M. Micotoxinas. Quem está preocupado? **Revista Avicultura Industrial**. Ed. Gessulli, v.03, n.1099, p.16-17, 2002.
- SCHUH, G. et al. Efeitos de dois métodos de secagem sobre a qualidade físico-química de grãos de milho safrinha-RS, armazenados por 6 meses. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, p.235-244, 2011. Disponível em: <www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/download/3601/7190> Acesso em: 09 out. 2017.
- TESSARI, E. N. C. **Efeitos da administração de aflatoxina B1 e fumonisina B1 sobre frangos de corte**. 2004. 134p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia – Área Qualidade e Produtividade Animal) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2004.
- TESSARI, E. N. C., CARDOSO, A. L. S. P. Efeitos da aflatoxina sobre as aves: Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. v.18. 2012. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/IHIMAvHqsVawq5g_2013-6-28-18-13-38.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2018.
- VIQUEZ, O. M. et al. Aflatoxin contamination in corn samples due to environmental conditions, aflatoxinproducing strains, and nutrients in grain grown in Costa Rica. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, American Chemical Society, Washington, v. 42, n. 11, p. 2551-2555, 1994.
- WENTZ, G.N. **Validação de método analítico para a determinação de cloranfenicol em matriz camarão segundo a norma da Comunidade Européia EC 657/2002, por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS/MS)**. 36p. Trabalho de conclusão de curso. Bacharel em Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2010.
- ZLOTOWSKI, P. et al. Surto de aflatoxicose em suínos no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v. 24, n. 4, p. 207-210, dez. 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v24n4/a07v24n4.pdf>>. Acesso em: 11 dez. 2016.
- ZUBER, M. S.; LILLEHOJ, E. B. Status of the aflatoxin problem in corn. **Journal of Environmental Quality**, Madinson, v. 8, n. 1, p. 1-5, 1979.