

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DOIS PLANOS
DE AMOSTRAGEM DE MILHO PARA ANÁLISE DE
MICOTOXINAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ADRIANO OLNEI MALLMANN

Santa Maria, RS, Brasil

2012

COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DOIS PLANOS DE AMOSTRAGEM DE MILHO PARA ANÁLISE DE MICOTOXINAS

Adriano Olnei Mallmann

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DOIS PLANOS DE
AMOSTRAGEM DE MILHO PARA ANÁLISE DE MICOTOXINAS**

elaborada por
Adriano Olnei Mallmann

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Carlos Augusto Mallmann, Dr., UFSM
(Presidente/Orientador)

José Henrique Souza da Silva, Dr., UFSM

Benedito Corrêa, Dr., USP

Santa Maria, 1 de março de 2012.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pelas pessoas boas que fazem parte dela.

À Universidade Federal de Santa Maria e aos professores e funcionários do PPGMV, pela estrutura e qualidade do ensino público e gratuito.

Ao Prof. Carlos Augusto Mallmann, orientador deste trabalho, pela orientação, convívio profissional, amizade, por confiar em minha capacidade para desenvolver este trabalho e pela oportunidade em fazer parte da equipe do LAMIC.

Ao Prof. Paulo Dilkin, pelo convívio, conselhos, sugestões e amizade. Pelas correções, realizadas em conjunto com sua esposa Ania, meu muito obrigado.

Aos meus pais Jacina e João Pedro, pelo exemplo, atenção, conselhos, incentivo, motivação, ajuda e carinho. Aos meus irmãos Fábio e Etiane, pelo companheirismo, apoio e compreensão durante este período.

À Cooperativa Languiru, representada pelo amigo Joel, por ter disponibilizado suas instalações e equipamentos para a colheita das amostras de milho utilizadas neste trabalho.

À CAPES e ao CNPq pela bolsa de estudos e à FAPERGS pelo apoio financeiro.

Aos meus colegas Alexandro e Mateus, pela árdua ajuda concedida na etapa de colheita das amostras, pela amizade e confiança.

A toda equipe do LAMIC, Andressa Scremin, Andressa Caroline, Anelise, Camila, Carlos, Cristiane, Denize, Dima, Fabiana, Fernanda, Francis, Giane, Ielena, Jane, Liziane, Luciane, Luís, Marília, Maurício, Mayara, Mônica, Silvia e a todos que passaram por esse Laboratório, pelo auxílio concedido na execução deste trabalho, pelo convívio, amizade e momentos de descontração.

Ao Ricardo, pela amizade e à incondicional ajuda na análise dos dados e tradução.

Aos amigos do Instituto SAMITEC, Janier, Ivan, Vinícius, André, Diego, Camila, Leandro e Mário, pelos trabalhos em conjunto nesse período, pela amizade e momentos de descontração.

Aos amigos do futebol da segunda e quinta-feira, pela amizade e diversão.

À Luiza, pelo amor, carinho, compreensão e apoio que recebi nesses dois anos de mestrado. Aos meus sogros, Mirian e Juraci, e a Laura, pelos momentos que passamos juntos e ao apoio concedido.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e à minha formação pessoal e profissional, meu muito obrigado!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DOIS PLANOS DE AMOSTRAGEM DE MILHO PARA ANÁLISE DE MICOTOXINAS

Autor: Adriano Olnei Mallmann
Orientador: Carlos Augusto Mallmann
Santa Maria, 1 de março de 2012.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade e o desempenho de dois planos de amostragem de milho para quantificação de micotoxinas. Amostraram-se 11 lotes de milho, através de dois planos de amostragem: o manual, utilizando-se o calador graneleiro e o automático, utilizando-se a amostragem em fluxo contínuo. De cada plano amostral determinaram-se a variabilidade total e as variabilidades das etapas de amostragem, preparação e análise dos resultados de aflatoxinas, fumonisinas e zearalenona em 8, 11 e 5 lotes, respectivamente. Essas variâncias foram comparadas, para cada micotoxina, entre os dois planos de amostragem utilizando a análise de variância multifatorial. As distribuições dos resultados de quantificação das aflatoxinas e zearalenona foram comparadas entre quatro modelos de distribuições teóricas. Determinaram-se as probabilidades de aceitação e rejeição de um lote com determinadas concentrações de aflatoxinas ou zearalenona, utilizando-se a variância e as informações da distribuição selecionada para montar as curvas características de operação (CO). A variância da amostragem e a variância total foram menores no plano de amostragem automático para quantificação de aflatoxinas, fumonisinas e zearalenona. A curva CO do plano de amostragem automático, para quantificação de aflatoxinas e zearalenona reduz os riscos do consumidor e do produtor em relação à curva CO do plano de amostragem manual. O plano de amostragem automático é mais eficiente que o plano de amostragem manual para quantificação de micotoxinas em milho diminuindo, portanto, o erro na classificação de lotes significando, pois, maior segurança nas relações comerciais.

Palavras-chave: Aflatoxinas. Fumonisinas. Zearalenona. Variabilidade. Erro. *Zea mays*.

ABSTRACT

Master`s Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

EFFICIENCY COMPARISON OF TWO SAMPLING PLANS FOR MYCOTOXIN ANALYSIS IN MAIZE

Author: Adriano Olnei Mallmann
Adviser: Carlos Augusto Mallmann
Santa Maria, March 1st, 2012.

The aim of this research was to evaluate variability and performance of two maize sampling plans for mycotoxins quantification. Eleven maize lots were sampled using two distinct sampling methods: manual, using a sampling spear, and automatic, using a continuous flow sampling. Total variability and variability from each step of the analysis procedure (sampling, sample preparation, and analysis) for results of aflatoxins, fumonisin, and zearalenone were determined in 8, 11, and 5 lots respectively for each sampling plan. Those variances were compared, for each mycotoxin, between the two sampling plans using a multifactor analysis of variance. Distribution of the quantification results for aflatoxins and zearalenone were compared among four theoretical distribution models. The acceptance/rejection probabilities of a lot with determined aflatoxins or zearalenone concentration were determined using calculated variances and the information on the selected distribution to plot an operation characteristic curve (OC). Sampling and total variances were lower on the automatic sampling plan for aflatoxins, fumonisins, and zearalenone quantification. The OC curve from automatic sampling plan for aflatoxins and zearalenone quantification reduces the consumer end seller risks when compared with the OC curve from the manual sampling plan. The automatic sampling plan is more efficient than the manual one for mycotoxins quantification in maize, reducing lot classification error, and providing more safety in commercial transactions.

Key words: Aflatoxins, Fumonisin, Zearalenone, Variances, Error, *Zea mays*.

LISTA DE FIGURAS

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1- Erros envolvidos no procedimento de quantificação de micotoxinas..... 16

3. CAPÍTULO I.

Figura 1- Amostragem Automática em Fluxo Contínuo (AAFC) de farelo de milho para análise de fumonisinas (B1+B2). 1- Vista lateral: As setas (A e B) indicam o fluxo do farelo de milho na rosca transportadora. Os incrementos foram coletados através do tubo C e armazenados no recipiente D (amostra coletiva). 2- Corte transversal: Os incrementos saem pelo furo E de 17,5 mm de diâmetro, localizado num ângulo de 45° a partir da base do lado direito da tubulação externa da rosca transportadora, levando-se em consideração o sentido do fluxo do farelo de milho 33

4. CAPÍTULO II.

Figura 1 - Curva característica de operação (CO) para estimar a probabilidade de aceitação/rejeição de lotes e avaliar os riscos do produtor/vendedor e consumidor/comprador, conforme Miraglia *et al.* (9) 50

Figura 2 - Média das variâncias atribuídas às etapas do procedimento de quantificação de aflatoxinas em milho (amostragem, preparação e análise) dos planos de amostragem manual e automático..... 51

Figura 3 - Curvas características operacionais (CO) dos planos de amostragem manual e automático para quantificação de aflatoxinas em milho, com probabilidades de aceitação observadas a um limite de aceitação/rejeição de 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 52

5. CAPÍTULO III.

Figura 1 - Média das variâncias atribuídas às etapas do procedimento de quantificação de zearalenona em milho (amostragem, preparação e análise) nos planos de amostragem manual e automático..... 70

Figura 2 - Curvas características operacionais (CO) dos planos de amostragem manual e automático para quantificação de zearalenona em milho, com probabilidades de aceitação observadas e estimadas a um limite de aceitação/rejeição de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 71

LISTA DE TABELAS

3. CAPÍTULO I.

- Tabela 1- Média de concentração de fumonisinas e coeficiente de variação dos resultados das concentrações de fumonisinas em cada plano de amostragem por lote de milho, com as respectivas variâncias associadas às etapas de amostragem, preparação de amostras, análise e variância total 31
- Tabela 2- Média das variâncias em cada etapa do procedimento de quantificação de fumonisinas (amostragem, preparação e análise) nos planos de amostragem manual e automático e equações de regressão das variâncias em relação à média de contaminação por fumonisinas em cada lote de milho 32

4. CAPÍTULO II.

- Tabela 1- Média e mediana de concentração de aflatoxinas, coeficiente de variação e variâncias da amostragem, preparação, análise e total por lote de milho e plano de amostragem 48
- Tabela 2- Probabilidades do teste Chi-quadrado nas distribuições normal, lognormal, gamma e Weibull dos resultados de quantificação de aflatoxinas em oito lotes de milho nos dois planos de amostragem avaliados 49

5. CAPÍTULO III.

- Tabela 1- Média e mediana de concentração de zearalenona, coeficiente de variação e variâncias da amostragem, preparação, análise e total por lote de milho e plano de amostragem 67
- Tabela 2- Equações para estimativa da variância da amostragem, preparação, análise e total nos dois planos de amostragem de milho para quantificação de zearalenona 68
- Tabela 3- Probabilidades do teste Chi-quadrado para as distribuições normal, lognormal, gamma e Weibull dos resultados de quantificação de zearalenona em cinco lotes de milho nos dois planos de amostragem avaliados 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAFC	Amostragem Automática em Fluxo Contínuo
A_c	Amostra Coletiva
ANOVA	Análise de variância
A_w	Atividade de água
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO	Curva Característica de Operação
CV	Coefficiente de Variação residual (%)
DPRr	Desvio Padrão Relativo de repetibilidade
EC	European Commission
FAO	Food and Agriculture Organization
FAPERGS	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
IARC	International Agency for Research on Cancer
LAMIC	Laboratório de Análises Micotoxicológicas
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas
LMT	Limite Máximo Tolerável
LN	Logaritmo Natural
R^2	Coefficiente de determinação
rpm	Rotações por minuto
$S^2_{(am)}$	Variância da amostragem
$S^2_{(am) \text{ automático}}$	Variância da amostragem do plano de amostragem automático
$S^2_{(am) \text{ manual}}$	Variância da amostragem do plano de amostragem manual
$S^2_{(an)}$	Variância da análise
$S^2_{(pr)}$	Variância da preparação
$S^2_{(t)}$	Variância total
$S^2_{(t) \text{ automático}}$	Variância total do plano de amostragem automático
$S^2_{(t) \text{ manual}}$	Variância total do plano de amostragem manual
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
X	Média de concentração de micotoxina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. Micotoxinas e a contaminação no Milho	11
2.1.1. Aflatoxinas	12
2.1.2. Fumonisinias.....	12
2.1.3. Zearalenona	13
2.2. Amostragem para análise de micotoxinas	14
3. CAPÍTULO I. COMPARAÇÃO DE DOIS PLANOS DE AMOSTRAGEM PARA ANÁLISE DE FUMONISINAS EM MILHO.....	18
Resumo	19
Abstract	19
Introdução	20
Material e Métodos.....	21
Resultados e Discussão	24
Conclusão	26
Referências	26
4. CAPÍTULO II. COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DOIS PLANOS DE AMOSTRAGEM DE MILHO PARA ANÁLISE DE AFLATOXINAS.....	34
Resumo	35
Introdução	35
Materiais e Métodos	37
Resultados e Discussão	41
Conclusões	45
Referências	45
5. CAPÍTULO III. COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DOIS PLANOS DE AMOSTRAGEM DE MILHO PARA ANÁLISE DE ZEARALENONA.....	53
Resumo	54
Abstract	54
Introdução	55
Materiais e Métodos	56
Resultados e Discussão	60
Conclusão	62
Referências	63
6. CONCLUSÕES	72
7. REFERÊNCIAS	73

1. INTRODUÇÃO

O procedimento de amostragem, prévio à atividade laboratorial, pode ser responsável pelo sucesso ou fracasso de uma informação analítica. Naturalmente, as micotoxinas têm uma distribuição heterogênea no lote de alimentos, ou seja, podem estar altamente concentradas em uma pequena porcentagem dos grãos do lote. O conhecimento ou o estabelecimento prévio dos erros envolvidos na amostragem torna-se essencial para que todo procedimento de quantificação não seja inválido.

A eficiência na determinação de micotoxinas é importante para a segurança alimentar, pois erros nos resultados analíticos podem acarretar classificação incorreta de lotes de grãos e alimentos. Se o resultado for acima do limite máximo de micotoxinas permitido, o lote deverá ser rejeitado, e se o resultado for igual ou menor que o limite permitido, será aceito.

Este estudo é composto por três capítulos, nos quais estão apresentados resultados da comparação da eficiência de dois planos de amostragem de milho para análise de aflatoxinas, fumonisinas e zearalenona. O primeiro, segundo e terceiro capítulo, têm como objetivos estimar e comparar a variabilidade em cada etapa de cada plano de amostragem de milho para análise de fumonisinas, aflatoxinas e zearalenona, respectivamente. Além de que, no segundo e terceiro capítulo, os objetivos também foram desenvolver curvas características operacionais (CO) para cada plano de amostragem.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Micotoxinas e a contaminação no milho

Micotoxinas são substâncias resultantes do metabolismo secundário de diversas linhagens de fungos filamentosos. São de ocorrência mundial, porém predominam em regiões de climas tropicais e subtropicais, onde o desenvolvimento fúngico é favorecido pelas condições de umidade e temperatura (MALLMANN & DILKIN, 2007). Quando as micotoxinas são ingeridas, tanto pelo homem como por animais, podem produzir diversos efeitos deletérios à saúde, sobretudo pelas suas propriedades carcinogênicas, teratogênicas, estrogênicas, anabolizantes, mutagênicas e hemorrágicas (KUMAR et al., 2008).

A importância econômica do milho é caracterizada pelas diversas formas de sua utilização, que vão desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia. O uso do milho em grão na alimentação animal representa a maior parte do consumo deste cereal. Nos Estados Unidos, cerca de 50% é destinado para esse fim, enquanto que no Brasil varia de 60 a 80%, dependendo da fonte da estimativa e do ano (EMBRAPA, 2011). O milho é o principal ingrediente que compõem uma formulação de ração para aves e suínos, com alto percentual de inclusão, o qual pode chegar a 60% (ROSTAGNO et al., 2011). Na alimentação humana, o milho é ingrediente na fabricação de balas, biscoitos, pães, chocolates, geléias, cerveja, entre outros (MILHO, 2012). No entanto, esse cereal está frequentemente contaminado por diversas micotoxinas (MAZIERO & BERSOT, 2010), dentre elas, as aflatoxinas, fumonisinas, zearalenona, entre outras.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabelece os limites máximos toleráveis (LMT) para micotoxinas em alimentos (ANVISA, 2011). Para aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) em milho, o LMT estabelecido é de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$. Para produtos a base de milho, a contaminação máxima permitida por fumonisinas (B_1+B_2) é de $2500 \mu\text{g kg}^{-1}$. O LMT para contaminações com zearalenona em produtos a base de milho, é de $300 \mu\text{g kg}^{-1}$.

2.1.1. Aflatoxinas

As aflatoxinas são metabólitos tóxicos secundários produzidos por cepas de fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente das espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* (RICHARD, 2007). Em climas tropicais e subtropicais, o desenvolvimento desses fungos é favorecido pela presença de umidade e temperatura elevada. Nesse ambiente os fungos crescem e proliferam-se bem em diversos produtos alimentícios, como amendoim, milho, feijão, trigo, entre outros (SANCHIS & MAGAN, 2004). Em milho armazenado, os fatores mais importantes para o crescimento de fungos toxígenos do gênero *Aspergillus* e a produção de aflatoxinas são a temperatura de armazenamento, a umidade relativa do ar e do substrato. Umidade relativa de 80 a 85% com 17% de umidade do milho e temperatura de 24 a 35° C são condições ótimas para produção de aflatoxinas (DILKIN et al., 2000).

Atualmente são conhecidos 18 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém, os principais são identificados como B₁, B₂, G₁ e G₂ (RICHARD, 2007), na qual a B₁ é a mais tóxica. Nos últimos 5 anos, no Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), foram analisadas 30.552 amostras de milho, oriundas em sua maioria da região Sul do Brasil. A média de contaminação destas amostras foi de 6,1 µg kg⁻¹, com ocorrência em 40,2% das amostras e média de 15,1 µg kg⁻¹ nas amostras contaminadas (LAMIC, 2012).

As aflatoxinas são hepatotóxicas e a susceptibilidade aos seus efeitos varia conforme a raça, espécie, idade, dose, duração da exposição e estado nutricional (MALLMANN & DILKIN, 2007). As aflatoxinas podem causar diminuição da produção de leite, ovos, ganho de peso, imunossupressão, carcinogenicidade, teratogenicidade e mutagenicidade (MILLER & WILSON, 1994). A Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC) classificou a aflatoxina B₁ no grupo I de carcinógenos humanos (IARC, 1993a).

2.1.2. Fumonisinias

As fumonisinias são produzidas por fungos principalmente do gênero *Fusarium* como o *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (ALMEIDA et al., 2005). Os fungos do gênero *Fusarium* se desenvolvem e produzem as maiores quantidades de fumonisinias em condições de clima

com temperatura amena, entre 15 e 25° C, e alto teor de umidade do substrato, acima de 20% ou atividade de água (A_w) superior a 0,9. Por essas características esses fungos são frequentemente denominados de “fungos de campo”, pois as maiores concentrações das micotoxinas são observadas em cereais que ficam expostos na lavoura a essas condições favoráveis para o desenvolvimento fúngico (JACKSON & JABLONSKI, 2004; MALLMANN & DILKIN, 2007). Os produtos agrícolas frequentemente contaminados por fumonisinas são: trigo, sorgo, arroz e principalmente o milho e seus derivados (JACKSON & JABLONSKI, 2004).

Existem 28 moléculas que foram isoladas e caracterizadas como fumonisinas sendo representadas principalmente pela fumonisina B_1 . Essa é responsável por cerca de 70% do total das fumonisinas quantificadas em cereais e subprodutos. A fumonisina B_2 e fumonisina B_3 ocorrem conjuntamente em menores proporções. Normalmente, apenas as fumonisinas B_1 , B_2 e B_3 são detectadas quando a produção de fumonisinas ocorre em condições naturais (RHEEDER et al., 2002; KRŠKA et al., 2007). Estatísticas do LAMIC, resultantes da análise de amostras enviadas para análise no período de 2007 a 2011, apontam o milho como produto com maior índice de contaminação por fumonisinas. Nas 19.914 amostras de milho analisadas, constatou-se a presença de fumonisinas em 82,1% das amostras, com contaminação média de 2.187 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e de 2.662,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para as amostras positivas (LAMIC, 2012).

A fumonisina B_1 demonstrou ser hepatotóxica a todas as espécies animais estudadas até agora (JASKIEWICS et al., 1987; DILKIN et al., 2003), além de que pode induzir a leucoencefalomalácia em equinos (LEME) (MARASAS et al., 1988) e edema pulmonar em suínos (EPS) (DILKIN et al., 2004). Nos seres humanos, a fumonisina B_1 tem sido associada com câncer de esôfago (RHEEDER et al., 1992). Com base em dados toxicológicos, a IARC estabeleceu que a fumonisina B_1 é potencialmente carcinogênica (classe 2B) para os seres humanos (IARC, 1993b).

2.1.3. Zearalenona

A zearalenona é um metabólito fúngico estrogênico não esteróide, uma micotoxina produzida por cepas de várias espécies do gênero *Fusarium*, incluindo: *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum* e *F. moniliforme* (ALLDRICK & HAJŠELOVÁ, 2004). Essas

espécies colonizam cereais e tendem a tornarem-se particularmente importantes durante estações de alta umidade, acompanhadas de temperaturas amenas. Oscilações térmicas com temperaturas baixas são propícias para a produção de grande quantidade desta micotoxina. Temperaturas na faixa de 25° C favorecem o crescimento fúngico enquanto que sua redução para aproximadamente 10° C em presença de umidade superior a 17%, desencadeia o metabolismo secundário, responsável pela produção de zearalenona (MALLMANN & DILKIN, 2007). Embora a zearalenona seja considerada uma micotoxina produzida por fungos de campo, há evidências de que ela também pode ser produzida em grãos armazenados, quando da presença de alta umidade relativa (ALLDRICK & HAJŠELOVÁ, 2004, DESJARDINS, 2006). Em comum com outras toxinas produzidas por *Fusarium* spp., a zearalenona é associada principalmente com as culturas de cereais como cevada, aveia, trigo, arroz, sorgo e particularmente o milho em diversos países do mundo (KUIPER-GOODMAN et al., 1987).

Resultados das análises realizadas pelo LAMIC nos últimos 5 anos, referentes a 17.264 amostras de milho, demonstraram contaminação em 50,9% das amostras. A concentração média de zearalenona encontrada foi de 85,0 µg/kg, enquanto a média de concentração das amostras positivas foi de 167,0 µg/kg (LAMIC, 2012).

Apesar de sua baixa toxicidade aguda e carcinogenicidade, a zearalenona tem sido associada à micotoxicoses em animais de produção, especialmente em suínos, devido ao seu efeito agonista no receptor de estrogênio (KUIPER-GOODMAN et al., 1987; ANDRETTA et al., 2008). Os efeitos patológicos mais comuns são anestro, aborto, aumento de morte embrionária e fetal fracasso, de programas de indução com PGF_{2α} (ALEXOPOULOS, 2001), e um aumento da incidência de natimortos e *splay leg* em leitões (ETIENNE & JEMMALI, 1982; EDWARDS et al., 1987). A IARC avaliou o potencial carcinogênico da zearalenona e concluiu não haver evidências suficientes de carcinogenicidade em animais experimentais, classificando-a como não carcinogênica para humanos (grupo 3) (IARC, 1993c).

2.2. Amostragem para análise de micotoxinas

De acordo com a legislação Europeia, EC nº 401/2006, o controle de micotoxinas em alimentos está baseado em limites máximos de concentração, os quais variam de acordo com o tipo de micotoxina e alimento. Baseado nesses valores, os lotes são aceitos ou rejeitados,

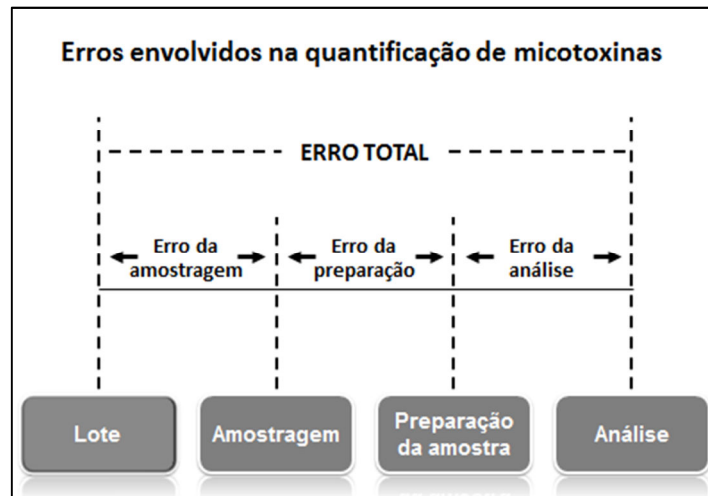
sempre que estiverem abaixo ou acima dos níveis máximos de contaminação, respectivamente. No entanto, devido à enorme variabilidade na distribuição das micotoxinas dentro de um lote, é crucial que seja empregado um plano de amostragem que seja eficaz.

Segundo a EC nº 401/2006, tratando-se de métodos de amostragem para análise de micotoxinas, devem-se seguir as seguintes definições:

- Lote: é uma quantidade de matéria-prima ou de alimento, entregue de uma vez, que apresenta, conforme estabelecido pelo agente responsável, características comuns tais como a origem, a variedade, o tipo de embalagem, o embalador, o expedidor ou a marcação;
- Sublote: é a divisão do lote em porções menores, a fim de restringir e facilitar o processo de amostragem. Deve estar fisicamente separado e identificado;
- Incremento: é a quantidade de material colhida de um local do lote ou sublote.
- Amostra coletiva: resulta da soma de todos os incrementos pegos de um lote ou sublote e;
- Amostra de laboratório: amostra destinada ao laboratório.

Segundo WHITAKER (2011), ao definir um plano de amostragem para análises micotoxicológicas devem-se levar em consideração os procedimentos a serem utilizados para quantificação. Esses procedimentos são constituídos de três fases: uma fase que compreende a própria amostragem, uma de preparação das amostras e finalmente, uma fase de análise. A fase de amostragem consiste em selecionar uma amostra com determinado volume, de acordo com o tamanho do lote. A segunda etapa consiste na preparação, que é dividida em dois pontos: moagem da amostra e subamostragem. A fase de análise é o emprego de metodologias analíticas, onde será determinada a concentração das micotoxinas da amostra representativa do lote. Cada fase do procedimento de quantificação está associada a um nível específico de erro e, conseqüentemente, não é possível estabelecer o valor verdadeiro da contaminação por micotoxinas em um lote (Figura 1). A indicação da eficiência de um procedimento de análise pode ser medida pela variação em cada uma de suas fases. A variação total que constitui o erro é o resultado da soma da variância da amostragem, da variância da preparação da amostra e da variância da análise.

Para exemplificar a complexidade do problema, WHITAKER et al. (2006) avaliaram 20 lotes de amêndoas suspeitos de contaminação por aflatoxinas. O percentual de variação representado pelas fases de amostragem, subamostragem e análise na variação total foi de 96,2, 3,6 e 0,2%, respectivamente. O erro na fase de amostragem é grande porque geralmente as aflatoxinas são encontradas somente em percentagens inferiores a 0,1% dos grãos de determinado lote. Porém, nesta porção a concentração poderá ser extremamente alta (JOHANSSON et al., 2000).



Adaptado de WHITAKER et al. (2011)

Figura 1. Erros envolvidos no procedimento de quantificação de micotoxinas.

As estratégias de amostragem podem ser estáticas ou dinâmicas. No primeiro caso, geralmente quando os cereais estão armazenados em containers ou em caixas de armazenagem, se opta pela colheita manual das amostras (WHITAKER, 2006). Os equipamentos utilizados para a colheita manual das amostras de milho consistem de pás, conchas de bordos retangulares, caladores ou equipamentos pneumáticos compatíveis com o tamanho do lote e das partículas do material a ser amostrado. É importante que esses materiais tenham o comprimento necessário para alcançar o fundo do recipiente armazenador e que o procedimento de colheita de amostras ocorra em diferentes locais e profundidades do lote (MALLMANN & DILKIN, 2007). Já no caso da estratégia dinâmica, geralmente emprega-se a amostragem automática. Ela é utilizada para cereais já moídos, que estão sendo transferidos de um local para outro. Pequenos incrementos são colhidos ao longo do transporte deste material, que ocorre geralmente por roscas transportadoras (caracóis) (WHITAKER et al. 2011).

Em muitas indústrias alimentícias, como em fábricas de ração, as duas estratégias são adotadas em momentos diversos. A colheita manual acontece no recebimento da matéria-prima, chamada de amostragem de recebimento (MALLMANN & DILKIN, 2007). O uso dessa estratégia visa obtenção de dados antecipados sobre o futuro, permitindo assim um planejamento prévio (MALLMANN et al., 2011). No entanto, o maior problema desse tipo de procedimento consiste na dificuldade de homogeneizar corretamente a amostra de grãos, e ainda, a colheita de grãos inteiros aumenta a possibilidade do erro amostral (FAO, 1993). A

outra possibilidade de tomadas de amostras ocorre depois da moagem, no processamento final dos cereais, utilizando a amostragem automática. Esta colheita é chamada de amostragem de produção. Ela permite a verificação de toda a contaminação que ocorreu na matéria prima durante o processo de cultivo, colheita, transporte, secagem, armazenamento e beneficiamento (MALLMANN & DILKIN, 2007).

Devido à inexistência de dados de comparação entre a prática amostral manual e automática, podem estar ocorrendo erros comprometedores, seja pelo aspecto de segurança alimentar e/ou bem-estar animal, como também pela elevação dos custos de produção com a utilização de aditivos antimicotoxinas ou o descarte de milho com contaminação abaixo dos limites estabelecidos por legislação.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir dos trabalhos desenvolvidos permitem concluir que:

1. A etapa de amostragem contribui com a maior variabilidade dos resultados de quantificação de aflatoxinas, fumonisinas e zearalenona em milho, seguida pelas etapas de preparação e análise;
2. As variâncias (erros) associadas aos procedimentos de quantificação de micotoxinas nas etapas de amostragem, preparação da amostra e análise aumentam com o aumento da concentração de micotoxinas no milho;
3. O plano de amostragem automático reduz a variância total, dos resultados de aflatoxinas, fumonisinas e zearalenona, bem como as variâncias associadas à etapa de amostragem, em comparação ao plano de amostragem manual, comprovando a melhor eficiência da amostragem em fluxo contínuo;
4. As curvas CO do plano de amostragem automático para quantificação de aflatoxinas e zearalenona reduzem os riscos do produtor/vendedor e do consumidor/comprador em relação às curvas CO do plano de amostragem manual.
5. A amostragem automática em fluxo contínuo para quantificação de micotoxinas diminui o erro na classificação de lotes de milho, conferindo maior segurança alimentar e nas relações comerciais.

7. REFERÊNCIAS

ALEXOPOULOS, C. Association of *Fusarium* mycotoxicosis with failure in applying an induction of parturition program with PGF₂alpha and oxytocin in sows. **Theriogenology**, v. 55, n. 5, p. 1745-1757, May. 2001.

ALLDRICK, A.J.; HAJŠELOVÁ, M. Zearalenone. In: MAGAN, N.; OLSEN, M. (Org.). **Mycotoxins in food**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2004. cap.15, p.353-366.

ALMEIDA, A.P. et al. Milho recém-colhido no Brasil: interação da microbiota fúngica, fatores abióticos e ocorrência de micotoxinas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 1, p. 1-9, jan./jun. 2005.

ANDRETTA, I. et al. Alimentação de leitoas pré-púberes com dietas contendo zearalenona. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 5, p. 1227-1233, out. 2008.

DESJARDINS, A.E. ***Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics and biology**. Minnesota: APS Press, 2006. 260 p.

DILKIN, P. et al. Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de aflatoxinas em híbridos de milho. **Ciência Rural**, v. 1, n. 1, p. 137-141, jan./fev. 2000.

DILKIN, P. et al. Toxicological effects of chronic low doses of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ containing *Fusarium moniliforme* culture material in weaned piglets. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 10, p. 1345-1353, Oct. 2003.

DILKIN, P. et al. Intoxicação experimental de suínos por fumonisinas. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 175-181, jan./fev. 2004.

EDWARDS, S. et al. The effects of zearalenone on reproduction in swine. I. The relationship between ingested zearalenone dose and anestrus in non-pregnant sexually mature gilts. **Theriogenology**, v. 28, n. 1, p. 43-49, Jul. 1987.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cultivo do Milho**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/importancia.htm>>. Acesso em: 09 dez. 2011.

ETIENNE, M.; JEMMALI, M. Effects of zearalenone (F2) on estrus activity and reproduction in gilts. **Journal of Animal Science**, v. 55, n. 1, p. 1-10, Jul. 1982.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation EC n° 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, L 70/12.

FAO. Food and Agriculture Organization. **Sampling plans for aflatoxin analysis in peanuts and corn**. FAO Food and Nutrition. Paper 55, FAO, Viale Della Terme di Caracalla 00100, Rome, Italy, p. 27-56, 1993.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Aflatoxins: occurring aflatoxins (group 1), aflatoxin M₁ (group 2B). **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, Lyon: IARC, v. 56, p. 245. 1993a.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Toxins derived from *Fusarium moniliforme*: Fumonisin B₁ and B₂ and Fusarin C (group 2B). **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, Lyon: IARC, v. 56, p. 445. 1993b.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Toxins derived from *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. crookwellense*: zearalenone, deoxynivalenol, nivalenol and fusarenone x (group 3). **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, Lyon: IARC, v. 56, p. 397. 1993c.

JACKSON, L.; JABLONSKI, J. Fumonisin. In: MAGAN, N.; OLSEN, M. (Org.). **Mycotoxins in food**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2004. cap.16, p. 367-391.

JASKIEWICS, K. et al. Carcinogenicity of *Fusarium moniliforme* culture material in rats. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 78, n. 2, p. 321-325, Feb. 1987.

JOHANSSON, A.S.; WHITAKER, T.B.; GIESBRECHT, F.G.; HAGLER, W.M; YOUNG, J.H. Testing shelled corn for aflatoxin, part II: modeling the distribution of aflatoxin test results. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 83, n. 5, p. 1270-1278, Sep./Oct. 2000.

KRSKA, R.; WELZIG, E.; BOUDRA, H. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3-4, p. 241-264, Oct. 2007.

KUIPER-GOODMAN, T. et al. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 7, n. 3, p. 253-306, Sep. 1987.

KUMAR, V. et al. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection**, v. 27, n. 6, p. 891–905, Jun. 2008.

LAMIC. Laboratório de Análises Micotoxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. Tabelas de resultados, 2012. Disponível em: <<http://www.lamic.ufsm.br>>. Acesso em: 29 jan. 2012.

MALLMANN, C.A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos**. Santa Maria: Pallotti, 2007. 238 p.

MALLMANN, C.A. et al. Importância da amostragem para análise de micotoxinas. **Revista Avicultura Industrial**, ed. 1205, n. 10, p. 42-47, 2011. Disponível em: <<http://www.mflip.com.br/pub/ediagro//index.jsp?edicao=1024>>. Acesso em: 01 fev. 2012.

MARASAS, W.F. et al. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 4, p. 197-203, Dec. 1988.

MAZIERO, M.T.; BERSOT, L.S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p.89-99, jan. 2010.

MILHO. Disponível em: <<http://www.brasilecola.com/saude/milho.htm>>. Acesso em: 28 jan. 2012.

MILLER, D.M.; WILSON, D.M. Veterinary diseases related to aflatoxin. In: EATON, D.L.; GROOPMAN, J.D. (Org.). **The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance**. San Diego: Academic Press, 1994. p. 347-364.

RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, v. 82, n. 3, p. 353-357, Mar. 1992.

RHEEDER, J.P., MARASAS, W.F.O., VISMER, H.F. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, 2101-2105, May. 2002.

RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their micotoxicoses - An overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1-2, p. 3-10, Oct. 2007.

ROSTAGNO, H.S. et al. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos - Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais**. 3. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. 252 p.

SANCHIS, V.; MAGAN, N. Environmental conditions affecting mycotoxins. In: MAGAN, N.; OLSEN, M. **Mycotoxins in food**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2004. cap.8, p. 174-186.

WHITAKER, T.B. Sampling food for mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, n. 1, p. 50-61, Jan. 2006.

WHITAKER, T.B. et al. Sampling almonds for aflatoxin, part I: estimation of uncertainty associated with sampling, sample preparation, and analysis. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 89, n. 4, p. 1027-1034, Jul./Aug. 2006.

WHITAKER, T.B. et al. **Sampling procedures to detect mycotoxins in agricultural commodities**. New York: Springer, 2011. 58 p.