



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS
NÍVEL MESTRADO

GENIVALDO CRUZ SANTOS

**MICROBIOTA CONTAMINANTE E OCORRÊNCIA DE
AFLATOXINAS EM FARINHA DE MILHO FLOCADA PRÉ-
COZIDA COMERCIALIZADA EM DIFERENTES MUNICÍPIOS
DO ESTADO DA BAHIA**

Salvador
2008

GENIVALDO CRUZ SANTOS

**MICROBIOTA CONTAMINANTE E OCORRÊNCIA DE
AFLATOXINAS EM FARINHA DE MILHO FLOCADA PRÉ-
COZIDA COMERCIALIZADA EM DIFERENTES MUNICÍPIOS
DO ESTADO DA BAHIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Maria da P. Spínola Miranda

Co-orientadora: Profa. Dra. Tânia Fraga Barros.

Salvador
2008

Biblioteca Central Reitor Macêdo Costa - UFBA

S237 Santos, Genivaldo Cruz.

Micobiota contaminante e ocorrência de aflatoxinas em farinha de milho flocada pré-cozida comercializada em diferentes municípios do Estado da Bahia / Genivaldo Cruz Santos. - 2008.

104 f. : il.

Inclui anexos.

Orientadora : Profª Drª Maria da P. Spínola Miranda.

Co-orientadora : Profª Drª Tânia Fraga Barros.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia, 2008.

1. Milho - Produtos - Indústria. 2. Milho - Qualidade. 3. Fungos toxígenos.
4. Afloxinas. I. Miranda, Maria da P. Spínola. II. Barros, Tânia Fraga.
III. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD - 632.4
CDU - 582.28



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS
NÍVEL MESTRADO

TERMO DE APROVAÇÃO

GENIVALDO CRUZ SANTOS

MICROBIOTA CONTAMINANTE E OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS EM FARINHA DE MILHO FLOCADA PRÉ-COZIDA COMERCIALIZADA EM DIFERENTES MUNICÍPIOS DO ESTADO DA BAHIA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos – Nível Mestrado - da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 14 de agosto de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria da P. Spínola Miranda

Universidade Federal da Bahia
Orientadora

Profa. Aláise Gil Guimarães

Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Laurival Antonio Vilas Boas

Universidade Federal da Bahia

À

Família, amigos(as), alunos(as) e companheiros(as) de Partido pela paciência, compreensão, incentivo, dedicação, orientação e confiança.

Crisley, minha fonte de inspiração e firmeza.

Amélia, mãe incomparável.

José Santiago, pai querido e inesquecível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS que nos momentos difíceis sempre me mostrou o caminho da luz.

A Midian e Neide Sales pelo incentivo, as reflexões, a ajuda incondicional, sem palavras...

A família, em especial a Jailton, Ana Francisca e Cristina, pelo apoio, carinho e dedicação.

À Maria Spínola Miranda, orientadora querida, pela inestimável colaboração, sempre atenciosa, amiga, cuidadosa, paciente e receptiva, um raro ser humano.

À Tânia Fraga Barros, co-orientadora espetacular, pela inestimável colaboração, amiga, sempre acreditou no meu potencial, sempre cúmplice nos conhecimentos acadêmicos, sem você seria muito difícil..., lágrimas!

Ao Prof. Benedito Correa pelo estágio no Laboratório de Micotoxinas do Instituto de Ciências Biomédicas II – USP.

A Mônica pela receptividade e atenção durante o estágio no Laboratório de Micotoxinas.

A Holanda, Robson e Priscila (especialmente) pela atenção e profissionalismo.

Ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Ciência de Alimentos pelos ensinamentos, em especial à Prof.^a Alaise Gil Guimarães e Prof. Celso Duarte C. Filho.

Aos colegas da 1^a turma do Curso Mestrado em Ciência de Alimentos pelo companheirismo e amizade.

Ao Prof. Eudes Veloso e ao colega Luiz Alberto pelo apoio laboratorial.

Às alunas bolsistas Nayane e Elaine fundamentais para o andamento dos experimentos microbiológicos e físico-químicos, respectivamente.

Às alunas do Laboratório da Prof.^a Tânia pela receptividade, pela preparação dos materiais para o experimento microbiológico e companheirismo.

À Claudinha, Carol, Luiza, Dominginhos, Cristina, Prof.^a Tânia, Prof.^a Mara, Midian e a todas as pessoas que adquiriram para mim as amostras de farinha de milho.

À colega Margaret pela importante contribuição com as análises estatísticas.

À Joseane (Ninha) pelo apoio moral.

À Prof.^a Solange Dias e ao Prof. Adroaldo pelas traduções dos textos.

A todos (as) que direta ou indiretamente contribuíram para que eu pudesse alcançar mais uma vitória na minha vida pessoal e profissional.

Pesquisa é teoria em ato.
(Pierre Bordieu)

*Não há ensino sem pesquisa e
pesquisa sem ensino.*
(Paulo Freire)

*Chega-se sim, aos
grandes temas metafísicos (o amor,
a vida, a morte, Deus) através do
caminho da ciência.*
(Iván Izquierdo)

*Educação é um investimento em longo
prazo, com retorno garantido.*
(Professor Genivaldo)

RESUMO

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos e representam um risco potencial para a saúde humana, quando presentes nos alimentos. Dentre as micotoxinas, as aflatoxinas são as mais importantes e mais estudadas. O milho e seus derivados, especialmente a farinha de milho estão entre os principais alimentos encontrados na dieta básica dos brasileiros, particularmente na Bahia. Existem poucos estudos no Estado voltados para a pesquisa de micotoxinas em alimentos derivados do milho. A presença de fungos toxígenos em farinha de milho não se configura necessariamente na presença de micotoxinas, mas representa um alerta para uma maior atenção às práticas agrícolas, tanto na escolha do grão para o plantio, na colheita do milho, no transporte, no processamento para formar a farinha, no armazenamento, como na comercialização deste produto. Os fungos mais freqüentemente isolados em derivados do milho são o *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp e *Fusarium* spp. A aflatoxina B1 (AFB1) é um potente carcinógeno classificado como pertencente ao grupo 1 das substâncias potencialmente cancerígenas. O consumo de farinhas de milho flocada pré-cozida com características micotoxicológicas indesejáveis pode ser um perigo para a saúde humana. Tendo em vista a importância dos fungos toxígenos e das micotoxinas, este trabalho teve por objetivo verificar a ocorrência de fungos toxígenos e de aflatoxinas em 112 amostras de farinha de milho flocada pré-cozida comercializada em diferentes municípios do Estado da Bahia no período de junho de 2007 a junho de 2008. As amostras estudadas foram analisadas para isolamento e contagem de fungos em BDA com cloranfenicol. 32% das amostras foram positivas para fungos toxígenos, sendo 50% representados por fungos de armazenamento, 31% de campo e 17% de ambos. Os fungos do gênero *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* foram encontrados com maior freqüência nas amostras que apresentaram atividade de água na faixa entre 0,52-0,60. 58% das amostras com contaminação fúngica estavam acondicionadas em embalagem de papel. Em relação à presença de aflatoxinas, 14% (16/112) das amostras foram positivas, onde 5% (6/112) apresentaram concentrações acima do limite máximo preconizado na Legislação (20µg/Kg). Os fungos do gênero *Aspergillus* encontravam-se presentes em 44,4% (16/36) das amostras analisadas. Deste gênero foram isoladas e identificadas três espécies: *A. fumigatus* 27,8% (10/36), *A. flavus* 22,2% (8/36) e *A. terreus* 2,8% (1/36). A análise do potencial toxígeno de 28 isolados de *Aspergillus* spp. revelou a presença de aflatoxinas em 50% (14/28) das cepas, numa concentração de 24,29 µg/Kg a 6.222 µg/Kg, demonstrando que tais cepas em condições favoráveis de umidade e temperatura no substrato eventualmente produzem aflatoxinas.

Palavras-chave: farinha de milho, fungos toxígenos, aflatoxinas.

ABSTRACT

The micotoxins are secondary metabolics produced by fungus and they represent a potential risk for the human health, when found in the foods. Among the micotoxins, the aflatoxins are the most important and more studied. The corn and its derived, especially the maize flour is among the main foods found in the basic diet of the Brazilians, particularly in Bahia. There are few studies in the State on the micotoxins research in foods derived from the corn. The presence of toxigenic molds in maize flour is not necessarily configured in the presence of micotoxins, but it represents an alert for a larger attention to the agricultural practices, so much in the choice of the grain for the planting, in the harvest, in the transportation, in the processing, in the storage, as in the commercialization of this product. The molds more frequently isolated in derived of the corn they are the *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and *Fusarium* spp. The aflatoxina B1 (AFB1) it is a potent carcinogen classified as belonging to the group 1 of the substances potentially cancerous. The consumption of floured maize flour pre-cooked with characteristics undesirable micotoxicologicals can be a danger for the human health. Focus on the importance of the toxigenic molds and the micotoxins, this work had for objective to verify the occurrence of toxigenic molds and aflatoxins in 112 samples of maize flour pre-cooked floured trade in different cities in the State of Bahia from June 2007 to June 2008. The studied samples were analyzed for isolation and counting of molds in BDA with chloranfenicol. 32% of the samples were positive for toxigenic molds, being 50% acted by storage molds, 31% of field and 17% of both. The molds of the gender *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium* were found more frequently in the samples that presented water activity between 0,52-0,60. 58% of the samples with mold contamination were conditioned in packaging. In relation to the aflatoxins presence, 14% (16/112) of the samples they were positive, where 5% (6/112) they presented concentrations above the maximum limit recommended by the Legislation (20 g/Kg). The molds of the gender *Aspergillus* were presented in 44,4% (16/36) of the analyzed samples. From this gender were isolated and identified three species: *A. fumigatus* 27,8% (10/36), *A. flavus* 22,2% (8/36) and *A. terreus* 2,8% (1/36). The analysis of the potential toxigen of 28 isolated of *Aspergillus* spp. revealed the aflatoxins presence in 50% (14/28) of the stumps, in a concentration of 24,29 µg/Kg to 6.222 µg/Kg, demonstrating that such stumps in favorable conditions of humidity and temperature in the substratum eventually produce aflatoxins.

Keywords: maize flour, toxigenic molds, aflatoxins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- (A) Colônia de <i>Aspergillus flavus</i> em ágar Sabouraud. (B) Colônia de <i>Penicillium</i> sp. em ágar Cezapk	22
Figura 2	- (A) Grãos ardidos pelo ataque do fungo <i>Fusarium verticillioides</i> . (B) Grãos ardidos pelo ataque do fungo <i>Stenocarpella maydis</i>	24
Figura 3	- Estrutura molecular do furano, da cumarina e das lactonas.....	30
Figura 4	- Estrutura molecular das micotoxinas aflatoxinas B1, B2, G1 E G2 E M1	31
Figura 5	- Estrutura molecular das ocratoxinas A e B.....	32
Figura 6	- Estrutura molecular da zearalenona.....	32
Figura 7	- Tricotecenos. (a) Toxina T-2, (b) dioxinivalenol, (c) verrucarina.....	33
Figura 8	- Estrutura molecular das fumonisinas B1, B2 e B3.....	34
Figura 9	- Estrutura molecular do ácido penicílico	35
Figura 10	- Metabólitos tóxicos da aflatoxina B1	38
Figura 11	- Fluxograma do processo de moagem a seco do milho	57
Figura 12	- Mapa de localização dos municípios onde as amostras de farinha de milho flocada pré-cozida foram adquiridas	72
Figura 13	- Delineamento experimental geral	73
Figura 14	- Disposição da placa de Petri, lâmina e lamínula para o microcultivo.....	78
Figura 15	- Presença de micobiota contaminante nas 112 amostras de farinha de milho flocada pré-cozida	80
Figura 16	- Origem dos fungos toxígenos isolados nas farinhas de milho flocadas pré-cozidas.....	80

Figura 17	- Tipo de embalagem das farinhas de milho flocadas pré-cozidas que apresentaram fungos toxígenos	82
Figura 18	- Umidade relativa do ar nos municípios de origem das farinhas de milho flocadas pré-cozidas com desenvolvimento de fungos toxígenos	83
Figura 19	- Temperatura média nos municípios de origem das farinhas de milho flocadas pré-cozidas com desenvolvimento de fungos toxígenos	84
Figura 20	- Tipos de estabelecimentos comerciais onde adquiriu-se as farinhas de milho flocadas e pré-cozidas.....	85
Figura 21	- Curva de leituras de padrões de AFB1 a 355nm.....	96
Figura 22	- Teores de aflatoxinas totais nas 16/112 amostras de farinha de milho flocada pré-cozida contaminadas.....	98

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	- Níveis permitidos para aflatoxinas em alimentos para consumo humano	46
Quadro 2	- Níveis permitidos para aflatoxinas em alimentos para consumo animal: matérias-primas e rações	46
Quadro 3	- Níveis permitidos para aflatoxinas em alimentos para consumo humano – Organizações econômicas	47
Quadro 4	- Características organolépticas da farinha de milho flocada pré-cozida	59
Quadro 5	- Características físico-químicas da farinha de milho flocada pré-cozida	59
Quadro 6	- A farinha de milho flocada pré-cozida deve obedecer ao seguinte padrão	59
Quadro 7	- Limites máximos admissíveis de concentração de aflatoxinas: alimento /aflatoxina limite	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Resumo dos principais fungos produtores de micotoxinas	27
Tabela 2	-	Classificação das micotoxinas de acordo com os principais órgãos e sistemas afetados	36
Tabela 3	-	Efeitos clínicos das micotoxinas em suínos.....	41
Tabela 4	-	Milho: Brasil – Estimativa de consumo por segmento (toneladas).....	52
Tabela 5	-	Milho: Brasil – Produção em toneladas/ano.....	54
Tabela 6	-	Fungos toxigênicos isolados em alguns dos derivados de milho	55
Tabela 7	-	Milho: Brasil – Produção Nordestina em toneladas/ano	56
Tabela 8	-	Milho: Consumo por processo a seco e a úmido (x 1000 toneladas).....	58
Tabela 9	-	Municípios e Características Geofísicas	72
Tabela 10	-	Gêneros de fungos isolados em farinhas de milho flocada pré-cozida comercializada em 15 municípios do Estado da Bahia.....	81
Tabela 11	-	Ocorrência dos fungos mais isolados nas amostras de farinha de milho flocada pré-cozida, de acordo com a faixa de atividade de (Aa).....	82
Tabela 12	-	Concentrações de aflatoxinas nas soluções padrão e de trabalho.....	96
Tabela 13	-	Padronização dos procedimentos cromatográficos para determinação de aflatoxinas	97

GLOSSÁRIO DE SIGLAS

Aa	Atividade de água
ABIMILHO	Associação Brasileira das Indústrias do Milho
a.C.	Antes de Cristo
AIPC	Agência Internacional de Pesquisa do Câncer
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação Oficial de Análises Químicas
<i>Apud</i>	Citação
BDA	Ágar Batata Dextrose
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CAM	Meio Ágar Coco
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CNNPA	Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
et al.	E outros
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação.
FDA	Administração de Medicamentos e Alimentos
g	Gramas
ICMSF	Comissão Internacional sobre Especificações Microbiológicas para Alimentos
ISO	Organização Internacional para Padronização
JECFA	Comitê Misto de Peritos em Aditivos Alimentares
Kg	Quilograma
L	Litro
LiCl	Cloreto de lítio
LOAEL	Nível Mais Baixo de Efeitos Adversos Observados
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Maps	Mapas
mL	Mililitro
MS	Ministério da Saúde.
nº	Número

NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NEL	Nenhum Nível de Efeito
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NOAEL	Nenhum Efeito Adverso nos Níveis Observados
OMC	Organização Mundial do Comércio
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
ppb	Partes por Bilhão
ppm	Partes por Milhão
PTDI	Provisória Dose Diária Tolerável
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
Rf	Fator de Relação
RNA	Ácido Ribonucléico
SPSS	Pacote Estatístico para as Ciências Sociais
sp	Espécie
spp	Espécies
TECPAR	Instituto Tecnológico do Paraná
TD50	Dose Tóxica em 50% dos Indivíduos
TDI	Dose Diária Tolerável.
TFA	Ácido Trifluoroacético
tRNA	Ácido Ribonucléico Transportador
UE	União Européia
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UK	Reino Unido
USA	Estados Unidos da América
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

≠	Diferente
/	Dividido por
°C	Graus Celsius
=	Igual
λ	Lambda
>	Maior que
+	Mais
<	Menor que
-	Menos
μg	Micrograma
%	Percentual
σ	Sigma

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	OBJETIVOS	20
2.1	Geral	20
2.2	Específicos.....	20
3.	REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1	FUNGOS TOXÍGENOS	21
3.1.1	Características morfológicas e bioquímicas	21
3.1.2	Potencial toxígeno	23
3.1.3	Principais fungos toxígenos encontrados em sementes	27
3.2	MICOTOXINAS	28
3.2.1	Características gerais	28
3.2.2	Toxicidade	35
3.2.3	Aflatoxinas e aflatoxicoses	41
3.3	PREVENÇÃO E CONTROLE	44
3.4	PRODUÇÃO DE MILHO E DERIVADOS NO BRASIL.....	51
3.4.1	Aspectos gerais	51
3.4.2	Cenário Nordeste: desafios e perspectivas	55
3.4.3	Processos industriais do milho	56
3.4.4	Farinha de milho flocada pré-cozida	58
3.4.5	Regulamento técnico Mercosul sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no milho	60
	REFERÊNCIAS	63
4.	PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL GERAL	71
5.	ARTIGO I – IDENTIFICAÇÃO DA MICOBIOTA CONTAMINANTE EM FARINHA DE MILHO FLOCADA PRÉ-COZIDA COMERCIALIZADA EM DIFERENTES MUNICÍPIOS DO ESTADO DA BAHIA	
	RESUMO	74
	SUMMARY	75
5.1	INTRODUÇÃO	76

5.2	MATERIAL E MÉTODOS	77
5.3	MATERIAL	77
5.4	MÉTODOS	77
5.4.1	Contagem, isolamento e identificação da micobiota.....	77
5.4.2	Técnica do microcultivo	78
5.4.3	Determinação da atividade de água (Aa)	79
5.4.4	Processamento dos dados	79
5.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
5.6	CONCLUSÃO	85
	REFERÊNCIAS.....	86
6.	ARTIGO II – OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS E POTENCIAL TOXÍGENO EM CEPAS DE <i>Aspergillus</i> spp. ISOLADAS EM FARINHA DE MILHO FLOCADA PRÉ-COZIDA COMERCIALIZADA EM DIFERENTES MUNICÍPIOS DO ESTADO DA BAHIA	
	RESUMO.....	89
	SUMMARY.....	90
6.1	INTRODUÇÃO	91
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	92
6.3	MATERIAL	92
6.4	MÉTODOS	93
6.4.1	Análise micotoxicológica	93
6.4.2	Avaliação do potencial toxígeno das cepas de <i>Aspergillus</i> spp. isoladas.....	94
6.4.3	Processamento de dados.....	96
6.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
6.5.1	Avaliação do potencial toxígeno das cepas de <i>aspergillus</i> spp. isoladas nas amostras analisadas	99
6.6	CONCLUSÃO	99
	REFERÊNCIAS.....	101
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	104

1. INTRODUÇÃO

Micotoxicoses é o nome dado às enfermidades causadas pelos fungos (bolors e leveduras) que acometem humanos e animais, por metabólitos secundários tóxicos (micotoxinas) que são produzidos por algumas espécies fúngicas (GIMENO E MARTINS, 2007).

Há séculos se conhece a toxicidade de certos fungos. Entretanto, somente no ano de 1850, ao relacionar-se a ingestão de centeio infectado pelo fungo *Claviceps purpurea* com as características clínicas do ergotismo, foi levantada a possibilidade de haver risco à saúde humana e animal pela ingestão de metabólitos tóxicos produzidos por fungos (FOOD RESEARCH INSTITUTE, 1997).

A capacidade dos fungos causarem patologias em animais, tais como hepatocarcinoma, através de seus metabólitos tóxicos, foi descoberta na Inglaterra, em 1960, quando a torta de amendoim destinado ao consumo animal importada do Brasil foi responsabilizada como causadora da "Doença X dos perus". Desta torta, foi obtido um extrato clorofórmico que, ao ser administrado a marrecos jovens, foi capaz de reproduzir as lesões hepáticas semelhantes à doença original, sendo a toxina denominada de "A. *flavus* toxin" ou aflatoxina (ALLCROFT et al., 1962; ALLCROFT e CARNAGHAN, 1962; ZOVICO, 1999).

Os fungos filamentosos produzem uma imensa diversidade de metabólitos secundários, como pigmentos, antibióticos, fitotoxinas além de compostos tóxicos, denominados de micotoxinas. Quando produzidos em associação com os alimentos, ração animal e forragens, os metabólitos tóxicos podem ser ingeridos pelo homem e animais, provocando as micotoxicoses (MOSS, 1991).

Ao se desenvolverem nos grãos, os fungos podem produzir micotoxinas, causando doenças e mortes em animais que consomem os grãos contaminados. A existência de micotoxinas em grãos e rações está sujeita à influência de inúmeros fatores ambientais. Logo, a contaminação de alimentos por micotoxinas varia em razão das condições ambientais, produção e armazenamento. Além disso, depende

do tipo de alimento, já que alguns grãos são substratos mais aptos que outros para o desenvolvimento de determinados fungos (FOOD RESEARCH INSTITUTE, 1997).

Os cereais são facilmente colonizados por fungos toxígenos em função das condições favoráveis ao fungo no campo, depois da colheita e durante a estocagem (GALVANO et al., 2005).

As colheitas de milho no Brasil são na maior parte (85% em 2005) destinadas a compor rações para a criação, principalmente, na avicultura. A alimentação humana, através das indústrias moageiras, recebe apenas cerca de 4,8 milhões de toneladas (2005), em torno de 13% do total da produção. Produto originário das Américas e consumido pelos índios brasileiros já no tempo da chegada dos portugueses, o milho foi uma das bases da cultura alimentar da época colonial. Hoje a média do consumo de milho é calculada em cerca de 19 quilos anuais por brasileiro (ABIMILHO, 2007).

Os produtos derivados de milho são bastante apreciados na culinária brasileira, tendo participação efetiva como componentes básicos na dieta alimentar das camadas mais carentes da população (MELO-FILHO; RICHETTI, 1997 *apud* ALHADAS et al., 2004). A farinha de milho flocada pré-cozida, produzida pela moagem de grãos de milho (*Zea mays* L.) degerminados, está presente na cesta básica brasileira. A contaminação de derivados de milho por fungos representa um problema de saúde pública, uma vez que muitos fungos são potencialmente toxígenos (FARIAS et al., 2000).

O Ministério da Saúde através da Resolução RDC nº 274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002, publicada no Diário Oficial da União, de 16/10/2002, dispõe que alguns alimentos para o consumo humano como o milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído, farinhas e sêmolos) podem ter uma concentração máxima de 0,5µg/Kg a 20µg/Kg (ppb) de Aflatoxinas (B1+B2+G1+G2) (BRASIL, 2002).

No Brasil e especialmente na Bahia, poucos são as pesquisas referentes ao isolamento e identificação de fungos, bem como, a ocorrência de micotoxinas em produtos derivados do milho que se destinam ao consumo humano. Em geral, o enfoque central das investigações já realizadas direciona-se ao isolamento de fungos em grãos de milhos recém-colhidos e armazenados e de rações animais, que têm como componente principal o milho. Deste modo, o presente estudo teve como objetivos isolar e identificar a micobiota contaminante e avaliar a presença de

aflatoxinas em farinhas de milho flocadas pré-cozidas, de diferentes marcas, comercializadas em diversos municípios do Estado da Bahia.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Verificar a ocorrência de fungos toxígenos e de aflatoxinas em amostras de farinha de milho flocada pré-cozida comercializada em diferentes municípios do estado da Bahia.

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade de água (Aa) nas amostras de farinha de milho analisadas;
- Isolar e identificar a população de fungos toxígenos nas amostras de farinha de milho analisadas;
- Detectar e quantificar as aflatoxinas presentes nas amostras de farinha de milho analisadas;
- Determinar o potencial toxígeno das cepas de *Aspergillus* spp. isoladas das amostras de farinha de milho analisadas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FUNGOS TOXÍGENOS

3.1.1 Características morfológicas e bioquímicas

Os fungos são organismos eucarióticos que revelam notável capacidade de adaptação e crescimento sob condições de umidade e temperatura extremamente variáveis. São pouco exigentes quanto aos nutrientes disponíveis, razão pela qual o crescimento pode ocorrer praticamente em qualquer tipo de alimento (LAZZARI, 1997; LEITÃO et al., 1988). Podem ser incluídos em dois grandes grupos, os pluricelulares ou filamentosos (boloros) e os unicelulares (leveduras). Nos boloros, a unidade fundamental é a hifa e o conjunto desses elementos é denominado micélio, que exerce função de assimilação, nutrição e fixação, podendo diferenciar-se em estruturas de frutificação, que servem à sua propagação (CORRÊA, 1995).

Os boloros podem formar colônias com aspectos diversos, que variam de seco e pulverulento a úmido e gelatinoso. O micélio é usualmente incolor e as diferentes tonalidades das colônias são decorrentes da maciça produção de esporos assexuais, resultando em colorações verde, verde-azulada, laranja, castanha, cinza ou preta. Particularmente nos gêneros *Aspergillus* (Figura 1A), *Penicillium* (Figura 1B), *Mucor* e *Rhizopus* essas colorações são bastante características e auxiliam na identificação de gêneros e espécies (LEITÃO et al., 1988; TRABULSI, 2005; BORGES et al., 2002).

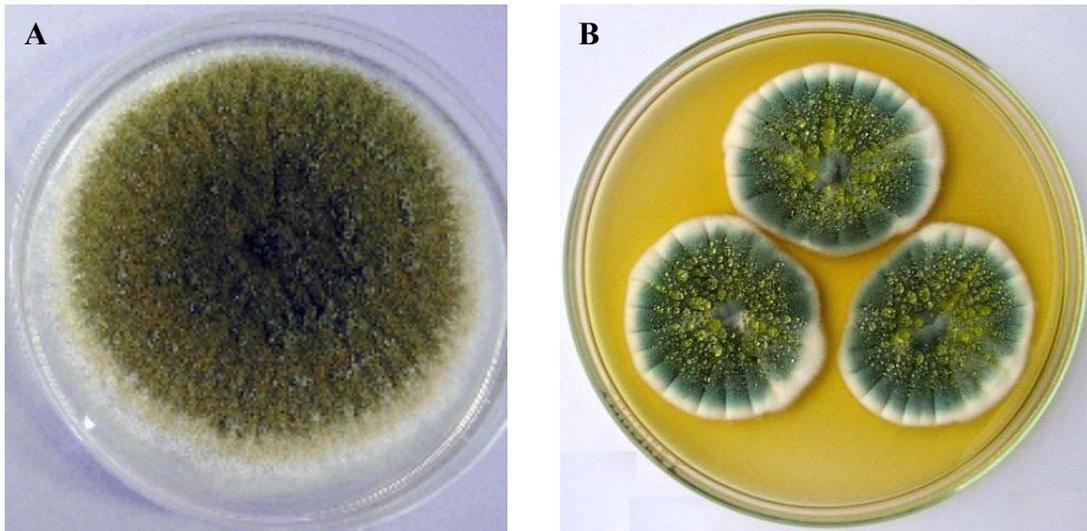


Figura 1 - (A) Colônia de *A. flavus* em ágar Sabouraud.
(B) Colônia de *Penicillium* sp. em ágar Cezapik.

Fonte: (A) http://www.moldbacteria.com/Aspergillus_flavus.gif;

(B) <http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlasy/images/plisne/kolonie/Penicillium%20>

As estruturas vegetativas de fungos filamentosos se baseiam essencialmente na forma de crescimento do micélio, que se alarga, se ramifica e se anastomosa, apresentando uma diversidade morfológica relativamente limitada. As estruturas associadas com a produção e dispersão de esporos dão origem à diversidade evolutiva e morfológica dos fungos filamentosos. Existem espécies de fungos que produzem corpos de frutificação, que podem ser comestíveis ou venenosos; são estruturas eficazes para a produção e dispersão de esporos. Como organismos heterótrofos, os fungos têm sua nutrição baseada na absorção de substâncias orgânicas previamente digeridas por secreções (enzimas apropriadas) que atravessam a parede de suas células. Alguns têm a capacidade de metabolizar materiais complexos e insolúveis, além de produzir substâncias tóxicas, conhecidas como micotoxinas que, se associadas aos alimentos, pode causar um grande risco à saúde humana. (ADAMS e MOSS, 1995).

Várias espécies de fungos filamentosos produzem metabólitos tóxicos em seus corpos de frutificação, o que os caracteriza como fungos toxígenos. Os metabólitos tóxicos produzidos por tais fungos são considerados micotoxinas, com base na química, na bioquímica e na toxicologia de seus compostos. Vale a pena ressaltar uma diferença importante entre os metabólitos tóxicos dos fungos e as toxinas da maioria das bactérias relacionadas com intoxicação alimentar. Os

primeiros são compostos de peso molecular relativamente baixo, porém sua composição química pode ser muito complexa enquanto que os últimos são macromoléculas tais como polipeptídios, proteínas e lipopolissacarídeos (ADAMS e MOSS, 1995).

3.1.2 Potencial toxígeno

O uso de fungos em processos fermentativos como fabricação de cerveja e do vinho e a produção de antibióticos e vitaminas é bastante difundido; contudo, algumas espécies podem causar transformações indesejáveis nos alimentos, produzindo sabores e odores desagradáveis (BORGES et al., 2002). Também podem ocasionar manifestações clínicas no homem e nos animais como infecções ou doenças decorrentes de invasões de tecidos, alergias ou reações de hipersensibilidade, além de micotoxicoses que são intoxicações resultantes da ingestão de alimentos ou rações contendo micotoxinas (CORRÊA, 1995).

Algumas espécies de fungos têm seu desenvolvimento favorecido pelos baixos valores de atividade de água (Aa), permitindo sua colonização em certos produtos, como os cereais, que para o desenvolvimento de outros microrganismos estariam excessivamente secos. Dentre os cereais utilizados para o consumo humano e animal destaca-se o milho que pode ter seus grãos comprometidos (grãos ardidos) pelo ataque de fungos (ADAMS e MOSS, 1995).

São considerados grãos ardidos todos aqueles que possuem pelo menos um quarto de sua superfície com descolorações cujo matiz pode variar de marrom claro a roxo (Figura 2A) ou de vermelho claro a vermelho intenso (Figura 2B).

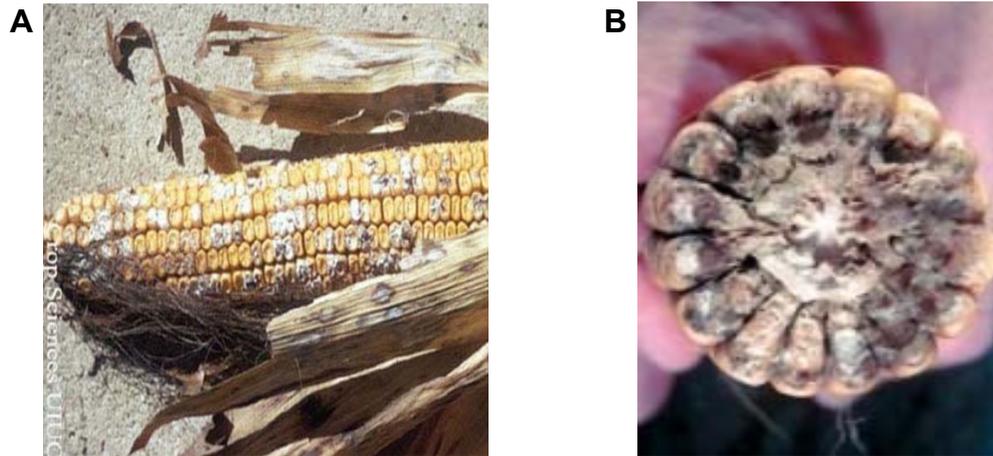


Figura 2 - (A) Grãos ardidos pelo ataque do fungo *Fusarium verticillioides*.
(B) Grãos ardidos pelo ataque do fungo *Stenocarpella maydis*.

Fonte: (A) <http://www6.ufrgs.br/agronomia/fitossan/herbariovirtual/>;

(B) <http://www6.ufrgs.br/agronomia/fitossan/herbariovirtual/>.

Os grãos ardidos em milho são reflexos das podridões de espigas, causadas principalmente pelos fungos presentes no campo. Esses fungos podem ser divididos em dois grupos: aqueles que apenas produzem grãos ardidos e aqueles que, além da produção de grãos ardidos, são biossintetizadores de compostos tóxicos, denominados micotoxinas. No primeiro grupo, encontram-se os fungos *Drechslera zeicola*, *Cladosporium herbarum*, *Ustilago maydis*, *Nigrospora oryzae*, *Colletotrichum graminicola*, entre outros. No segundo grupo, são encontrados os fungos *Stenocarpella maydis* (= *Diplodia maydis*), *Stenocarpella macrospora* (= *Diplodia macrospora*), *Fusarium verticillioides* (= *Fusarium moniliforme*), *F. subglutinans*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* e *Gibberella zeae*. Ocasionalmente, no campo há produção de grãos ardidos e de micotoxinas pelos fungos *P. oxalicum*, *A. flavus* e *A. parasiticus*.

No Brasil, os fungos *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* e *S. maydis* são mais frequentes nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul; e *F. verticillioides*, *F. subglutinans* e *S. macrospora* nas demais regiões produtoras de milho. Atualmente, os grãos ardidos constituem-se num dos principais problemas de qualidade do milho devido à possibilidade da presença de micotoxinas, tais como aflatoxinas (*A. flavus* e *A. parasiticus*), fumonisinas (*F. verticillioides* e *F. subglutinans*), zearalenona (*F. graminearum* e *F. poae*), vomitoxinas (*F. verticillioides*), toxina T-2 (*F. sporotrichioides*), entre outras. As perdas qualitativas

por grãos ardidos são motivos de desvalorização do produto e uma ameaça à saúde dos rebanhos e humana (PINTO, 2005).

Os fungos toxígenos que causam podridões em grãos de milho no campo requerem, nos grãos, umidades acima de 20% para o seu desenvolvimento e para promoverem a podridão na espiga, principalmente em anos em que prevalecem condições úmidas após a polinização ou onde ocorre seca ou danos de insetos nas espigas.

Os principais fungos dessa categoria são espécies do gênero *Fusarium*, como *F. verticillioides*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *F. nivale*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. proliferatum*, entre outras (PINTO, 2005). Como principais fontes de inóculo de *Fusarium*, têm-se os restos de cultura de milho, como colmos e espigas, as sementes de milho contaminadas, as gramíneas de inverno (trigo, aveia e cevada) e também o solo. A disseminação dos esporos se dá através do vento e de insetos e o período de maior suscetibilidade ocorre de 7 (sete) a 10 (dez) dias após a polinização dos estigmas. Sintomatologicamente pode ocorrer uma pigmentação rosa (*F. verticillioides*) ou roxa (*F. graminearum*) entre os grãos, sendo que as espigas que não dobram após a maturidade fisiológica dos grãos e aquelas com mau empalhamento são as mais suscetíveis.

Como padrão de qualidade, tem-se, em algumas agroindústrias, a tolerância máxima de 6% para grãos ardidos em lotes comerciais de milho. Quando ocorrem fortes chuvas após o estágio da maturidade fisiológica dos grãos e também há a postergação na colheita do milho, normalmente a incidência de grãos ardidos supera esse limite de tolerância máxima, cujos valores têm atingido freqüentemente 10 a 20% em alguns cultivares (PINTO, 2005).

3.1.3 Principais fungos toxígenos encontrados em sementes

Alternaria spp, *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp e *Fusarium* spp são os principais representantes fúngicos responsáveis pela produção de micotoxinas numa ampla variedade de produtos agrícolas (BLUNDEN et al., 1991; HUSSEIN e BRASEL, 2001) e com exceção do *Alternaria* spp, constituem os gêneros isolados de cereais mais freqüentemente associados à produção de micotoxinas (KIESSLING, 1986).

Espécies de *Absidia*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Emericella*, *Fusarium*, *Monascus*, *Penicillium* e *Rhizopus* são fungos contaminantes de produtos derivados do milho (RIBEIRO et al., 2003).

As principais espécies de fungos de campo são dos gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Helminthosporium* e podem alterar a aparência dos grãos e o valor comercial do produto, enquanto os do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* são os fungos de armazenamento ou de depósito que são os mais freqüentemente encontrados (PUZZI, 1986).

Espécies de *Aspergillus* são consideradas iniciadoras da deterioração das sementes e grãos, causando danos ao germe, descoloração e alterações nutricionais, conforme mencionado por Meronuck (1987). *A. candidus* Link é exclusivamente fungo de armazenamento e está associado ao primeiro estágio de deterioração do grão. *A. flavus* pode ser considerado fungo de armazenamento, podendo invadir sementes de milho, no campo, quando as condições ambientais forem favoráveis (LAZZARI, 1997). Esse comportamento relaciona-se com a redução da umidade do subproduto durante o processamento. De acordo com Meronuck (1987), espécies de *Aspergillus* podem crescer com menor teor de água, seguindo-se, após a contaminação, por *Penicillium*, com uma umidade mais elevada, inclusive, desenvolvida em função da atividade metabólica dos primeiros invasores. Segundo Rodríguez-Amaya e Sabino (2002) os fungos mais freqüentemente isolados de milho e seus derivados em todo o Brasil são *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Acremonium*, *Clodosporium*, *Neurospora* e *Paecilomyces*.

Fusarium, considerado como fungo de campo, coloniza grãos e sementes durante o amadurecimento, de modo que o dano é causado antes da colheita. Esse fungo não se desenvolve durante o armazenamento, exceto ocasionalmente em milho armazenado com alto teor de umidade (MÁRCIA e LAZZARI, 1998). A presença de espécies de *Fusarium* em grão e fubá explica-se pelo fato de que este fungo pode infectar extensivamente certas porções do grão de milho como a ponta de contato com o sabugo e o embrião (SCUSSEL, RODRIGUEZ-AMAYA e WILLIAM, 1986; LAZZARI, 1997). *F. verticillioides* é considerado como o principal fitopatógeno de várias gramíneas, sendo que no milho se destaca pela alta freqüência e porcentagem de ocorrência, tanto no Brasil como em outros países e caracteriza-se, também, pela produção de fumonisinas em milho, alimentos derivados do milho, milho pipoca e rações à base de milho (BOOTH, 1971;

WINDHAN e KING, 1983; CASA, REIS, e ZAMBOLIN, 1998; BULLERMAN e TSAI, 1994). A tabela 1 resume os principais fungos produtores de micotoxinas.

Tabela 1 – Resumo dos principais fungos produtores de micotoxinas.

FUNGOS	SUBSTRATO	TOXINA	SUCEPTIBILIDADE	EFEITOS BIOLÓGICOS
<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	cereais , rações alguns alimentos, leite	Aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e outras	Suínos, bovinos, aves, camundongos, ratos, cobaio, macacos, cães, alguns microrganismos, humanos (?)	Hepatomas, cirrose hepática, hemorragias do trato gastrointestinal, proliferação do epitélio do ducto biliar, inapetência, prostração e morte
<i>A. alutaceus</i> (<i>A. ochraceus</i>) <i>P. viridicatum</i>	trigo, milho, café, centeio, cevada, aveia	Ocratoxinas A, B, C	bovinos, suínos aves, equínos, ratos, humanos (?)	Infiltração gordurosa do fígado com degeneração hialina das células e necrose focal
<i>A. vesicolor</i> <i>A. nidulans</i> <i>A. bipolaris</i>	rações, alfafa e café	Esterigmatocistina (intimamente relacionada a aflatoxina B1)	ratos, camundongos	Alterações degenerativas no fígado, rins e coração, acompanhadas de peritonite. Necrose tubular renal, necrose centro-lobular hepática, focos necróticos na superfície do endocárdio
<i>Pithomyces chartarum</i>	pastagens e solo	Esporodesminas A, B, C, D, E, F, G, H	cobaio, coelhos, ovinos, bovinos, equínos (?)	“Eczema facial”, hepatotóxico, fotossensibilizante
<i>Claviceps purpúrea</i>	pastagens, centeio, cevada	Alcalóides de “ergot”	camundongos, ratos, bovinos, ovinos, suínos, equínos, humanos	“Ergotismo”, dores musculares, inchamento e prurido dos membros, intensa sensação de calor e frio, gangrena, necrose, convulsões, aborto
<i>F. graminearum</i> <i>F. oxyporum</i> <i>F. moniliforme</i> <i>F. tricinctum</i>	milho, rações	Zearalenona ou Toxina F-2	suínos, aves	Estrogenismo: prolapso vaginal e retal, edema vulvar, aumento das glândulas mamárias e aborto
<i>F. poae</i> <i>F. sporotrichioides</i>	trigo, aveia, arroz	Poaeafusarina, Esporofusarina, Toxina T-2	camundongos, ratos, cobaio, gatos, cães, humanos	“Aleucia tóxica alimentar”, vômito, Inflamação da pele, diarréia, leucopenia, hemorragias múltiplas, angina necrótica, exaustão da medula óssea.
<i>F. poae</i> <i>F. sporotrichioides</i> <i>F. tricinctum</i> <i>F. solani</i>	cereais	Toxina T-2	camundongos, ratos, cobaio, coelhos, suínos, bovinos, cães, gatos	Severa dermatite de contato, diarréia e hemorragia retal, epitelionecrose (cavidade oral, esôfago e estômago) gastroenterite e morte
<i>F. tricinctum</i>	cereais	Toxina HT-2	camundongos, ratos, cobaio, coelhos, suínos, bovinos, cães, gatos	Severa dermatite de contato, diarréia e hemorragia retal, epitelionecrose (cavidade oral, esôfago e estômago) gastroenterite e morte
<i>F. poae</i> <i>F. solani</i> <i>F. nivale</i> <i>F. niveus</i>	cereais	Nivalenol	camundongos, ratos, cobaio, coelhos, suínos, bovinos, cães, gatos	Severa dermatite de contato, diarréia e hemorragia retal, epitelionecrose (cavidade oral, esôfago e estômago) gastroenterite e morte

Fonte: Mallozzi e Corrêa, 1998.

(?) – Pesquisas em andamento.

Tabela 1 – Resumo dos principais fungos produtores de micotoxinas. (continuação)

FUNGOS	SUBSTRATO	TOXINA	SUCEPTIBILIDADE	EFEITOS BIOLÓGICOS
<i>F. graminearum</i>	cereais	Dioxinivalenol	camundongos, ratos, cobaios, coelhos, suínos, bovinos, cães, gatos	Severa dermatite de contato, diarreia e hemorragia retal, epitelioneecrose (cavidade oral, esôfago e estômago) gastroenterite e morte
<i>F. moniliforme</i>	milho	Fumonisina B1, B2, B3	eqüinos, asininos, suínos, coelhos, ratos aves, humanos (?)	“Leucoencefalomalácia”, tremor, ataxia, prostração, tendência a permanecer com membros inferiores cruzados, incoordenação motora, morte, edema pulmonar em suínos, carcinoma em ratos, leucoencefalomalacia em coelhos e cavalos, diarreia e redução no ganho de peso em aves, câncer de esôfago em seres humanos
<i>Mirothecium verrucaria</i> <i>M. roridum</i>	plantas	Verrucarina A Roridina A	ratos camundongos, cães, suínos, ovinos, macacos, bezerros	Enterocolite hemorrágica, leucopenia e trombocitopenia, severa dermatite de contato
<i>P. citrinum</i>	arroz	Citrinina	suínos cães, cobaios, hamster, coelho	Glomérulo nefrite aguda e lesões hepáticas
<i>P. expansum</i>	maçã	Patulina	camundongos, ratos, bovinos, pintinhos, coelhos e microrganismos	Paralisia dos nervos motores ascendentes, convulsão e reflexo de excitação, hemorragia cerebral

Fonte: Mallozzi e Corrêa, 1998.

(?) – Pesquisas em andamento.

3.2 MICOTOXINAS

3.2.1 Características gerais

O termo micotoxina designa um grupo de metabólitos secundários provenientes de vias biossintéticas de determinadas espécies de fungos filamentosos que proliferam em produtos agrícolas destinados à alimentação humana e animal. Estes metabólitos secundários são quimicamente diversos e pode estar contidos no interior dos esporos, em seus micélios, ou então serem liberados

no alimento contaminado por estes microrganismos (BORGES et al., 2002; CANÇADO e FREITAS, 2004).

Embora algumas micotoxinas como a patulina sejam conhecidas desde 1943, somente a partir de 1960 os estudos sobre a atividade destas substâncias se intensificaram em consequência da ocorrência de vários casos de toxicoses em animais. Na Inglaterra, em 1960, cerca de 400.000 perus entre 4 (quatro) e 6 (seis) semanas de idade morreram em consequência de uma doença desconhecida que os investigadores do “Tropical Products Institute” chamaram de “Turkey x Disease”, cujos sintomas variavam com a modificação da ração fornecidas aos animais. Verificou-se que as rações ingeridas continham farelo de amendoim de procedência brasileira e, mais tarde comprovou-se que farelos provenientes de outras regiões como Uganda, Kênia, Nigéria, África Ocidental, Zâmbia e Índia, eram responsáveis pelos mesmos sintomas clínicos e histopatológicos. A análise das rações envolvidas nestes surtos epidêmicos revelou um grande número de hifas e o fungo isolado foi identificado como *Aspergillus flavus* sendo o fator tóxico denominado de aflatoxina e detectado por CCD (cromatografia de camada delgada), separando-se em quatro componentes com fluorescência azul e verde, sob luz ultravioleta, aflatoxinas B e G (SCUSSEL, 1998).

O conhecimento sobre micotoxinas é recente; a fumonisina, por exemplo, foi isolada em 1988. A literatura relata a existência de inúmeras micotoxinas, embora sejam mais relevantes pela ocorrência natural em alimentos: aflatoxinas, ocratoxina, zearalenona, tricotecenos, esporidesminas, patulina, ácido penicílico e fumonisinas (MALLOZZI e CORRÊA, 1998). As que ocorrem em grãos e derivados podem ser divididas em três grandes grupos: aflatoxinas, produzidas pelo gênero *Aspergillus* (espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*); fusariotoxinas, produzidas por fungos do gênero *Fusarium*, representadas pela zearalenona, tricotecenos e fumonisinas; ocratoxinas, produzidas pelo *Aspergillus alutaceus* (*A. ochraceus*) e algumas espécies do gênero *Penicillium* (CORRÊA, 1998).

Cerca de 300 micotoxinas produzidas por pelo menos 350 espécies de fungos já foram identificadas. Suspeita-se que quase todos os fungos, se testados, mostrariam alguma espécie de toxicidade e que todos os alimentos e rações susceptíveis à produção de fungos podem ser potencialmente contaminados sob condições ambientais apropriadas (SABINO, 1995). Além disso, as micotoxinas

podem permanecer no alimento mesmo após o desaparecimento do fungo (BORGES et al., 2002).

As micotoxinas são formadas quando grandes quantidades de precursores de metabólitos primários como aminoácidos, acetato, piruvato e outros, são acumulados. Sua produção representa uma forma de controle dos níveis destas substâncias, já que estes não serão requeridos no metabolismo (JAY, 2005).

Normalmente, o termo aflatoxina (ou aflatoxina) é utilizado para referir-se aos principais componentes: B1, B2, G1 e G2. As letras representam o tipo de fluorescência que emitem quando submetidas à luz ultravioleta: B (blue – azul) ou G (green – verde). Os índices 1 (hum) e 2 (dois) referem-se à sua mobilidade cromatográfica. As aflatoxinas B (AFB) possuem um anel de ciclopentenona e as do grupo G (AFG), lactona insaturada (CANÇADO e FREITAS, 2004).

As aflatoxinas, produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, são substâncias tóxicas pertencentes à classe de compostos denominados furanocumarinas e ao menos 18 toxinas são conhecidas. A aflatoxina M1 é um produto hidroxilado da AFB1 e aparece no leite, urina e fezes de animais como produto metabólico. Outros derivados da AFB1 são a AFL, AFLH1, AFQ1 E AFP1. A AFB2 é a forma 2,3-diidro da AFB1 enquanto a AFG2 é a forma 2,3-diidro da AFG2 (JAY, 2005).

A figura 3 representa as estruturas moleculares do furano, da cumarina e das lactonas, unidades componentes das aflatoxinas.

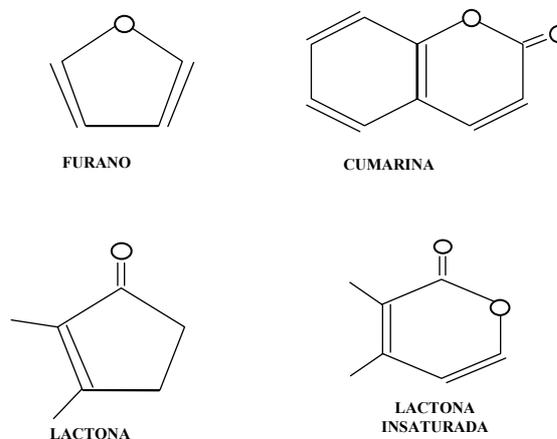


Figura 3 – Estrutura molecular do furano, da cumarina e das lactonas.

Fonte: Cançado e Freitas, 2004.

Na molécula de aflatoxina, a dupla ligação entre C2 – C3 na estrutura do hidrofurano é o local responsável pela mutagenicidade. A redução da AFB1 para a forma 2,3-diidro (AFB2) diminui a mutagenicidade em 200 a 500 vezes. AFB1 e AFB2 podem ser reduzidas no milho pelo bissulfito. Quando milho tratado com 1600ppm de aflatoxina foi tratado com 3% de NaOH a 100 °C por 4 minutos, e posteriormente processado e frito, 99% foi destruída. A rota metabólica parcial proposta para a síntese de AFB1 é a seguinte: acetato > ácido norsolorínico > averantina > averufanina > averufina > versiconal hemiacetal acetato > versicolorina A > esterigmatocistina > o-metilesterigmatocistina > AFB1 (JAY, 2005). A Figura 4 representa a estrutura molecular das aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e M1.

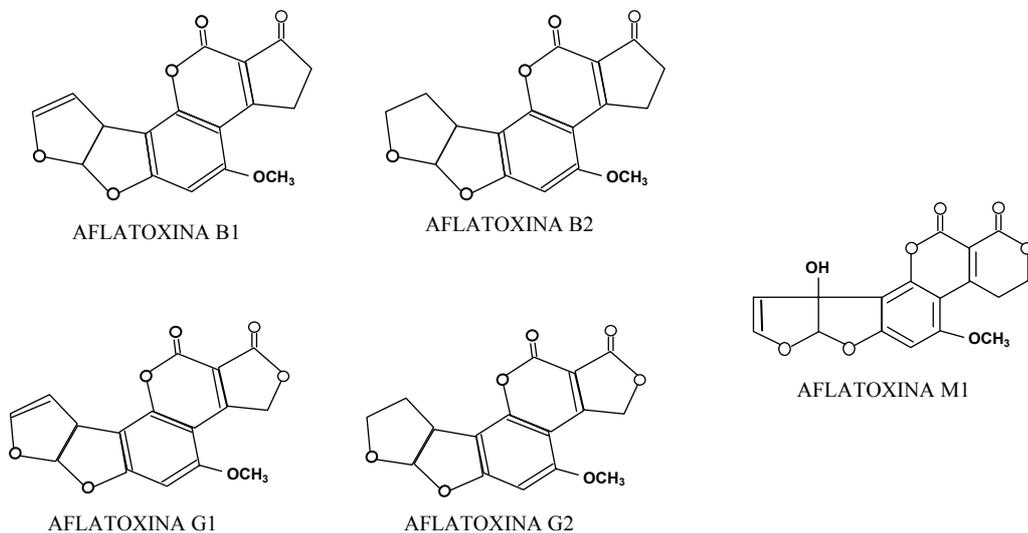


Figura 4 – Estrutura molecular das micotoxinas aflatoxinas B1, B2, G1 E G2 E M1.

Fonte: Forsythe, 2002.

As ocratoxinas (Figura 5) são produzidas por diversas espécies de *Aspergillus* como *A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. ostianus*, *A. mellus*, além do gênero *Penicillium* como *P. verrucosum*, *P. viridicatum*, *P. cyclopium* e *P. variabile*, fungos normalmente encontrados durante a estocagem de cereais. Constituem um grupo de pelo menos sete substâncias entre as quais se destacam a ocratoxina A (OA) que é a mais conhecida, a ocratoxina B (OB) que corresponde a uma forma desclorada da OA e a ocratoxina C (OC), que não têm ocorrência natural. Sob a luz

ultravioleta, OA emite fluorescência esverdeada e OB, azul (FORSYTHE, 2002; JAY, 2005).

Os inibidores mais eficazes da OA em pH 4,5 são: sorbato de potássio > propionato de sódio > metilparabeno > bissulfito de sódio. Em pH 5,5, os dois mais efetivos são o metilparabeno e o sorbato de potássio. Estudos revelaram que a OA não pode ser destruída por procedimentos normais de cocção (JAY, 2005).

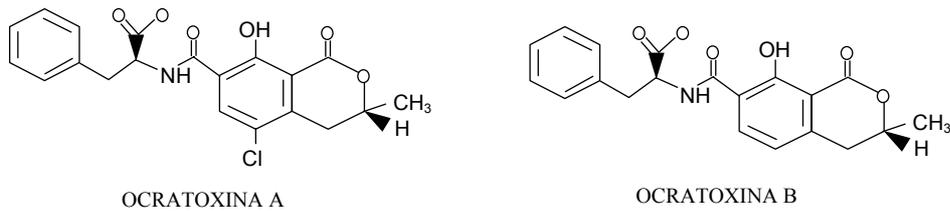


Figura 5 – Estrutura molecular das ocratoxinas A e B.

Fonte: Forsythe, 2002.

Entre as fusariotoxinas, produzidas por fungos do gênero *Fusarium*, encontram-se a zearalenona, tricotecenos e fumonisinas.

A zearalenona (Figura 6) é produzida principalmente por *Fusarium graminearum* e *Fusarium tricinctum* e *Fusarium culmorum*. Existem ao menos cinco zearalenonas de ocorrência natural, derivadas do ácido resorcílico. Apresenta fluorescência azul-esverdeada sob luz UV de comprimento longo e esverdeado sob luz UV de comprimento curto (JAY, 2005; FORSYTHE, 2002). É um estrogênico fúngico, produzido juntamente com o dioxinivalenol e demais tricotecenos, além de moniliformina e butenolideno (PFOHL – LESZKOWICZ et al., 1995; SCUSSEL, 1998; DINIZ, 2002 *apud* CANÇADO e FREITAS, 2004).

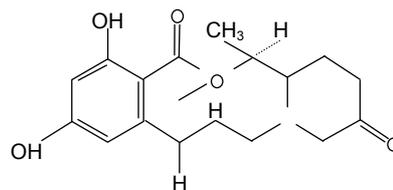


Figura 6 – Estrutura molecular da zearalenona.

Fonte: Jay, 2005.

Os tricotecenos (Figura 7) são um grupo de mais de quarenta substâncias entre as quais se destacam o dioxinivalenol (DON ou vomitoxina), nivalenol, toxina T-2 e diacetoxicirpenol (DAS). O grupo de tricotecenos mais virulentos constituem aqueles compostos que possuem uma estrutura macrocíclica unida ao núcleo do tricoteceno tais como satratoxinas, verrucarinas, e roridinas, produzidas por *Stachybotris atra* (ADAMS e MOSS, 1995).

Três das micotoxinas mais importantes, a aflatoxina, a ocratoxina e a toxina T-2 são imunossupressoras; inibem a síntese de proteínas: a aflatoxina por inibir a transcrição, a ocratoxina por inibir a fenilalaninasintetase do tRNA e a toxina T-2 por inibir a tradução por meio da união com um sítio específico com o ribossomo eucariótico. Estes três mecanismos de inibição podem contribuir para um sinergismo entre diferentes micotoxinas, uma vez que muitos alimentos são contaminados por mais de um tipo de fungo (ADAMS e MOSS, 1995).

Embora as fumonisinas tenham sido isoladas a partir de culturas de *Fusarium verticillioides* Theil e colaboradores, 1992 *apud* Cançado e Freitas, 2004 verificaram que das 232 espécies de *Fusarium* somente o *F. verticillioides* (*F. moniliforme*) o *F. proliferatum* e o *F. nygami* produziam essas micotoxinas.

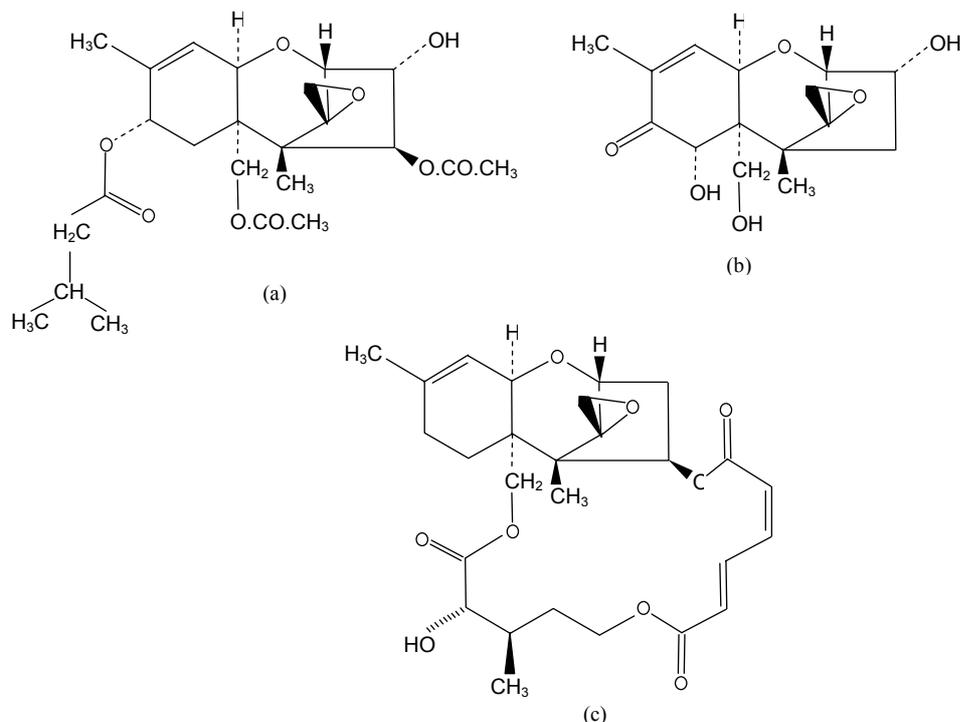


Figura 7 – Tricotecenos. (a) Toxina T-2, (b) dioxinivalenol, (c) verrucarina.

Fonte: Adams e Moss, 1997.

Existem no mínimo sete fumonisinas, quatro do tipo B e pelo menos três do tipo A: FB1, FB2, FB3, FB4, FA1, FA2, FA3, sendo as principais FB1, FB2 e FB3 (Figura 8) e as demais consideradas secundárias e não tão bem caracterizadas. Outra fusarina, o tipo C, também pode ser produzida por *F. verticillioides*. Conservantes como ácido benzóico e carvacrol, têm sido inibidores ou retardadores do crescimento micelial em diversas linhagens de *Fusarium* spp. sendo o ácido benzóico o mais efetivo (JAY, 2005).

O ácido penicílico (Figura 9) é produzido por um grande número de fungos do gênero *Penicillium*, principalmente *P. cyclopium*, além de membros do grupo *A. ochraceus*. Tem propriedades semelhantes à patulina, outra micotoxina encontrada em frutas, sucos de maçãs, sidras, pães mofados e lingüiças, que também é secretada por fungos do gênero *Penicillium* (JAY, 2005).

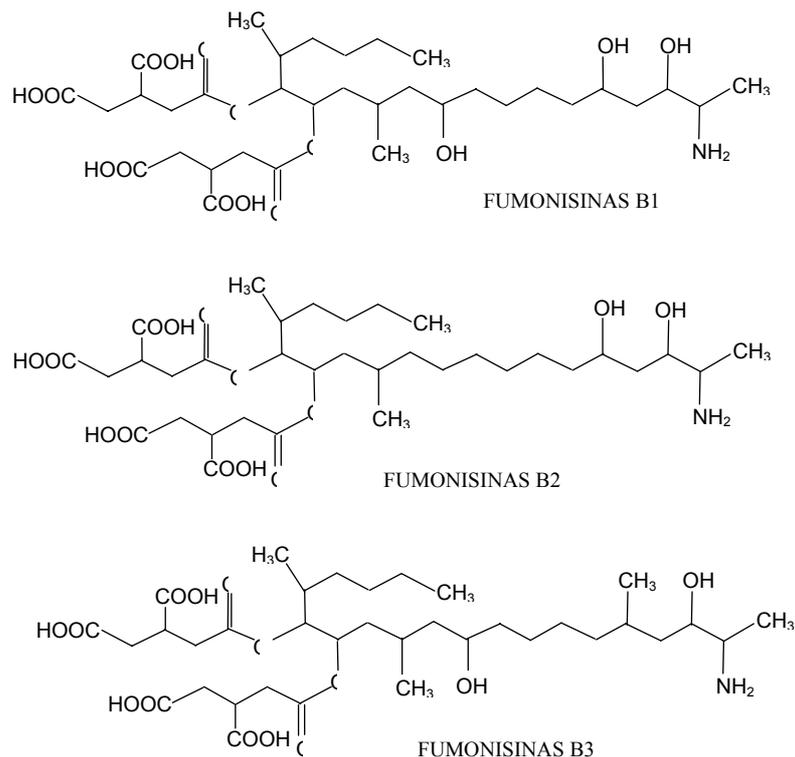


Figura 8 – Estrutura molecular das fumonisinas B1, B2 e B3.

Fonte: Cançado e Freitas, 2004.

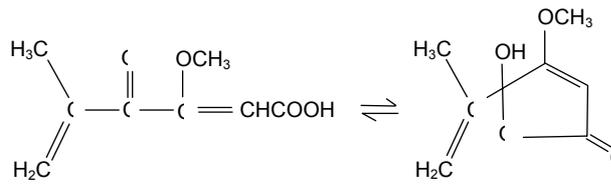


Figura 9 – Estrutura molecular do ácido penicílico.

Fonte: Jay, 2005.

3.2.2 Toxicidade

Os alimentos contaminados por microrganismos causadores de doenças, ao serem ingeridos, permitem que os patógenos ou seus metabólitos invadam os fluídos ou tecidos do hospedeiro causando doenças graves (PINTO et al., 2001).

As micotoxicoses são doenças ou síndromes resultantes da ingestão de alimentos (grãos, rações etc.) contaminados com micotoxinas (PINTO, 2005). As micotoxicoses podem causar ao organismo do animal e/ou do ser humano, dano no crescimento, afetando funções do organismo e desenvolvendo tumores malignos, podendo, inclusive, ser letal. Os órgãos mais freqüentemente afetados são o fígado, os rins, o cérebro, os músculos e o sistema nervoso. Os sintomas vão desde náuseas e vômitos até a falta de coordenação dos movimentos (ataxia) e morte (BORGES et al., 2002).

Casos de intoxicações por micotoxinas são conhecidos desde a idade média; elas podem resultar da ingestão de toxinas por três tipos de fungos: fungos macroscópicos: os mais conhecidos são os cogumelos tóxicos “death cap mushroom” ou *Amanita plalloides*; fungos parasíticos: infectam e causam doenças nas plantas no campo: *Alternaria*, *Cladosporium* e *Fusarium*; fungos de estocagem: são aqueles que, sob condições ideais, são capazes de crescer rapidamente durante o cultivo, colheita, secagem, transporte e estocagem, *Aspergillus* e *Penicillium* (CAMPOS e ZORZENON, 2006).

As micotoxinas podem apresentar atividade mutagênica, carcinogênica e teratogênica, o que significa dizer que apresentam os quatro tipos de toxicidade:

- a) Aguda, resultando em danos aos rins ou fígado;
- b) Crônica, resultando em câncer hepático;
- c) Mutagênica, causando danos no DNA;
- d) Teratogênica, causando câncer em crianças por nascer (FORSYTHE, 2002).

As micotoxinas podem ser classificadas de acordo com os principais órgãos e sistemas afetados (Tabela 2).

Tabela 2 – Classificação das micotoxinas de acordo com os principais órgãos e sistemas afetados.

HEPATOTOXINAS (toxinas do fígado)	CITOTOXINAS (toxinas das células no trato alimentar)
Sporodesmina Aflatoxina Luteosquirina Cicloclorotina Rubratoxinas	Tricotecenos Toxina T-2 Diacetoxiscirpenol Neosolaniol Nivalenol Diacetilnivalenol Dioxinivalenol (DON, vomitoxina) Toxina HT-2 Fusarenona X
NEFROTOXINAS (toxinas do rim)	MICOTOXINAS ESTROGÊNICAS (efeitos semelhantes a hormônios)
Ocratoxina Citrinina	Toxina F-2 (Zearalenona)
NEUROTOXINAS (toxinas do sistema nervoso)	OUTRAS MICOTOXINAS
Penitrema Patulina Citreoiviridina Miscelânea de neurotoxinas	Ergotoxina Festucocicose Luponoose

Fonte: Fernandes, Malaguido e Silva, 2006.

Em 1993, a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (AIPC) classificou como principal classe de cancerígenos humanos, misturas de aflatoxinas que ocorrem naturalmente, principalmente em derivados de cereais usados na alimentação na África e América (BOGANTES-LEDEZMA et al., 2004; FERNANDES, MALAGUIDO e SILVA, 2006). As aflatoxinas caracterizaram-se como um problema freqüente para a produção avícola. Sua ação tóxica que determina os piores resultados de desempenho inclui redução da atividade de enzimas pancreáticas e diminuição da concentração de bile (WYATT, 1993), aumento da

incidência de problemas de pernas, lesões no nervo ciático (LEESON E SUMMERS, 1988) e antagonismo ao metabolismo de vitaminas, proteínas e aminoácidos, lipídios e carboidratos, agindo sobre coenzimas ou complexos enzimáticos, principalmente no fígado, além de afetar a estrutura química do DNA (BURDITT, HAGLER.e HAMILTON, 1983; KIESSLING, 1986; KURATA, 1990; SPEIGHT, 1993).

A toxicidade das seis aflatoxinas mais potentes decresce na seguinte ordem: B1 > M1 > G1 > B2 > M2 ≠ G2 (JAY, 2005). O efeito tóxico das aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), denominado de aflatoxicose, pode ser de curta duração (aflatoxicose aguda) ou de longa duração (aflatoxicose crônica). Bovinos, suínos e aves podem ingerir rações formuladas com grãos de milho contaminadas com essas micotoxinas, convertendo-as em seus metabólitos tóxicos, que entram na cadeia alimentar humana via consumo de leite, carne e ovos. Quando grãos de milho tornam-se contaminados, por exemplo, com a aflatoxina B1, que é um carcinógeno, pode, via arraçoamento animal ser convertida em outro carcinógeno potencial (aflatoxina M1) e ser liberada no leite (PINTO, 2005).

Tem sido demonstrado que AFB1 liga-se ao DNA mitocondrial de células do fígado, preferencialmente ao DNA nuclear, daí sua prevalência como carcinógeno hepatocelular (JAY, 2005). Bioanálises em várias espécies de peixes, aves, roedores, primatas, mostraram que a AFB1 tem ação carcinogênica em todos os animais graças à sua capacidade de induzir mutações (BOGANTES-LEDEZMA et al., 2004).

A toxicidade destas substâncias é maior para animais mais jovens e machos do que para animais mais velhos e fêmeas, principalmente aves e suínos. Além disso, os efeitos tóxicos são aumentados por dietas pobres em proteínas ou que prejudicam o fígado, ou na presença do vírus da hepatite B. Entre as conseqüências que se acredita serem devidas a aflatoxinas, pode-se citar a Síndrome de Reye na Tailândia e Nova Zelândia e hepatomas agudos em crianças em Uganda (JAY, 2005).

As respostas diante dos efeitos tóxicos de um determinado composto podem ser diferentes uma vez que a toxicidade resultante é influenciada pela atividade metabólica que a substância sofre no corpo do animal. É este o caso da AFB1, a partir da qual se forma uma série de metabólitos (Figura 10) no fígado de diferentes espécies animais. (ADAMS e MOSS, 1995).

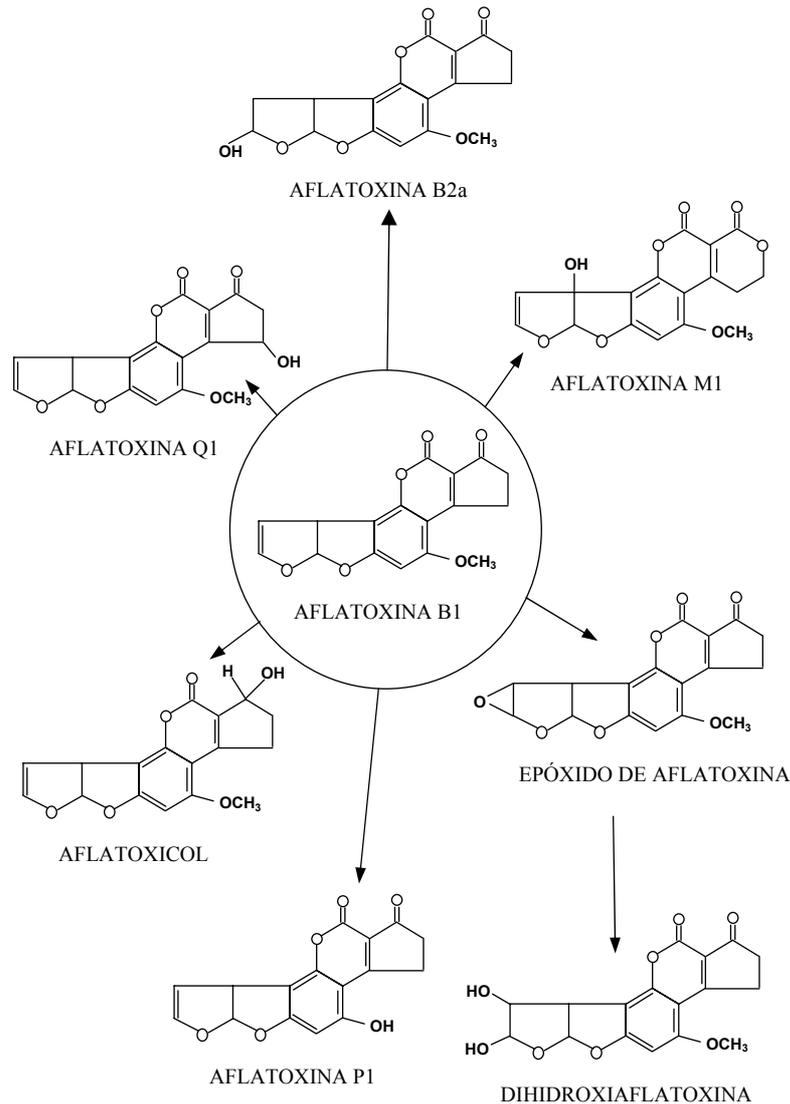


Figura 10 – Metabólitos tóxicos da aflatoxina B1.

Fonte: Adams e Moss, 1997.

No que diz respeito às ocratoxinas, a AO é a mais tóxica. São potencialmente nefrotóxicas e carcinogênicas, sendo sua potência variável de acordo com as espécies e o sexo. Também são teratogênicas e imunotóxicas (FORSYTHE, 2002). A ocratoxina age principalmente nos rins. Em dose aguda, em aves, ocorrem tremores e perda de reflexos. Em muitos animais esta micotoxina dificulta a coagulação do sangue e diminui a defesa do organismo contra infecções. Em países da Europa Central, onde ocorrem muitos casos de doenças renais em porcos e humanos, a contaminação dos alimentos por ocratoxinas é maior que em outros onde tais problemas não ocorrem (MALLOZZI e CORRÊA, 1998).

Os suínos, bovinos, aves e ovelhas são muito sensíveis a zearalenona, a qual causa o hiperestrogenismo em suínos, pois a sua molécula é semelhante a progesterona (hormônio feminino) (PINTO, 2005). Problemas de reprodução e infertilidade, assim como má formação das crias também estão associados a esta micotoxina (FORSYTHE, 2002). Em animais jovens ocorre inchaço das mamas, da vulva e, nos casos mais graves, pode haver prolapso vaginal e retal (ADAMS e MOSS, 1995).

Em humanos a zearalenona não apresenta perigo imediato para a saúde, embora deva ser lembrado que a micotoxina é largamente distribuída em tecidos animais e vegetais (CANÇADO e FREITAS, 2004).

Em animais, os tricotecenos causam vômitos, rejeição à ração e afetam o sistema imunológico. Em humanos, causam vômitos, dor de cabeça, febre e náuseas. (FORSYTHE, 2002). Sabe-se que os tricotecenos são imunossupressores, intensificando a reação das vítimas frente a outros agentes infecciosos relativamente insignificantes (ADAMS e MOSS, 1995).

A toxina T-2 é um dos compostos com toxicidade mais aguda dentre os tricotecenos. Segundo Adams e Moss (1995), existem provas suficientes de que esta toxina é o principal agente causador de a aleucia tóxica alimentar no homem, cujos primeiros sintomas estão associados com a lesão das mucosas bucais, da garganta e estômago seguido de inflamação da mucosa intestinal. Sintomas como hemorragia, vômito e diarreia, associados com a lesão do sistema de mucosas, são correntes, mas podem ser curados se administrada uma dieta saudável, livre de contaminação e rica em vitaminas. A exposição prolongada à toxina ocasiona lesão na medula óssea e do sistema hematocitopoiético, seguida de anemia e diminuição dos eritrócitos e plaquetas. A existência de tecido necrótico e de hemorragias na pele também são outras características da doença.

Além destes problemas, a toxina T-2 provoca hemorragias em suínos e bovinos, degeneração da medula óssea e morte. Também causa necrose da mucosa bucal e incrustação no bico de perus (MALLOZZI e CORRÊA, 1998) bem como má formação óssea nas pernas de frangos de corte (PINTO, 2005).

O DON (dioxinivalenol) ou vomitoxina é menos tóxico que a toxina T-2; não se pode afirmar com certeza que o DON e outros tricotecenos sejam imunossupressores como a T-2, embora exista, na literatura, relatos de intoxicações como a do mofo roxo, no Japão, que tem sido relacionadas com essa micotoxina.

Estudos comprovaram a atuação do DON e nivalenol, em surtos de intoxicações de animais alimentados com ração contaminada, nos Estados Unidos, que apresentaram vômitos e diarreia (ADAMS e MOSS, 1995).

Dentre as fumonisinas, as mais tóxicas são B1, B2, B3. A contaminação por fumonisinas (B1, B2, B3, B4, A1 e A2.) em grãos de milho é extremamente maléfica à alimentação de animais: nos suínos provoca edema pulmonar, e nos eqüinos, a leucoencefalomalácia na qual a toxina destrói as células cerebrais, (formando grandes orifícios no cérebro do animal) (PINTO, 2005).

Os metabólitos produzidos por *F. verticilliodes* a exemplo da fusarina C que é mutagênica e das fumonisinas que são cancerígenas têm sido associadas, em humanos, com a incidência de câncer do esôfago (ADAMS e MOSS, 1995; PINTO, 2005). Em regiões da África do Sul, onde o milho é componente constante da dieta de populações tribais, há uma correlação muito alta entre câncer de esôfago e a alta contaminação do milho com *F. verticilliodes* e fumonisinas (MALLOZZI e CORRÊA, 1998). Jay (2005) ressalta que não há indícios de atividade hepatocarcinogênicas da fusarina C.

O ácido penicílico pode ser produzido em temperaturas abaixo da ótima para a maioria dos fungos (a 5 °C) e é comprovadamente carcinogênico. Liga-se a grupos –SH e –NH₂, formando compostos que parecem ter sua toxicidade reduzidas. São tóxicos a embriões de galinhas, contaminadas através da alimentação à base de milho (JAY, 2005).

A tabela 3 resume alguns dos efeitos clínicos das micotoxinas em suínos, indicando os seus níveis máximos tolerados. Esses níveis podem variar a depender da suscetibilidade de cada espécie. Os dados da tabela 3 esclarecem que os níveis tóxicos referem-se a pequenas concentrações, o que pressupõe um maior cuidado em adotar medidas que possa garantir a segurança alimentar das rações consumidas por animais, e conseqüentemente dos seres humanos. Trata-se, portanto, de um caso de saúde pública o qual não pode passar despercebida das autoridades governamentais (FERNANDO, MALAGUIDO e SILVA, 2006).

Tabela 3 – Efeitos clínicos das micotoxinas em suínos.

Toxina	Nível tóxico	Principais sinais clínicos
Aflatoxina	> 300 ppb	Redução no crescimento, lesão hepática, imunossupressão, icterícia.
Zearalenona	> 1 ppm	Infertilidade, anestro, mortalidade embrionária, prolapso retal, alteração na qualidade do sêmen.
Tricotecenos (T2, DAS, DON)	> 1 ppm	Vômito, inapetência, imunossupressão.
Ocratoxina e citrinina	> 200 ppb	Redução no crescimento, lesão no fígado e rim.
Fumonisina	> 20 ppm	Redução no crescimento e consumo, problemas respiratórios edema pulmonar.
Ergotoxina	0,1 – 1%	Redução no consumo, agalaxia em animais lactantes e mortalidade de leitões.

Fonte: Fernandes, Malaguido e Silva, 2006.

3.2.3 Aflatoxinas e Aflatoxicoses

A contaminação de gêneros alimentícios com micotoxinas pode acontecer de forma indireta através de resíduos presentes na carne, nos ovos e no leite, como conseqüência de alimentos compostos contaminados, base da alimentação animal, ou através da contaminação direta de gêneros alimentícios (cereais, derivados de cereais, frutos secos, frutas e outros) por fungos toxigênicos que podem produzir micotoxinas (SILVA et al., 2007).

Os principais fatores que têm influência sobre a toxicidade das micotoxinas (agravando ou diminuindo) em humanos são: a biodisponibilidade e toxicidade da micotoxina; os sinergismos entre elas; a quantidade ingerida diariamente em função da sua concentração e da quantidade do alimento contaminado ingerido; a continuidade ou intermitência de ingestão de alimento contaminado, o peso do indivíduo, seu estado fisiológico, sua saúde e idade. Assim, as crianças e os jovens são mais susceptíveis a toxicidade devido a uma maior variação do metabolismo basal, eles podem não ter mecanismos bioquímicos suficientes para a detoxificação. Nas crianças o cérebro continua em desenvolvimento durante muitos anos depois do nascimento e isto pode causar uma maior susceptibilidade às micotoxinas que afetam o sistema nervoso central (KUIPER-GOODMAN, 1994).

A conjugação de todos os fatores antes mencionados e que tem influência sobre a toxicidade das micotoxinas produzidas, representa a análise de risco que está relacionada com os problemas de saúde humana (hepatotóxicos, nefrotóxicos, neurotóxicos, gastroentéricos, cancerígenos e imunossupressivos) que podem ser causados pela ingestão desses metabólitos tóxicos. Sua complexidade é na maior parte das vezes difícil de entender e correlacionar, mas devem ser considerados na interpretação dos dados epidemiológicos, o que torna a situação ainda mais complicada (SMITH et al., 1994).

Os estudos de toxicidade das micotoxinas em humanos são normalmente realizados em animais de laboratório. Para uma avaliação completa são necessários os dados de toxicidade aguda, toxicidade dos 30-90 dias de ensaio, mudanças metabólicas, efeitos reprodutivos, teratogenicidade, mutagenicidade e toxicidade crônica ou carcinogênica. Com os dados obtidos fazem-se interpelações e se estabelece alguns parâmetros, a saber:

- I. NOAEL (Nenhum Efeito Adverso nos Níveis Observados) é a estimativa do nível de micotoxina em que não se observa efeitos adversos.
- II. TD50 é a dose de micotoxina com que 50% dos indivíduos podem desenvolver tumores malignos, que estabelece uma estimativa do potencial cancerígeno.
- III. NEL (Nenhum Nível de Efeito) é a estimativa do nível de micotoxina que não causa efeito.
- IV. LOAEL (Nível Mais Baixo de Efeitos Adversos Observados) é o nível de micotoxina em que se observam os efeitos adversos mais baixos.
- V. TDI (Dose Diária Tolerável) é a ingestão diária de micotoxina que pode ser tolerada.

Todos os parâmetros acima devem ser expressos em, microgramas (μg) de micotoxinas/Kg de peso corporal (p.c.)/dia, no caso da TDI pode vir expresso em alguns casos em nanogramas (ng) de micotoxina/Kg de peso corporal (p.c.)/dia. Normalmente o valor da TDI se obtém dividindo o valor de NOAEL ou o valor de NEL por um fator de segurança que pode oscilar entre 50 e 50000 podendo fazer o mesmo com o valor de TD50, tudo isto depende do método de extrapolação utilizado, sendo este último utilizado em micotoxinas carcinogênicas. A TDI vem

acompanhada de um fator de risco que normalmente é 1/100000. Quando o valor de TDI está ainda em estudo e, portanto, é provisório se utiliza a denominação PTDI (Provisória Dose Diária Tolerável) (KUIPER-GOODMAN, 1990; KUIPER-GOODMAN, 1994).

Aflatoxina B1 (AFB1), aflatoxina M1 (AFM1), ocratoxina A (OTA), fumonisina B1 (FB1), vomitoxina o dioxinivalenol (DON) e patulina são as micotoxinas que mais comumente podem afetar a segurança alimentar e em termos relativos, à saúde pública (KUIPER-GOODMAN, 1990; KUIPER-GOODMAN, 1994; JECFA, 2001; WHO, 2002; CAST, 2003). Quase todas elas são imunossupressivas já que inibem a síntese de proteínas e interrompem a síntese de DNA e RNA, inibindo também a fagocitose (SHARMA, 1993).

Em humanos as principais conseqüências das micotoxicoses são hepatotoxicidade, câncer de fígado e provavelmente “Síndrome de Reye” (GIMENO e MARTINS, 2007).

A AFB1 tem uma TD50 de 1,15 microgramas/Kg p.c.(peso corporal)/dia. A TDI para a AFB1 esta compreendida entre 0,11 e 0,19 ng (nanogramas)/Kg p.c./dia, com um fator de segurança de 5000 e um nível de risco de 1/100000. Os valores de NOAEL para a AFB1 são maiores que 0,75 microgramas/Kg p.c./dia, (KUIPER-GOODMAN, 1990; KUIPER-GOODMAN, 1994).

A variação dos níveis de contaminação com AFB1 encontrados ultimamente em diferentes países é muito grande e está sujeita ao tipo de alimento em questão, ao país e a disponibilidade de dados publicados, podendo oscilar entre 0,05 e 789 microgramas/Kg para AFB1 e entre 0,05 e 1870 microgramas/Kg para o somatório das quatro aflatoxinas (B1+B2+G1+G2) em amendoins e de outros frutos secos, especiarias e outros gêneros alimentícios (COST, 2001; MARTINS et al., 2001).

O FDA (Administração de Medicamento e Alimentos) estima que a ingestão de AFB1 através dos gêneros alimentícios está em 2,73 ng/Kg p.c./dia nos USA (Estados Unidos da América) e de 3,5 a 22,4 ng/Kg p.c./dia na Tailândia e na África Oriental. 0,23-1,68 França Níveis de 500 microgramas de AFB1/Kg têm sido encontrados no fígado e em outros tecidos de indivíduos da Europa e da América do Norte. Considerando o valor máximo de TDI para AFB1 de 0,19 ng/Kg p.c./dia, anteriormente referido, estes valores estão muito acima desse valor e abaixo do valor de NOAEL também referido anteriormente que é de 750 ng/Kg p.c./dia (SMITH et al., 1994). Aflatoxin B₁ was found at levels 0.15–1.13 ng AFB₁ g⁻¹

Considerando a concentração máxima mais baixa de AFB1 (2 microgramas/Kg) permitida pela União Européia (UE) em gêneros alimentícios tais como cereais e certos frutos e levando em conta o valor anterior de TDI de 0,19 ng/Kg p.c./dia, um jovem de 50 Kg de peso corporal poderia ingerir 9,5 ng AFB1/dia, por isso a dose diária máxima de alimento uniformemente contaminado com 2 microgramas de AFB1/Kg não poderia ser superior a 5g, aproximadamente. Para o cálculo foi considerado o valor de TDI, que é 4000 vezes menor que o valor do NOAEL (GIMENO e MARTINS, 2003a).

Dentre todas as aflatoxinas a AFB1, é a que apresenta problemas hepatotóxicos com significativas incidências de câncer de fígado relatados desde 1971, com casos de aflatoxicoses agudas na Índia, África e Tailândia provocadas pelo consumo de gêneros alimentícios, essencialmente, milho, mandioca, arroz, batata doce e banana, contaminados com AFB1 em quantidades que poderiam oscilar entre 10 e 144000 microgramas/Kg. A síndrome de Reye caracterizada por uma associação anatomopatológica de um edema agudo cerebral com degeneração da gordura do fígado de crianças, foi atribuída também ao consumo de alimentos contaminados com AFB1, no entanto a etiologia dessa síndrome é muito problemática e sua relação direta com a AFB1 não está suficientemente esclarecida. Quanto às aflatoxicoses crônicas, muitos são os estudos efetuados, principalmente na Tailândia, China e África, chegando-se à conclusão de que existem evidências suficientes para considerar a AFB1 como um dos fatores de risco responsável por problemas carcinogênicos (GIMENO e MARTINS, 1987; SMITH et al., 1994; CAST, 2003).

3.3 PREVENÇÃO E CONTROLE

As micotoxinas secretadas pelos fungos toxigênicos, em seu processo de colonização dos grãos de milho em pré-colheita, são altamente nocivas à saúde animal e humana. A dieta de suínos, bovinos e aves, composta de grãos de milho com elevado nível de micotoxinas, significa ao mesmo tempo perigo e prejuízos. As micotoxinas causam danos irreversíveis à saúde dos animais e, adicionalmente, comprometem a integridade de quem consome carne, leite e produtos derivados dos animais intoxicados. Conforme o novo acordo da Organização Mundial do Comércio

(OMC), em contrapartida à redução nas tarifas alfandegárias, houve direcionamento da atenção em relação às micotoxinas e aos contaminantes fitossanitários. Conseqüentemente, avaliações da contaminação fúngica e de micotoxinas constituem a primeira etapa imprescindível na minimização de problemas internos, que poderão evoluir para o estrangulamento e comprometimento de toda a linha de exportação (PINTO, 2005).

Segundo Martins, Martins e Bernardo (2001), foi observado que rações com contagens de fungos acima de ou 10^7 UFC/g cheiram a mofo, tornam-se organolepticamente anormais e representam perigo potencial à saúde dos animais se apresentarem substâncias tóxicas.

Acarretando sérios danos à saúde humana e enquadrada entre as toxinas naturais de difícil controle, aliada à termorresistência ao processamento industrial, as micotoxinas têm sido assunto exaustivamente discutido pela “World Health Organization-OMS/FAO Joint Expert Committee on Food Additives” - JECFA (OMS, 1996). Em função do perigo que constitui a presença de micotoxinas em alimentos para o consumo humano, os limites máximos de tolerância em países europeus e nos Estados Unidos da América (EUA) são muito rígidos. Já no Brasil a legislação estabelece padrão apenas para amendoim e derivados. (BORGES et al., 2002).

A legislação brasileira, através da resolução RDC nº 274, do Ministério da Saúde, datada de 15 de outubro de 2002 (Brasil, 2002), dispõe que alguns alimentos para o consumo humano como o amendoim, milho em grão e leite podem ter uma concentração máxima de $0,5 \mu\text{g}/\text{Kg}$ a $20 \mu\text{g}/\text{Kg}$ de aflatoxinas, enquanto que a União Européia permite teores de aflatoxinas mais restritos para alguns alimentos comuns à nossa legislação, variando de 2 a $5 \mu\text{g}/\text{L}$ (ppb). Já a Instrução Normativa nº13 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) de 27 de maio de 2004, dispõe que se houver algum lote de mercadoria devolvida por importadores, ou por resultado de inspeção ou fiscalização, este poderá ser liberado para o consumo humano ou animal se o resultado da primeira análise for igual ou menor que o limite de $30 \mu\text{g}/\text{Kg}$ e $50 \mu\text{g}/\text{Kg}$. Como a legislação brasileira existe somente para aflatoxinas, os quadros 1, 2 e 3 evidenciam a legislação vigente dos principais países produtores, consumidores, importadores ou exportadores de grãos a respeito das micotoxinas.

Quadro 1 – Níveis permitidos para aflatoxinas em alimentos para consumo humano.

PAÍS	TIPO DE REGULAMENTO	NÍVEL MÁXIMO ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)***	ALIMENTO
EUA	FDA/USDA	20 (T)	Todos os alimentos
CHINA	MA	20 (A)	Grãos e Fermentados
BRASIL	MS / MA	20 (D) / 20 (T)	Todos os alimentos
MÉXICO	MA	20 (T)	Todos os alimentos
JAPÃO	MA	10 (A)	Todos os alimentos
CORÉIA DO SUL	MA	10 (T)	Todos os alimentos
ESPAÑA	MA	10 (T) / 5 (A)	Todos os alimentos
ARGENTINA	MA	20 (T) / 5 (A)	Amendoim e milho
ÁFRICA DO SUL	MS / MA	10 (T) / 5 (A)	Todos os alimentos
POLÔNIA	MA	20 (T)	Amendoim e milho
SINGAPURA	MS / MA	0	Todos os alimentos
UK	MA	10 (T)	Nozes e derivados
ALEMANHA	MS / MA	4 (T) / 2 (A)	Todos os alimentos
ITÁLIA	MA	10 (T) / 5 (A)	Todos os alimentos
FRANÇA	MS / MA	10 (A)	Todos os alimentos
CANADÁ	MA	15 (T)	Nozes e derivados
SUÉCIA	MS / MA	5 (T)	Todos os alimentos

FONTE: MS/CNPA, 2004; MA/MAARA, 2004; FAO, 2004.

NOTA:

*** códigos: T = total de aflatoxinas; D=B1+G1; A=B1; MA = Ministério da Agricultura; MS = Ministério da Saúde

Quadro 2 – Níveis permitidos para aflatoxinas em alimentos para consumo animal: matérias-primas e rações.

PAÍS	TIPO DE REGULAMENTO	NÍVEL MÁXIMO ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)***	OBSERVAÇÕES
EUA	USDA	10 (T)	Matéria-prima e ração
CHINA	MA	10 / 20 / 50 (A)	Frangos/ suínos/ ração
BRASIL	MA/SNAD/SFA	30 (T)	Matéria-prima e ração
MÉXICO	MA	200 (T) / 0 (T)	Suínos/ bovinos e aves
JAPÃO	MA	1000 (A)	Ração
PORTUGAL	MA	20 (A)	Ração
ESPAÑA	MA	10 (T)	Ração
ARGENTINA	MA	20 (T) / 30 (A)	Ração / Farelo de soja
ÁFRICA DO SUL	MA	10 (T)	Ração
POLÔNIA	MA	20 (T)	Ração
SINGAPURA	MA	0	Ração
UK	MA	30 (T)	Ração
ALEMANHA	MA	0,05 (T)	Ração
ITÁLIA	MA	40 (T) / 20 (A)	Ração
FRANÇA	MA	10 (A)	Ração
CANADÁ	MA	20 (T)	Ração
SUÉCIA	MA	10 (T)	Ração

FONTE: MS/CNPA, 2004; MA/MAARA, 2004; FAO, 2004.

NOTA: códigos: T = total de aflatoxinas; D=B1+G1; A=B1; MA = Ministério da Agricultura;

MS = Ministério da Saúde

Quadro 3 – Níveis permitidos para aflatoxinas em alimentos para consumo humano – Organizações econômicas.

PAÍS	NÍVEL MÁXIMO (µg/Kg) ^{***}	ALIMENTO
EUA	20 (T)	Todos os alimentos
CANADÁ	15 (T)	Nozes e derivados
MÉXICO	20 (T)	Todos os alimentos
MERCOSUL	20 (T)	Milho, farelo e amendoim
UNIÃO EUROPEIA	20 (T)	Todos os alimentos

FONTE: FAO, 2004.

NOTA: ***T = total de aflatoxinas

Mais de 90 países apresentam regulamentação própria ou níveis máximos para algumas micotoxinas, dependendo do tipo de matriz. A União Europeia tem uma legislação (Official Journal of the European Communities, 2002a y 2002b; Official Journal of the European Union, 2003; Micotoxinas, 2003) para micotoxinas em gêneros alimentícios para consumo humano; atualmente os níveis máximos admissíveis estão estabelecidos entre 2 a 8 microgramas/Kg para AFB1 e de 4 a 15 microgramas/Kg para AFB1+AFB2+AFG1+AFG2, dependendo dos diferentes alimentos (amendoim, nozes, frutas secas e produtos derivados da sua transformação, cereais e produtos derivados da sua transformação) tanto os utilizados para consumo humano direto, como para ingredientes dos produtos alimentares. A legislação também inclui nesta categoria, aqueles que são submetidos a processos de seleção ou a outros tratamentos físicos antes do consumo humano direto ou como ingredientes de produtos alimentícios, e tem em conta que esses processos podem reduzir a concentração original de AFB1. Também estabelece que essas concentrações máximas admissíveis se referem à parte comestível, excluindo pois a casca dos gêneros alimentícios que a tem. A legislação da UE também estabelece níveis máximos permitidos de, 5 microgramas/Kg para AFB1 e de 10 microgramas/Kg para AFB1 + AFB2+ AFG1 + AFG2. No caso de alimentos infantis elaborados a base de cereais para lactantes e crianças de pouca idade e alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiais dirigidos especificamente para os lactantes, a concentração máxima permitida de

AFB1 é de 0,10 microgramas/ Kg (OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION, 2004).

Para as outras aflatoxinas em países como Austrália, Canadá, Colômbia, Hungria, Índia, Japão, México, Cuba, Tailândia e USA há também níveis máximos permitidos que oscilam entre 5 e 30 microgramas/Kg para AFB1 e para a soma das quatro aflatoxinas, dependendo do país e do alimento em questão (frutos de casca rija e os seus produtos, amendoim, todos os gêneros alimentícios), destacamos a Índia com o nível de tolerância mais alto (30 microgramas AFB1/Kg para todos os gêneros alimentares) e o México e USA com o nível de tolerância mais alto para a soma das quatro aflatoxinas (20 microgramas/Kg em todos os gêneros alimentícios) (SMITH et al., 1994).

O relatório do “Council for Agricultural Science and Technology” estabelece que um dos objetivos para o século XXI é o desenvolvimento de uma legislação uniforme, em nível mundial, para os limites de contaminação dos alimentos por micotoxinas. Os objetivos serão a identificação das nações que seriam sujeitas a um maior impacto, caso se estabelecesse legislação mais rígida, e a avaliação dos benefícios para a saúde humana, bem como os prejuízos em nível econômico, caso se optasse por tal. Estes padrões legislativos levariam a que, entre as nações industrializadas, fossem os Estados Unidos a experimentar maiores perdas econômicas. As condições ambientais dos países em desenvolvimento são, no entanto, mais favoráveis à presença de micotoxinas. Contrariamente às preocupações expressas pelos legisladores, não seriam os países menos desenvolvidos, como as nações africanas sub-sarianas, a experimentar as maiores perdas econômicas, mas antes a China e a Argentina (WU, 2004).

A Comissão do “*Environmental Health Criteria for Mycotoxins*” da OMS considera em termos de exposição ocupacional as micotoxinas, dois grupos potencialmente de risco (OMS, 2004):

- Aqueles que manuseiam grãos, rações animais, amendoim, etc., onde a contaminação pode ocorrer através do ar contaminado;
- Aqueles que trabalham com toxinas, nas experiências científicas ou puras, usadas como padrões analíticos.

A quantificação prévia de micotoxinas é um indicativo do perigo potencial do alimento, pois nem sempre é realizada a pesquisa de micotoxinas devido ao seu alto custo (BORGES et al., 2002). A identificação das espécies fúngicas contaminantes é um importante sinalizador quanto à presença de micotoxinas nos substratos, indicando um caminho para a prevenção da produção das mesmas (FARIAS et al., 2000).

Uma boa maneira de prevenir e controlar os fungos toxígenos e micotoxinas é interferir nos fatores que favorecem o seu desenvolvimento e conseqüente produção de toxinas. Esses fatores são classificados em 03 categorias: fatores físicos, químicos e biológicos, são eles:

- Umidade relativa (do ar);
- Conteúdo de umidade do alimento bem como a sua composição;
- Temperatura;
- Luz;
- Ventilação;
- Microclima (composição da atmosfera gasosa);
- Danos mecânicos;
- Competição microbiológica;
- Linhagem do fungo contaminante e fungicidas;
- pH (alimentos ácidos são excelentes substratos, mas a faixa entre 5-6 é ideal).
- Remoção física de grãos contaminados por fungos, que pode ser realizada manualmente, eletronicamente, por densidade, microscopia, através da luz ultravioleta ou polimento.
- Remoção química: extração química de aflatoxinas por meio de solventes polares, mistura de solventes e azeótropos; a desvantagem é que não conseguem extrair a toxina completamente, além de alguns produtos alterarem as características organolépticas.
- Remoção por adsorção: agentes sequestrantes de aflatoxinas ou “esponjas químicas”, não possui efeito tóxico, mas é um método ainda caro.
- Destruição por agentes físicos: calor, irradiação, raios ultravioletas.
- Destruição química: tenta converter as toxinas em agentes não tóxicos, têm sido testadas várias substâncias: água oxigenada, amônia, soluções de sódio ou

cálcio, trimetilamina ou hidróxido de cálcio e ozonização. A maioria foi eficiente, mas, as características organolépticas foram alteradas.

A prevenção contra a infecção dos grãos de milho por fungos promotores de grãos ardidos deve levar em consideração um conjunto de medidas:

- utilização de cultivares de milho com grãos mais resistentes aos fungos dos gêneros *Fusarium* e *Stenocarpella*;
- realização de rotação de culturas com espécies de plantas não suscetíveis aos fungos dos gêneros *Fusarium* e *Stenocarpella*;
- interrupção do monocultivo do milho;
- promoção do controle das plantas daninhas hospedeiras dos fungos do gênero *Fusarium*;
- uso de sementes de alta qualidade sanitária;
- não utilizar altas densidades de plantio;
- utilização de cultivares de milho com espigas que dobram para baixo após a maturidade fisiológica dos grãos;
- não colher espigas atacadas por insetos, pássaros e roedores;
- não colher espigas de plantas tombadas;
- não retardar a colheita dos grãos;
- realizar o enterro de restos de culturas de milho infectados com fungos causadores de grãos ardidos (PINTO, 2005).

A contaminação por micotoxinas pode ocorrer, não obstante esforços em relação à sua prevenção. Portanto, outros meios devem ser considerados, reconhecendo-se que devem ser aplicados apenas se as medidas preventivas falharem e não como prática de armazenagem.

Uma das medidas de prevenção contra as micotoxinas é o plantio de cultivares de grãos que possuam maior resistência à contaminação fúngica no período pré-colheita. O tratamento do milho antes do armazenamento é uma solução viável para prevenir o crescimento fúngico pós-colheita. Várias substâncias químicas podem ser empregadas, porém os ácidos orgânicos são mais comumente utilizados. Além da conservação e prevenção do crescimento fúngico, o uso de tais substâncias permite armazenar os grãos com maiores teores de umidade, otimizando o uso do

secador e permitindo a aquisição do milho no período da colheita com melhores preços (HERMANNNS et al., 2006).

Alguns microrganismos, especialmente outros fungos, têm se mostrado eficientes no controle do crescimento de fungos toxígenos e na inibição de micotoxinas. Ciegler e colaboradores (1966) demonstraram que a bactéria *Flavobacterium aurantiacum* degradava AFB1 em meios de cultura. Entre bactérias lácticas, *Lactobacillus acidophilus* apresentou-se como eficiente inibidor do crescimento e produção de toxina por *A. flavus*. A colonização de milho por *Fusarium* spp. tem sido claramente inibida por *Aspergillus* e *Penicilium* spp. a 25° C, dependendo da Aa e da espécie testada (JAY, 2005). Fungicidas são utilizados por agricultores por possuírem uma boa eficiência, porém, devem ser usados com cautela devido à toxidez que podem causar em animais e seres humanos, e, apresentam um outro inconveniente, são dispendiosos (HERMANNNS et al., 2006).

3.4 PRODUÇÃO DE MILHO E DERIVADOS NO BRASIL

3.4.1 Aspectos gerais

Os cereais representam uma das fontes mais importantes de carboidratos na dieta humana. Cada espécie está adaptada a certas condições climáticas, apesar de programas de produção vegetal tentarem minimizar as limitações climáticas (ADAMS e MOSS, 1995).

O milho (*Zea mays* L.), por exemplo, era consumido pelos povos americanos desde o ano 5000 a.C., sendo a fonte de alimentação básica de várias civilizações como Maias, Astecas e Incas, que reverenciavam este cereal na arte e na religião. A expansão marítima no século XVI exportou o cultivo do milho para outros continentes. Cristóvão Colombo trouxe as primeiras sementes para Europa e os portugueses as levaram à Ásia, tornando-o o terceiro cereal mais cultivado e consumido em todos os continentes. No Brasil, seu cultivo vem desde antes do descobrimento; os índios, principalmente os guaranis, tinham o milho como o principal ingrediente de sua dieta. Com a chegada dos portugueses o consumo

aumentou e novos produtos à base de milho foram incorporados aos hábitos alimentares dos brasileiros (ABIMILHO, 2007).

A partir da segunda metade do século XX o desenvolvimento de espécies híbridas aumentou a produtividade e a qualidade do milho (ABIMILHO, 2007). Em termos de produção, o milho é atualmente a segunda espécie mais cultivada no mundo, depois do arroz (*Oryzae sativa*). Até a safra de 98/99 o trigo (*Triticum sativum*) detinha a posição de segundo cereal mais produzido, a partir daí foi suplantado pelo milho (GODOY, 2001).

O principal destino do milho é a alimentação animal, absorvendo em média 85% do total produzido. Portanto, a quantidade de milho demandada está intrinsecamente ligada às cadeias produtivas da agropecuária, principalmente a avicultura e suinocultura. Os dados da Abimilho (2007) apontam a alimentação avícola como a principal utilização do milho no Brasil, responsável por 35,8% do consumo total projetado para 2004, com uma estimativa de crescimento chegando a 44,6% em 2007. Em seguida, aparece a suinocultura, que em 2007 respondeu por 26,1% do consumo (Tabela 4). O milho utilizado para consumo humano representa apenas 3,5% do total.

Tabela 4 – Milho: Brasil – Estimativa de consumo por segmento (toneladas).

Segmento	Consumo						
	2001	2002	2003	2004	2005	2006*	2007**
Avicultura	13.479	14.500	15.427	16.162	19.309	20.022	20.515
Suinocultura	8.587	8.930	8.471	8.852	11.236	11.097	12.022
Pecuária	2.772	2.841	1.911	2.198	2.520	2.479	2.374
Outros animais	1.528	1.543	1.550	1.581	615	660	673
Consumo Industrial	4.050	4.090	4.152	4.256	4.044	4.159	4.369
Consumo Humano	1.505	1.514	1.530	1.568	690	700	705
Perdas/semente	998	913	1.660	1.429	296	310	349
Exportação	2.550	1.583	3.988	5.000	869	4.327	5.000
Outros	3.622	3.550	4.809	4.132	-	-	-
Total	39.091	39.464	43.498	45.178	39.579	43.754	46.007

*Projeções: Setembro/2006 ** Estimativa 2006

Fonte: Abimilho, 2006.

O milho é classificado no Brasil de acordo com os parâmetros oficiais do Paraná e o mercado geralmente trabalha com o milho contendo até 14% de umidade, 1% de impurezas e 6% de grãos ardidos (CLASPAR, 2004 *apud* CANÇADO e FREITAS, 2004). Para efeito de avaliação de sua qualidade, o milho brasileiro é classificado como tipos 1, 2 e 3, de acordo com o grau de impurezas, grãos quebrados, “chochos” ou mofados (TARDIN, 1991) e nos Estados Unidos, de tipos 1 a 5 (DALE, 1994a,b). Tem-se observado que, nas fábricas de ração, muitas vezes encontram-se disponíveis apenas grãos de qualidade ruim ou duvidosa, como o tipo 3, devendo-se proceder à correção nutricional da ração, que, em muitos casos, não é efetuada (CANÇADO e FREITAS, 2004).

Apesar desta classificação, muitas empresas e agricultores fazem um contrato particular para estabelecer o teor de umidade em grãos de milho, visto que este teor determina ou não uma maior proliferação de fungos e bactérias, buscando o teor máximo entre 13,0% e 13,5% (CANÇADO e FREITAS, 2004). Estes acordos funcionam preventivamente no controle do crescimento fúngico, uma vez que, segundo Adams e Moss (1995), a ação dos microrganismos afeta o poder germinativo das sementes, as qualidades organolépticas, o valor nutritivo e o aproveitamento industrial dos grãos.

De acordo com Lopes e colaboradores (1988), o alto conteúdo em carboidratos, principalmente o amido, e de outros componentes, como proteínas e ácidos graxos, faz do milho importante produto comercial, que, em condições inadequadas de armazenamento, pode sofrer perda de valor quantitativo e qualitativo, devido principalmente ao ataque de pragas e fungos, desde o campo até o consumo.

Em muitas regiões tropicais e subtropicais, o clima permite a produção agrícola durante o ano todo, porém, essas mesmas condições, alta umidade e temperatura, também são propícias ao desenvolvimento de fungos. A cultura do milho é muito vulnerável às pragas e doenças, que provocam danos na plantação, nos grãos recém-colhidos e também nos grãos armazenados. Geralmente, o processo de infecção pelos fungos nas sementes e grãos começa já no campo, durante a fase de maturação, e prossegue nas etapas seguintes, quando da colheita, secagem, armazenamento, transporte e processamento (LAZZARI, 1997).

Grande parte das safras agrícolas de grãos é perdida anualmente devido às falhas na colheita, no transporte e nos armazéns. Todos estes fatores agravam-se

com a ausência ou o uso inadequado de medidas de controle de pragas, ocasionando prejuízos ainda maiores. Estima-se que no Brasil 20% da produção anual de grãos, atualmente em torno de 120 milhões de toneladas, é perdida entre a colheita e o armazenamento e que metade dessa perda é devido ao ataque de pragas durante a estocagem, contribuindo para a criação de um ambiente favorável para o desenvolvimento de fungos toxígenos. A tabela 5 mostra a produção de milho no Brasil em toneladas entre os anos de 2001 a 2007, com destaque para a produção em 2003, que representou também o maior percentual de perdas. O maior índice de comprometimento está nas fazendas, onde as instalações são rústicas e precárias (CAMPOS e ZORZENON, 2006).

Tabela 5 – Milho: Brasil – Produção em toneladas/ano.

ANO						
2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
42.289.700	25.280.700	47.410.900	42.128.500	25.006.700	41.682.200	40.828.939

* Projeções FNP - Setembro/2006 ** Estimativa FNP

Fonte: CONAB/FNP * Previsão feita em Agosto/2005 ** Projeções FNP setembro/2006

Puzzi (1986) cita que danos mecânicos nos grãos ocorrem no transporte, na limpeza, secagem e colheita e dão origem à produção de grãos quebrados, partidos e trincados, que aumentam, quanto menor forem os teores de umidade dos grãos.

Os cereais são os produtos de origem agrícola mais consumido no mundo e, em âmbito nacional, a cultura do milho predomina em termos de área cultivada e ocupação de mão-de-obra, sendo considerada de grande importância para a economia brasileira (FARIAS et al., 2000). O milho, cereal consumido "in natura" ou na forma de produtos industrializados, tem grande contribuição na alimentação humana e animal, devido principalmente às suas características nutricionais como excelente fonte energética, em função do alto teor de amido, lipídios, proteínas e vitaminas encontradas nos grãos (PATERNIANI, 1978). Existem mais de 600 derivados do milho, dos quais, aproximadamente 500 se destinam à alimentação humana (PINAZZA, 1993). Os produtos derivados do milho como farinha de milho, fubá, flocos de milho, canjiquinha, xerém, dentre outros, são bastante apreciados na culinária brasileira, tendo participação efetiva como componente básico na dieta

alimentar das camadas mais carentes da população (MELO-FILHO e RICHETTI, 1997). Diante do aumento da demanda para estes produtos no mercado interno, cresce o risco de contaminação por micotoxinas através do consumo do milho e derivados, que muitas vezes não são rigidamente acompanhados pela fiscalização. A tabela 6 mostra a ocorrência de fungos toxigênicos isolados em alguns produtos derivados do milho.

Tabela 6 – Fungos toxigênicos isolados em alguns dos derivados de milho.

ESPÉCIES	PRODUTOS			
	FUBÁ	FARINHA DE MILHO	XERÉM	TOTAL
<i>Absidia cylindrospora</i> Hagem	X			1
<i>Aspergillus candidus</i> Link	X			1
<i>A. flavus</i> Link	X	X	X	3
<i>A. tamarii</i> Link		X		1
<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijn	X			1
<i>Emericella nidulans</i> (Eidam) Vuill	X			1
<i>Fusarium moniliforme</i> Sheldon	X	X	X	3
<i>Monascus ruber</i> van Tieghen	X			1
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx	X	X		2
<i>P. brevicompactum</i> Dierckx	X		X	2
<i>P. corylophilum</i> Dierckx			X	1
<i>P. crustosum</i> Thom	X			1
<i>P. duclauxii</i> Delacroix	X	X	X	3
<i>P. fellutanum</i> Biourge	X			1
<i>P. funiculosum</i> Thom	X	X	X	3
<i>P. griseofulvum</i> Dierckx			X	1
<i>P. herquei</i> Bainier & Sartory		X		1
<i>P. islandicum</i> Sopp			X	1
<i>P. pinophilum</i> Hedgcock			X	1
<i>P. purpurogenum</i> Stoll	X			1
<i>P. solitum</i> Westling	X			1
<i>P. variable</i> Sopp			X	1
<i>Rhizopus oryzae</i> Went & Prinsen Geerlings	X	X		2
Total de espécimes	16	08	10	34
Percentual	47%	23,5%	29,5%	100

Fonte: Ribeiro, 2003.

3.4.2 Cenário Nordeste: Desafios e Perspectivas

Atualmente a Região Nordeste vem se destacando como a nova fronteira agrícola do Brasil, principalmente nas áreas de Cerrados, que é o bioma de maior produção de grãos da Região. A produção de grãos nos Cerrados Nordestinos é realizada de forma intensiva, com utilização de alta tecnologia e em extensas áreas de terras, que compreendem as grandes propriedades patronais. No período de

2003/04, os Cerrados responderam por 87,4% da produção de soja no Nordeste, 22,0% de café, 28,3% de milho, 13,6% de arroz e 4,9% de feijão. Essa representatividade deverá aumentar nos próximos anos, tendo em vista que as produções vêm evoluindo progressivamente no período (CARNEIRO et al., 2005).

Pelo levantamento da Conab (2006), a produção de milho na região Nordeste na safra 2006/2007 ficou entre 3,2 e 2,7 milhões de toneladas, respectivamente, o que significa uma queda de até 15% ou 5 mil toneladas na produção. De acordo com a tabela 7, o Estado da Bahia lidera a produção de milho entre os Estados Nordestinos.

Tabela 7 – Milho: Brasil – Produção Nordestina em toneladas/ano.

Regiões	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07
Nordeste	1.988.300	2.068.400	3.277.500	3.002.600	2.969.400	3.297.000	2.764.491
MA	310.000	324.500	414.200	430.400	405.100	424.400	398.970
PI	144.600	83.700	287.300	134.000	195.500	233.200	212.240
CE	245.100	622.600	749.400	372.800	257.100	740.400	446.810
RN	8.000	69.600	71.000	58.300	29.400	52.500	50.400
PB	8.400	74.400	123.200	135.300	90.200	168.800	95.700
PE	43.200	78.700	82.100	67.100	141.700	221.100	104.960
AL	116.900	51.700	18.000	21.700	48.600	52.700	39.500
SE	99.000	48.200	133.100	126.200	165.600	239.700	161.150
BA	1.013.100	715.000	1.399.200	1.656.800	1.636.200	1.164.200	1.254.761

Fonte: CONAB/FNP * *Previsão feita em Agosto/2005* ** *Projeções FNP setembro/2006*

3.4.3 Processos industriais do milho

A industrialização do milho é feita através de dois processos: seco e úmido. No processo a seco (Figura 11), o milho, após limpeza e secagem, é degerminado e separado em endosperma e germe. O fluxo do endosperma é moído e classificado para a obtenção de produtos finais, e o germe passa por processo de extração para produção de óleo e farelo. No processo a úmido, o milho após limpeza e secagem, é macerado, formando germe, fibras e endosperma, que é separado em amido e glúten. O amido ainda é convertido em xaropes e modificado em dextrinas e amidos especiais. O glúten é seco e recebe a incorporação das fibras e do farelo após

extração do óleo para composição de produtos de rações animais (ABIMILHO, 2007).

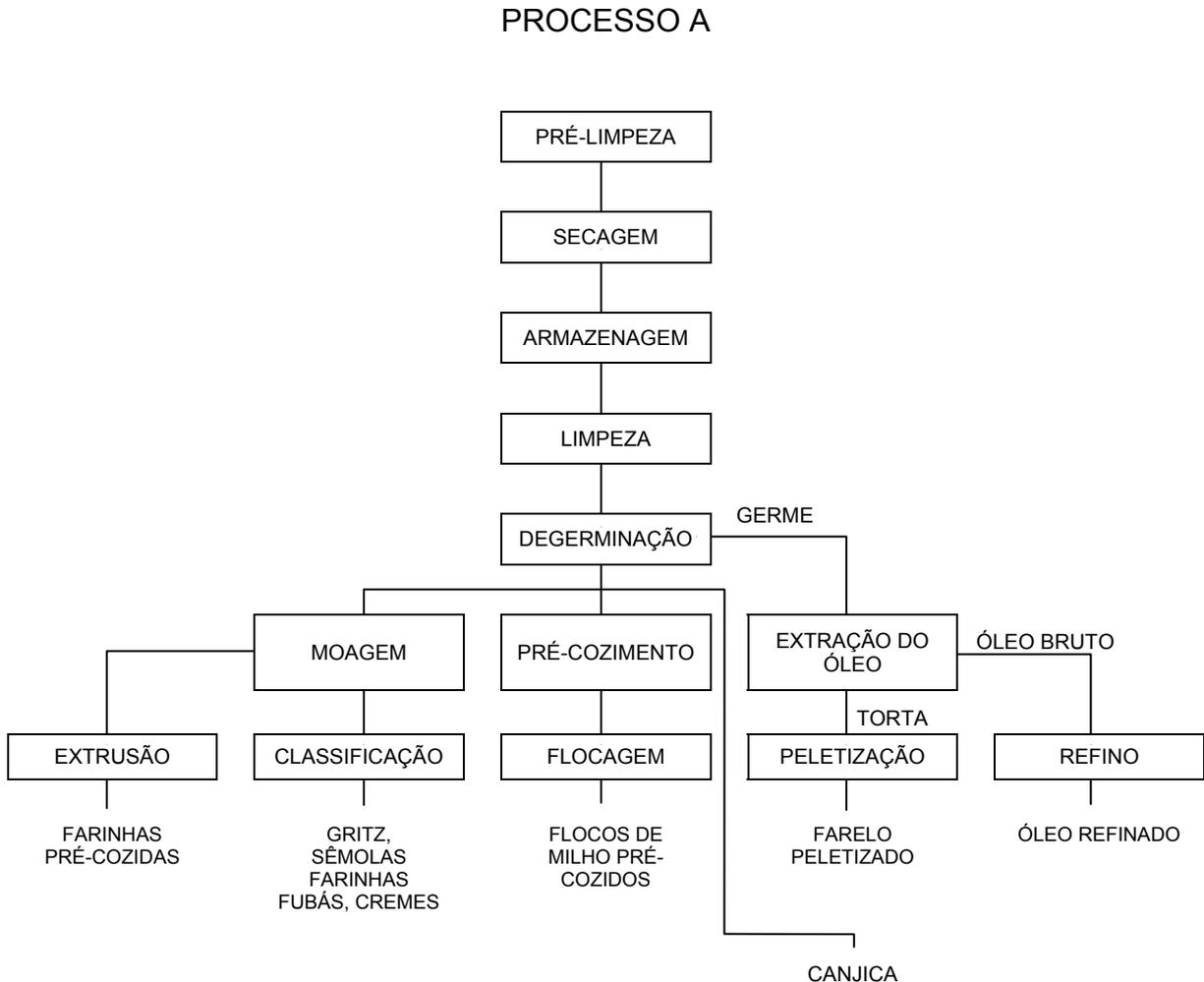


Figura 11 – Fluxograma do processo de moagem a seco do milho.

Fonte: Abimilho, 2007.

Segundo a Abimilho (2007) os produtos derivados do milho para consumo humano são vendidos diretamente ao consumidor através da rede de varejistas, como o creme de milho, farinha de milho, farinha flocada pré-cozida, farinha pré-cozida, flocos de milho, fubá mimoso (fino e médio), canjiquinha (fina e média), canjica (branca e amarela), polenta, polenta pré-cozida, pipoca de milho, salgadinhos, cuscuz e angu. O milho entra ainda na composição de diversos alimentos infantis, doces, balas, sucos, molhos, sopas, vegetais enlatados, bebidas achocolatadas e produtos de panificação. Na forma de xarope, o milho transforma-se

em matéria-prima para sorvetes, geléias, gomas de mascar, licores e sobremesas diversas. Cinquenta gramas de farinha de milho fornecem em proteínas valores iguais aos de um pãozinho francês de mesmo peso, mas com 33% a mais de calorias. Isso significa que o produto pode suprir as necessidades nutricionais da população, além de ser excelente complemento alimentar, "in natura" ou em forma de derivados. De acordo com a tabela 8 o processo de moagem a seco do milho que resulta em derivados, entre eles, a farinha de milho, teve o maior consumo em 2004, decrescendo nos dois anos seguintes.

Tabela 8 – Milho: Consumo por processo a seco e a úmido (x 1000 toneladas).

SEGMENTO	ANO							
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006*
Moagem a seco	1.500	1.450	1.550	1.588	1.590	1.592	1.500	1.500
Moagem úmida	1.200	1.150	1.150	1.180	1.182	1.184	1.200	1.200
Pequenos moinhos	1.450	1.400	1.350	1.384	1.385	1.385	1.450	1.480

*Projeções: Setembro/2006 * Estimativa 2006
Fonte: Abimilho, 2007.

3.4.4 Farinha de milho flocada pré-cozida

Farinha de milho flocada pré-cozida é o produto obtido pela moagem do grão de milho degerminado, pré-cozido ou pré-gelatinizado, adicionado de ferro e ácido fólico, fornecendo no mínimo 4,2 mg (quatro vírgula dois miligramas) de ferro e 150 mcg (cento e cinquenta microgramas) de ácido fólico. O produto deve estar de acordo com a legislação vigente, especialmente a Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002 da ANVISA/MS e Resolução - CNNPA nº 12/1978 da ANVISA/MS.

Características do produto, de acordo com a ANVISA/MS (2002)

O produto é obtido de grãos desgerminados que foram submetidos previamente a pré gelatinização por processo tecnológico adequado. A farinha de milho flocada pré-cozida deverá ser fabricada a partir de matéria prima sã e limpa,

isenta de matéria terrosa, parasitos e larvas. Não pode estar úmida, fermentada ou rançosa.

Organolépticas

Aspecto	Cor	Odor	Sabor
Característico	Amarelo	Próprio	Próprio

Quadro 4 – Características organolépticas da farinha de milho flocada pré-cozida.

Fonte: (ANVISA/MS, 2002).

Físico-químicas

Alimento	Umidade % p/p solução	Acidez em mL % p/p	Amido % p/p	Proteínas % p/p mineral máximo normal	Lipídeos % p/p mínimo fino	Resíduo % p/p máximo
Farinha de milho	15,0	5,0	Mínimo de 72,0	7,0	-	2,0

Quadro 5 – Características físico-químicas da farinha de milho flocada pré-cozida.

Fonte: (ANVISA/MS, 2002).

Microbiológicas

Contagem padrão em placas	Bactéria do grupo coliforme de origem fecal	Clostrídios sulfito redutores (a 44°C)	<i>Staphylococcus aureus</i>	Salmonelas	Bolores e leveduras	<i>Bacillus cereus</i>
Máximo de 5x10 ⁵ UFC/g	Ausência em 1g	Máximo 2x10 ⁴ UFC /g	Ausência em 0,1 UFC/g	Ausência em 25g	Máximo de 10 ³ UFC /g;	Máximo de 10 ³ UFC /g

Quadro 6 – A farinha de milho flocada pré-cozido deve obedecer ao seguinte padrão.

Fonte: (ANVISA/MS, 2002).

Na farinha de milho flocada pré-cozida deve ter completa ausência de sujidades, parasitos e larvas, A farinha de milho flocada pré-cozida deve ser entregue para comercialização com prazo máximo de 30 (trinta) dias da data de

fabricação. A farinha de milho flocada pré-cozida deve ter validade mínima para consumo de 6 meses.

Embalagem

Embalagem primária

A embalagem primária da farinha de milho deve ser do tipo plástica resistente, atóxica. Cada embalagem deverá apresentar peso líquido de 500g (quinhentos gramas), além de todas as informações imprescindíveis e importantes para o consumidor.

Embalagem secundária

A embalagem secundária deve ser de papel reforçado, adequado ao empilhamento recomendado, lacrada e identificada com o nome da empresa, resistente a danos durante o transporte e armazenamento, garantindo a integridade do produto durante todo o seu período de validade e contendo, no máximo, 10 Kg (dez quilos) de peso líquido. A embalagem deverá ser dimensionada de forma a não permitir a existência de espaços vazios entre as embalagens primárias e os limites da embalagem secundária. Será considerada imprópria e será recusada a embalagem defeituosa ou inadequada, que exponha o produto à contaminação e/ou deterioração.

3.4.5 Regulamento técnico Mercosul sobre limites máximos de aflatoxinas permitidos para o milho

O presente Regulamento estabelece os limites máximos de aflatoxinas admissíveis no milho em grão e na farinha ou sêmola de milho para consumo humano, bem como os planos de amostragem e métodos de análise correspondentes e se aplica ao milho em grão e à farinha ou sêmola de milho,

comercializados no território dos Estados Partes, entre eles e às importações extrazona.

Milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído)	Farinha ou sêmolos de milho
B1 + B2 + G1 + G2 (20,0 µg/Kg)	B1 + B2 + G1 + G2 (20,0 µg/Kg)

Quadro 7 – Limites máximos admissíveis de concentração de aflatoxinas: alimento /aflatoxina limite.

Fonte: (ANVISA/MS, 2002).

Os planos de amostragem de milho são executados tomando como base as recomendações dos Planos de Amostragem para Análise de Aflatoxinas em Milho e Amendoim - FAO Food and Nutrition Paper 55, 1993, devendo ser utilizada a Norma de Amostragem ISO 950, 1979 - "Amostragem de Cereais em Grãos". A amostra de milho para laboratório (de 5 kg) será moída em malha 20, em sua totalidade, homogeneizada e posteriormente, subamostrada, no mínimo, em três partes. Poderá ser tomada uma quarta subamostra para análise de rotina. As amostras e subamostras de milho devem ser armazenadas em embalagem de papel, algodão ou outro material apropriado em umidade relativa máxima de 60% à temperatura máxima de 25°C.

Na farinha de milho embalada deve ser considerado um lote de 50 toneladas ou menor. Coletando-se, aleatoriamente, um número de unidades igual à raiz quadrada do número de componentes do lote ou 1% (um por cento) dos mesmos, optando-se pelo menor deles. Quando o número de unidades calculado for fracionário, deve ser tomado o número inteiro superior. De cada uma das unidades deve ser extraído um mínimo de 50g. Estas alíquotas serão homogeneizadas e pelo menor de 300g serão divididas em três subamostras. Podendo ser tomada uma quarta subamostra para análise de rotina. Quando o produto estiver a granel deve-se proceder de acordo com a forma aplicada para cereais em grãos.

Os métodos de análise de referência na determinação de aflatoxinas totais (B1 + B2 + G1 + G2) no milho, na farinha ou sêmola de milho, deve-se ao procedimento AOAC 968.22 e/ou suas respectivas atualizações. O controle das soluções padrões deve observar os procedimentos AOAC 970.44 e 971.22, integrantes da referência supramencionada. Os métodos de análise de rotina para a

determinação de aflatoxinas no milho e na farinha de milho, devem observar os procedimentos analíticos de rotina utilizados normalmente em cada país, desde que estejam validados internacionalmente.

Os critérios para aceitação e rejeição do lote devem proceder da seguinte forma:

- I. Se na análise da primeira subamostra de milho e farinha de milho, o resultado for igual ou menor que 20 µg/kg de aflatoxinas totais, o lote será aceito. Se o resultado da análise for superior a 20 µg/kg de aflatoxinas totais, o lote será rejeitado.
- II. No caso do lote rejeitado na primeira análise, a requerimento da parte interessada, o laboratório que realizou a primeira análise, efetuará a análise da segunda subamostra, na presença dos peritos técnicos indicados pelas partes envolvidas.
- III. No caso de haver discordância entre os resultados analíticos da primeira e da segunda subamostra, poderá ser realizada pelo mesmo laboratório, a análise da terceira subamostra, sendo o seu resultado inapelável.
- IV. Na análise da segunda e terceira subamostras, serão adotados os mesmos critérios de aceitação ou rejeição para os lotes, estabelecidos no item I.

REFERÊNCIAS

ABIMILHO – Associação Brasileira das Indústrias do Milho. **Estatísticas**. Disponível em <<http://www.abimilho.com.br/estatistica4.htm>>, acesso em 22/10/2007.

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Microbiología de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, S. A., 1995. 464p.

ALHADAS, R. V.; STUART, R. M.; BEUX, M. R.; PIMENTEL, I. C. Contagem de bolores e leveduras em fubá e identificação de gêneros potencialmente toxigênicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 79-82, jul. - dez./2004.

ALLCROFT, R.; CARNAGHAN, R.B.A.; SARGENT, K., et al. A toxic factor in Brazilian groundnut meal. **Journal of Veterinary Research**, v.73, p. 128-129, 1962.

ALLCROFT, R.; CARNAGHAN, R.B.A. Groundnut toxicity *Aspergillus flavus* toxin (aflatoxin) in animal products. Preliminary Communication. **Journal of Veterinary Research**, v. 74, p. 863-864, 1962.

BLUNDEN, G.; ROCH, O.G.; ROGERS, D.J.; COKER, R.D.; BRADBURN, N.; JOHN, A.E. Micotoxins in food. **Medical Laboratory Sciences**, London, v.48, n.4, p.271-282, 1991.

BOGANTES-LEDEZMA, P; BOGANTES-LEDEZMA, D.; BOGANTES-LEDEZMA, S. Aflatoxinas. **Acta Médica Costarricense**, San Jose, v.46, n.4, out. 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/amc/v46n4/>>. Acesso em: 22 out. 2006.

BOOTH, C. 1971. The genus *Fusarium*. **Commonwealth Mycological Institute**, Surrey.

BORGES, L. R. *et al.* Contagem de fungos no controle de qualidade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) e isolamento de gêneros potencialmente micotoxigênicos. **B. CEPPA**, Curitiba, v.20, n. 1, p. 103-110, jan./jun. 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº. 274, de 15 de outubro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de

Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho. **Diário Oficial da União**, 16/10/2002.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº. 344, de 13 de dezembro de 2002 e Resolução – CNNPA nº 12/1978 da ANVISA/MS. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho. **Diário Oficial da União**, 16/10/2002.

BULLERMAN, L.B. & TSAI, W.J.. Incidence and levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn and corn-based foods and feeds. **Journal of Food Protection**, v.57, p. 541-546, 1994.

BURDITT, S.J., HAGLER, W.M., HAMILTON, P.B. Survey of molds and mycotoxins for their ability to cause feed refusal in chickens. **Poult. Sci.**, 62:2187-2191, 1983.

CAMPOS, T. B.; ZORZENON, F. J. Pragas dos Grãos e Produtos Armazenados. Instituto Biológico, **Boletim Técnico**, São Paulo, n.17, p.1-47, jul. 2006.

CANÇADO, R. A.; FREITAS, R.; JOÃO, S. Avaliação microbiológica e micotoxicológica de grãos de milho (*Zea mays* Linné) e soja (*Glycine max.* (Linné) Merrill) provenientes de cultivo convencional das sementes naturais e geneticamente modificadas, **Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos**. Universidade Federal do Paraná. Setor de Tecnologia, 2004. p. 87.

CARNEIRO *et al.* **Estudo setorial dos principais grãos produzidos nos cerrados nordestinos**. In: XLIII Congresso da SOBER, Ribeirão Preto, jul. 2005.

CASA, R.T., REIS, E.M. & ZAMBOLIN, L. Fungos associados à semente de milho produzido nas regiões sul e sudeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, 1998. p.370-373.

CAST (Council for Agricultural Science Technology), (2003). Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, Human Systems. **Task Force Report, nº 139**, Ames, Iowa, January 2003, pp.1-199.

CIEGLER, A.; LILLEHOJ, E. B.; PETERSON, R. E., et al. Microbial detoxification of aflatoxin. **Appl. Microbiol.** 1966. 14:934-939.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Indicadores da Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Indicadores da Agropecuária**. Disponível em <www.conab.gov.br/download/indicadores/pubindicadores.pdf>, acesso em 20/12/2006.

CORRÊA, B. Fungos toxigênicos em grãos e rações: biologia, ocorrência e controle. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MICOTOXINAS E MICOTOXICOSES EM AVES, 1995, Curitiba. **Características gerais das micotoxinas e micotoxicoses**. Campinas: FACTA, 1995. p. 15-20.

_____ Fungos toxigênicos: panorama nacional. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS: SIMPÓSIO EM ARMAZENAMENTO QUALITATIVO DE GRÃOS DO MERCOSUL, 9., 1998, Florianópolis. **Atualidades em micotoxinas e armazenamento de grãos**. Florianópolis: V.M. Scussel, 2000 p. 162-168.

COST (European cooperation in the field of scientific technical research), (2001). **Occurrence of toxicogenic fungi mycotoxins in plants, food feed in Europe**. In: A.Logrieco (Ed.), Agriculture biotechnology. European Commision (COST Action 835), Luxembourg, pp. 1-207.

DALE, N. Efeitos da qualidade no valor nutritivo do milho. In: CONFERÊNCIA APINCO 1994 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos-SP, 1994. **Anais...** Campinas: FACTA, 1994a,b, p.67-72.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 1997. **World regulations for mycotoxins. A compendium**. FAO Food and Nutrition Paper 64, Rome,1995.

FARIAS, A. X.; ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M.; ANDERSEN, P. M.; CORRÊA, T. B. S. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no Estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.3, p.617-621, 2000.

FERNADES, P. C. C., MALAGUIDO, A., SILVA, V. A.; **O Risco das Micotoxinas**. Disponível em: <http://www.ergomix.com>. Acesso em: 16 jun. 2006.

FOOD RESEARCH INSTITUTE. University of Wisconsin. **Fusarium Mycotoxins**. Madison; 1997.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

GALVANO, F. et al. Mycotoxins in the human food Chain. In: DIAZ, D.E. **The mycotoxin blue book**. Nottingham: Nottingham University Press, p.187-223, 2005.

GIMENO, A. y MARTINS, M.L. (1987). **Influencia de algunas micotoxinas en los problemas de salud humana**. Curso Teorico Practico sobre Micotoxinas y Hongos Toxicogenicos. Universidad Complutense de Madrid (Facultad de Veterinaria), 6 a 10 de Julio, 1987. pp.1-27 (Libro del Curso).

_____ (2003a). **Análisis de Riesgo de las más Relevantes Micotoxicosis en Humanos**. I Symposium Panamericano de Micotoxinas para la Industria (X Aniversario de la Sociedad Latino Americana de Micotoxicología). 1 a 4 de Abril de 2003 en Ciudad de México. Abstract. p. 34 (Libro del Symposium)

_____ **Micotoxinas y Micotoxicosis em Animales y Humanos**. Disponível em: <http://www.ergormix.com>. Acesso em: 29/03/2007.

GODOY, R. C. B. **Prognóstico da safra paranaense 2001/2002**. Curitiba: SEAB/DCA, 2001.

HERMANNNS, Gislaine *et al.* Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.1, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612006000100002&ing=en&nrm=isso>. Acesso em: 10 nov. 2006.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, Limerick, v.167, n.2, p.101-134, 2001.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). (2001). **Fifty-sixth meeting**, Geneva, 6-15 February 2001, pp.1-33.

KIESSLING, K. H. Biochemical mechanism of action of mycotoxins. **Pure and Applied Chemistry**, v.58, n.2, p.327-338, 1986.

KUIPER-GOODMAN, T. (1990). **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 68: 1017-1024.

_____ (1994). Prevention of Human Mycotoxicoses Through Risk Assessment Risk Management. In: J.D.Miller H.L.Trenholm (eds.), *Mycotoxins In Grain, Compounds Other Than Aflatoxin*. **Eagan Press**, St.Paul, Minnesota, pp. 439-469.

KURATA, H. Mycotoxins and mycotoxicosis: overview. In: POHLAND, A.E., RICHARD, J.L. (Ed.) ***Microbial toxins in foods and feeds***, New York: Plenum Press. 1990. p.249-259.

LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2.ed. Curitiba: Ed. do Autor, 1997. p.148.

LEESON, S., SUMMERS, J.D. Some nutritional implications of leg problems in poultry. **Br. Vet. J.**, 44(1):81-92. 1988.

LEITÃO, M. F. F.; HAGLER, L. C. S. M.; HAGLER, A. N.; MENEZES, T. J. B. **Tratado de Microbiologia: microbiologia de alimentos, sanitária e industrial**. São Paulo: Manole, 1988. v.1, p.181.

LOPES, D.C., FONTES, R.A., DONZELE, J.L. *et al.* Perda de peso e mudanças na composição química do milho (*Zea mays*, L.) devido ao carunchamento. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 17(4):367-371. 1988.

MALLOZZI, Marisa A. B.; CORRÊA, Benedito. Fungos Toxigênicos e Micotoxinas. Instituto Biológico, **Boletim Técnico**, São Paulo, n.12, p.5-26, jul., 1998.

MÁRCIA, B. A.; LÁZZARI, F. A. Monitoramento de fungos em milho em grãos, grits e fubá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.4, p.363-367, 1998.

MARTINS, M.L.; MARTINS, H.M.; BERNARDO, F. (2001). **Food Additives and Contaminants**, 18:315-319.

MERONUCK, R.A. The significance of fungi in cereal grains. **Plant Disease**, v.71, p. 287-291, 1987.

MOSS, M.O. Economic importance of mycotoxins-recent incidence in the United States. **Anim Sci**, v.27, p. 3941- 3949, 1991.

OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. (2002a). **L41/12**. 12/2/02. Reg. (EC) N° 257/2002.

_____ (2002b). **Amending Regulation (EC) 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs L75/20**. 12/3/02. Reg. (EC) N° 472/2002.

_____ 2003. **Amending Regulation (EC) 466/2001 as regard aflatoxins**. 12 December 2003. Commission Regulation (EC) No. 2174/2003. L326/12.

_____ (2004). **Amending Regulation (EC) 466/2001 as regards aflatoxins and ochratoxin A in foods for infants and young children**. 13 April 2004. Commission Regulation (EC) No. 683/2004. L106/3.

OMS. Organización Mundial de la Salud. **Critérios de salud ambiental 11: Micotoxinas**. México, 2004. 131 p.

PATERNIANI, E. **Melhoramento e produção do milho no Brasil**. Fundação Cargill, Campinas, 1978.

PINAZZA, L.A. Perspectiva do milho e do sorgo no Brasil. *In: Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade* (L.T. Bull & H. Cantarella, eds.). Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba, 1993. p.1-10.

PINTO, F. A. C. ; SANTOS, C. D. ; VALE, V. L. ; PORTO, M. L. G. ; BEZERRA, F. S. B. C. Monitoramento da produção de aflotoxina nos alimentos na cidade de Fortaleza, realizado no LACEN – Ceará. *In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS*, 12, 2001, Maceió. **O analista e a gestão da qualidade**. Maceió: LACEN, 2001. p.253.

PINTO, N. F. J. A. Grãos Ardidos em Milho. Embrapa, **Circular Técnica**, v.1, 2005. p. 1-6.

PUZZI, D. **Abastecimento e armazenagem de grãos**, Campinas-SP: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola. 1986. 603p.

RIBEIRO, Sandra A.L. *et al.* Fungos filamentosos isolados de produtos derivados do milho comercializados em Recife, Pernambuco. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.26, n.2, jun. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84042003000200010&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 22 out. 2006.

RODRÍGUEZ-AMAYA, D. B.; SABINO, M. Mycotoxins research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, n.1, p.1-11, fev. 2002.

SABINO, M. Ocorrência e métodos analíticos para determinação de micotoxinas em grãos e rações. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MICOTOXINAS E MICOTOXICOSES EM AVES, Curitiba, 1995. **Anais...** Campinas: FACTA, 1995, p.35-47.

SANTOS, Genivaldo Cruz. **Fungos produtores de micotoxinas em grãos de milho**. 2007. 83 f. Monografia (Especialização em Microbiologia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

SCUSSEL, V. M., RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. & WILLIAM, J. Incidência de aflatoxina em milho (*Zea mays* L.) e em seus produtos derivados, comercializados na região de Campinas, Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.6, 1986. p.75-85.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998.144p.

SHARMA, R. P.; (1993). **Journal of Dairy Science**, 76: 892-897.

SILVA, Rozane Aparecida da et al . Inquérito sobre o consumo de alimentos possíveis de contaminação por micotoxinas na ingesta alimentar de escolares da cidade de Lavras, MG. **Ciênc. agrotec.** , Lavras, v. 31, n. 2, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542007000200026&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 18 junho de 2008.

SMITH, J.E.; SOLOMONS, G.L.; LEWIS, C.W.; ERSON, J.G. (1994). Mycotoxins in Human Nutrition Health. **Directorate-General XII Science**, Research Development (ed.), European Commision, pp. 1-300.

SPEIGHT, D. Influence of Nutrition on Health Control. In: PATTISON, M. **The health for poultry**, Essex (UK): Longman (Veterinary Health Series). 1993. p.101-39.

TRABULSI, L. R. *et al.* **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718p.

TARDIN, A.C. Produção de rações na granja: programa mínimo de qualidade. In: SIMPÓSIO TÉCNICO DE PRODUÇÃO DE OVOS, 1, Campinas, 1991. **Anais...** São Paulo: APA, 1991. p.50-72.

WHO (World Health Organization). Evaluation of certain food additives and contaminants. **Forty-fourth report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. Geneva, 1996. (WHO Technical Report Series, n.859).

_____ (2002). Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. Fifty-sixth report of the Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives. **WHO Technical Report Series 906**. Geneva, pp. 1-62

WINDHAM, M.T. & KING, S.B. Mycoflora of roots of maize at seedling and silking stages in Mississippi. **Plant Disease**, v.67, 1983. p.1366-1368.

WYATT, R.D. Formas prácticas para diminuir exitosamente las pérdidas por micotoxicosis. I. Aflatoxinas. **Avicultura Profesional**, 11(2): 1993. p.64-67.

WU, F. Mycotoxin risk assessment for the purpose of setting international regulatory standards. **Environ. Sci. Technol.**, 38(15), 2004. p.4049-4055.

ZOVICO, C.; FONSECA, H.; CALORIDOMINGUES, M.A.; GLÓRIA, E.M.; BORGUINI, R.G.; SILVEIRA, V.P.; PIEDADE, S.S.; BARBIN, D. Seleção eletrônica pela cor na descontaminação de amendoim contaminado com aflatoxinas. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.56, n.2, p.371-376, 1999.

4. PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL GERAL

Os resultados deste trabalho foram divididos em dois artigos: o primeiro aborda a identificação da microbiota contaminante e o segundo a ocorrência de aflatoxinas e potencial toxígeno em cepas de *Aspergillus* spp. em farinha de milho flocada pré-cozida, processadas e analisadas no período de junho de 2007 a junho de 2008. As amostras foram adquiridas em 15 municípios do Estado da Bahia, cuja localização está representada na figura 12 e caracterizados geograficamente na tabela 9.

Os estudos microbiológicos e micotoxológicos foram realizados respectivamente no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Clínica (LPMC) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas e no Laboratório de Pesquisa em Avaliação de Alimentos, Aditivos e Contaminantes (LAPAAC) do Departamento de Análises Bromatológicas, ambos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia – UFBA. O delineamento experimental geral adotado está representado na figura 13.

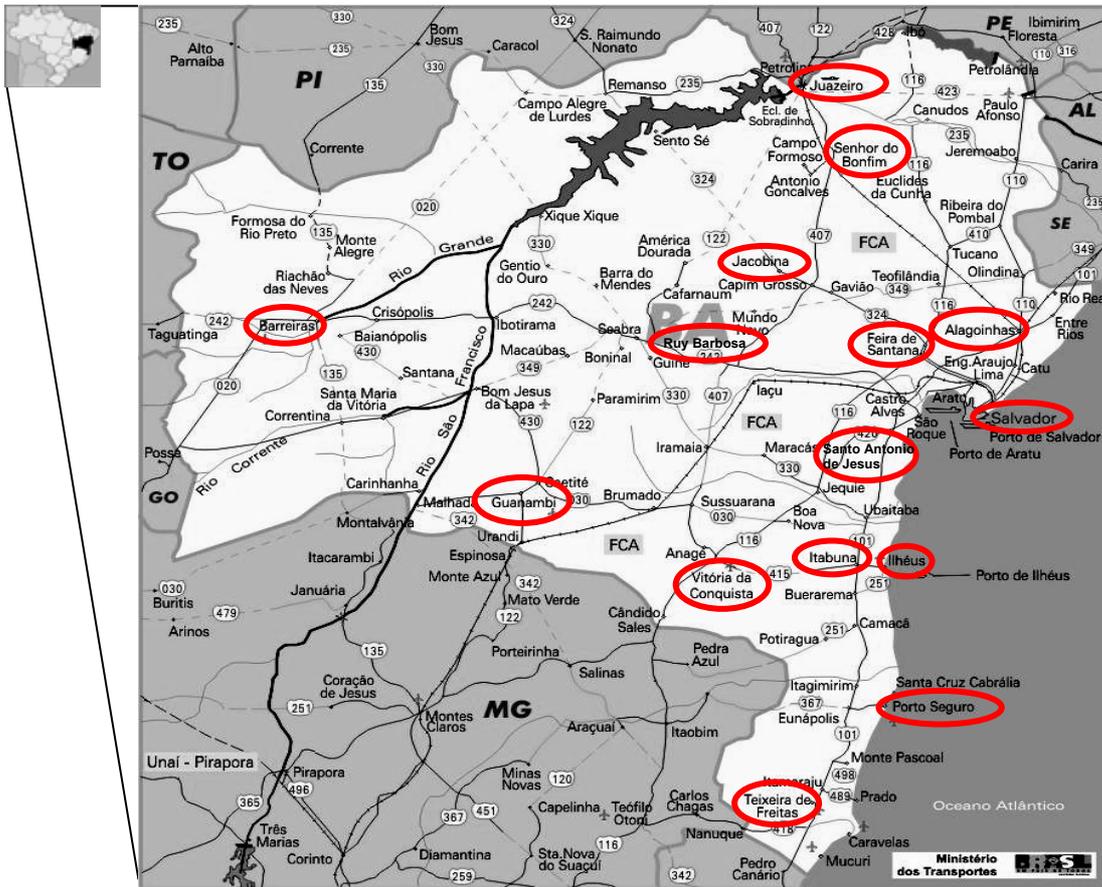


Figura 12 - Mapa de localização dos municípios onde as amostras de farinha de milho flocada pré-cozida foram adquiridas.

Fonte: Google Maps (2008).

Tabela 9 – Municípios e Características Geofísicas.

MUNICÍPIOS	CLIMA (TIPO)	TMA (° C)*	URM (%)	NÚMERO DE HABITANTES
ALAGOINHAS	Quente e semi-úmido	23,8	74	132.725
BARREIRAS	Quente e seco	24,3	67,9	129.501
FEIRA DE SANTANA	Quente e úmido	27	75	571.997
GUANAMBI	Semi-árido	22,6	64	76.230
ILHÉUS	Quente e úmido	24	83	220.144
ITABUNA	Quente e úmido	29	80	210.604
JACOBINA	Semi-árido	29	65	76.463
JUAZEIRO	Árido e semi-árido	26,8	60,7	230.538
PORTO SEGURO	Semi-tropical úmido	24	80	114.459
RUY BARBOSA	Sub-úmido a seco	25,5	76,5	29.358
SALVADOR	Quente e úmido	25,5	81	2.892.625
SANTO ANTÔNIO DE JESUS	Quente	28	80	84.256
SENHOR DO BONFIM	Quente	24	80	72.511
TEIXEIRA DE FREITAS	Úmido e sub-úmido	24,2	83	118.702
VITÓRIA DA CONQUISTA	Tropical de altitude	19,6	78	308.204

Fonte: http://www.brasilchannel.com.br/municipios/mostrar_municipio.asp?;

<http://www.climatempo.com.br/previsao.php?>; <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>.

NOTA: código: * TMA = Temperatura Média Anual; URM = Umidade Relativa Média

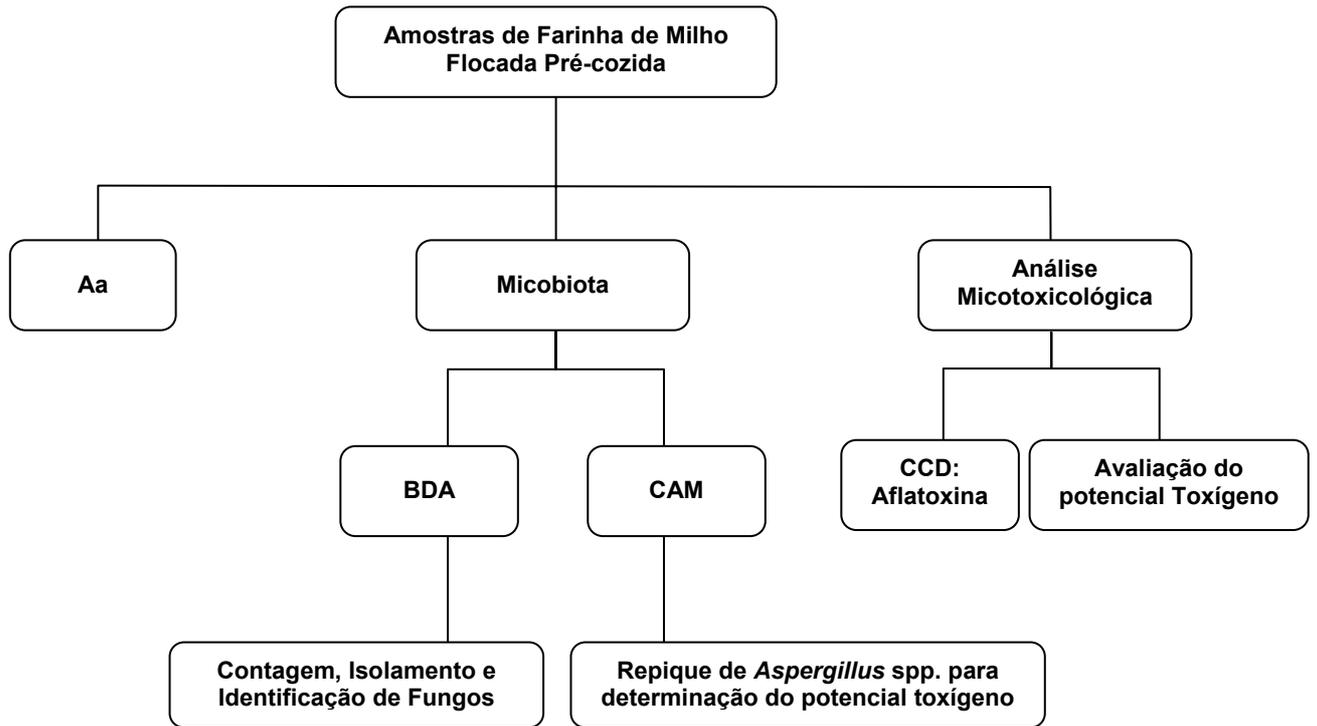


Figura 13 - Delineamento experimental geral.

5. ARTIGO I – IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA CONTAMINANTE EM FARINHA DE MILHO FLOCADA PRÉ-COZIDA COMERCIALIZADA EM DIFERENTES MUNICÍPIOS DO ESTADO DA BAHIA.

RESUMO

A farinha de milho é um alimento popular amplamente consumido na Bahia. Assim como todos os produtos a base de milho, a farinha de milho é suscetível à contaminação por fungos, o que pode representar um risco à saúde do consumidor, uma vez que muitos fungos são potencialmente toxígenos. A identificação desses fungos é um importante sinalizador, quanto à produção e a possível presença de micotoxinas nos alimentos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a presença de microbiota contaminante em farinhas de milho flocada pré-cozida comercializadas em diferentes municípios do Estado da Bahia. No período de junho de 2007 a junho de 2008, foram adquiridas 112 amostras, de diferentes marcas, em variados estabelecimentos comerciais, que foram processadas para isolamento e contagem de fungos em BDA com cloranfenicol. Das amostras analisadas, 32% foram positivas para fungos toxígenos, sendo 50% de fungos de armazenamento, 31% de campo e 17% de ambos; 58% das amostras positivas foram de embalagem de papel; 72% oriundas de municípios com temperatura entre 24 e 25,5°C e 41% com umidade relativa do ar entre 81 e 83%; 25% dos estabelecimentos estavam vinculados ao governo do Estado. Foram identificados *Fusarium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Chrisosporium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Cunninghamella* e *Aspergillus*. Embora a contaminação por fungos toxígenos não se configure necessariamente na presença de micotoxinas, a ocorrência de tais fungos representa um potencial risco à saúde pública, exigindo atenção rigorosa na produção, distribuição e comercialização de farinhas de milho.

Palavras-chave: farinha de milho, fungos toxígenos, micotoxinas.

5. ARTICLE I - IDENTIFICATION OF MYCOBIOTA CONTAMINANT IN MAIZE FLOUR PRE-COOKED FLOCKED MARKETED IN DIFFERENT MUNICIPAL DISTRICTS OF THE STATE OF BAHIA.

SUMMARY

The maize flour is a popular food thoroughly consumed in Bahia. As well as all of the products based on corn, the maize flour is susceptible to the contamination for molds, what can represent a risk to the consumer's health, once many molds are potentially toxigens. The identification of those molds is an important signalization, as for the production and the possible micotoxins presence in the foods. The objective of this work was to evaluate the presence of polluting micobiota in maize flour pre-cooked flocked sold in different municipal districts of the State of Bahia. In the period of June of 2007 to June of 2008, were acquired 112 samples, of different brandss, in varied commercial establishments, that were processed for isolation and counting of molds in PDA with chloranfenicol. From the analyzed samples, 32% were positive for molds toxigens, being 50% of storage molds, 31% of field and 17% of both; 58% of the positive samples were of paper packing; 72% originating from of municipal districts with temperature between 24 and 25,5°C and 41% with moisture of the air between 81 and 83%; 25% of the establishments were linked the government of the State. They were identified *Fusarium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Chrisosporium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Cunninghamella* and *Aspergillus*. Although the contamination for molds toxigens is not necessarily configured in the micotoxins presence, the occurrence of such molds represents a potential risk to the public health, demanding rigorous attention in the production, distribution and commercialization of maize flour.

Keywords: maize flour, toxigen molds, packaging.

5.1 INTRODUÇÃO

Os produtos derivados de milho são bastante apreciados na culinária brasileira, tendo participação efetiva como componentes básicos na dieta alimentar das camadas mais carentes da população (MELO-FILHO; RICHETTI, 1997 *apud* ALHADAS et al., 2004). A farinha de milho flocada pré-cozida, produzida pela moagem de grãos de milho (*Zea mays* L.) degerminados, está presente na cesta básica da população baiana e brasileira. A contaminação de derivados de milho por fungos representa um problema de saúde pública, uma vez que muitos fungos são potencialmente toxígenos por produzirem micotoxinas que são metabólitos secundários sintetizados no final da fase de crescimento exponencial de alguns fungos e que podem apresentar atividade mutagênica, carcinogênica e teratogênica (FARIAS et al., 2000). Os fungos toxígenos podem contaminar os alimentos nas diferentes fases de produção e beneficiamento, desde o cultivo, no campo até o transporte e armazenagem, sobretudo em condições favoráveis de temperatura e umidade. Ressalta-se, ainda, o fato das micotoxinas apresentarem, de modo geral, grande estabilidade química, o que permite a sua persistência no alimento, mesmo após a remoção dos fungos pelos processos usuais de industrialização e embalagem (COULOMBE, 1991). Os fungos de armazenamento *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor* são encontrados em grande número em armazéns, moinhos, silos, moendas, elevadores, equipamentos e nos locais onde são processados produtos agrícolas (MÁRCIA; LÁZZARI, 1998 *apud* RIBEIRO et al., 2003). De acordo com Rodríguez-Amaya e Sabino (2002) os fungos mais freqüentemente isolados de milho e seus derivados em todo o Brasil são *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Neurospora* e *Paecilomyces*. Dentre os gêneros isolados de cereais, os mais freqüentemente associados à produção de micotoxinas são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (KIESSLING, 1986; CAST, 2003). Conseqüentemente as toxinas produzidas por esses fungos são as que apresentam maior ocorrência em produtos vegetais, assim, a identificação das espécies fúngicas contaminantes é um importante sinalizador quanto a possível produção e a presença de micotoxinas nos substratos (FARIAS et al., 2000). Poucos são os dados da literatura sobre a ocorrência de fungos toxígenos nos produtos derivados do milho, este fato assume maior importância ao se

considerar que a farinha de milho compreende um dos principais derivados do milho consumidos no Brasil, sendo utilizada, sobretudo, pelas camadas mais carentes da população, o que pode acarretar riscos à saúde humana decorrentes da ingestão do produto final contaminado. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a microbiota contaminante em amostras de farinha de milho flocada pré-cozida de diferentes marcas, comercializadas em diferentes municípios do Estado da Bahia.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos microbiológicos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Clínica (LPMC) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia – UFBA.

5.3 MATERIAL

Foram analisadas no período de junho de 2007 a junho de 2008, 112 (cento e doze) amostras de farinha de milho flocada pré-cozida em embalagens originais e invioladas, com peso líquido de 500g, dentro do período de validade. As amostras foram adquiridas nos estabelecimentos da Cesta do Povo e Hipermercados distribuídos em 15 municípios do Estado da Bahia. Foi dado destaque para o tipo de embalagem: papel e plástico, sendo cinquenta e seis amostras de cada tipo. Após aquisição as amostras foram imediatamente processadas para as análises e armazenadas em freezer (-18°C) no LAPAAC. De cada amostra retirou-se 25g para análise microbiológica.

4.4 MÉTODOS

4.4.1 Contagem, isolamento e identificação da microbiota

A análise dos fungos contaminantes da farinha de milho flocada pré-cozida foi realizada por meio da contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC),

como descrito por Pitt e Hocking (1997); Kern e Blevis (1999). 25 g do produto foram diluídas em 225 mL de água peptonada 0,1% (1:10) e em seguida, foi feita a diluição de 1:100. De cada diluições (1:10 e 1:100) alíquota de 0,1 mL foi plaqueada na superfície do meio Ágar Batata Dextrose (BDA) com cloranfenicol com auxílio de alça de Drigalski. Todo o experimento foi realizado em duplicata. Após incubação por 5 dias, à temperatura ambiente, as colônias foram contadas e analisadas morfológicamente. Os diferentes morfotipos coloniais foram isolados e repicados em tubos contendo BDA inclinado para posterior identificação através da técnica do microcultivo.

4.4.2 Técnica do microcultivo

De acordo com a técnica descrita por Lacaz (2002), um cubo de um centímetro quadrado de meio BDA foi cortado e colocado sobre uma lâmina de microscopia dentro da placa de Petri, ambas esterilizadas (Figura 14). Uma pequena quantidade da colônia previamente isolada foi inoculada, com auxílio da agulha bacteriológica em “L”, nos quatro lados do bloco de ágar. Com auxílio de uma pinça, foi colocada uma lamínula previamente esterilizada em cima do bloco de ágar inoculado. O sistema foi colocado em uma câmara úmida e então incubado à temperatura ambiente por 7 (sete) dias. Após o período de incubação, com auxílio de uma pinça, a lamínula de cima do bloco foi retirada e colocada sobre uma lâmina de vidro limpa contendo uma gota de azul lactofenol. O bloco de ágar foi desprezado e, em cima do crescimento fúngico na lâmina, foi colocada uma gota de azul de lactofenol e uma lamínula previamente esterilizada. As montagens foram observadas ao microscópio, em objetiva de 10, 20 e 40x.

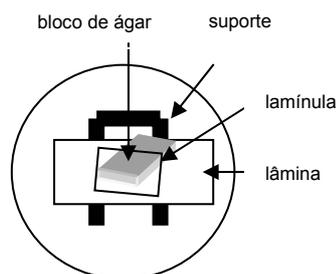


Figura 14 – Disposição da placa de Petri, lâmina e lamínula para o microcultivo.

Os fungos foram identificados quanto ao gênero. Entretanto, aqueles pertencentes ao gênero *Aspergillus* foram identificados até a espécie. Para a identificação dos fungos foram utilizados os compêndios de Fisher e Cook (2001); Larone (1987); Nelson et al. (1983).

5.4.3 Determinação da atividade de água (Aa)

A atividade de água foi determinada instrumentalmente pelo higrômetro AQUALAB, digital, modelo CX-2, fabricado pela DECAGON Devices Inc., EUA.

5.4.4 Processamentos dos dados

Para o processamento dos dados foi utilizando o *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, versão 13.0), para construção do banco de dados, tabelas e cruzamentos de variáveis.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 112 amostras analisadas, 32% (36/112) (Figura 15) foram positivas para fungos toxígenos, sendo 50% (18/36) de fungos de armazenamento, 31% (11/36) de campo e 17% (7/36) de ambos (Figura 16). Os fungos toxígenos classificados como de campo pertencem aos gêneros *Fusarium*, *Cladosporium*, *Chrisosporium* e *Cunninghamella* e os de armazenamento como *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus* (Tabela 10). Dados semelhantes foram encontrados por Lillehoj e Zuber (1988), Julian et al. (1995) e González et al. (1995), ao analisarem diferentes amostras de milho em grão provenientes de diversas localidades. A predominância dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* nas amostras de farinha de milho está de acordo com os estudos prévios sobre a ocorrência de fungos toxígenos freqüentemente isolados em milho e derivados (ADEBAJO et al., 1994; MÁRCIA e LÁZARRI, 1998; FARIAS et al., 2000) e em grão de milho provenientes de diversas regiões do Brasil (RODRIGUEZ-AMAYA, 2002). Segundo

Márcia e Lázzari (1998), *Fusarium* é considerado um fungo de campo que invade grãos e sementes durante o amadurecimento, sendo o dano causado antes da colheita, contudo este fungo não se desenvolve durante o armazenamento. De acordo com Meronuck (1987), espécies de *Aspergillus* são consideradas iniciadoras de deterioração de sementes e grãos, podendo crescer com baixo teor de umidade; segue-se a contaminação por *Penicillium*, com umidade relativa mais elevada decorrente da atividade metabólica dos primeiros invasores. Os gêneros *Cladosporium*, *Chrisosporium*, *Mucor*, *Paecilomyces* e *Rhizopus* foram também observados por Asevedo et al. (1994) em milho. O gênero *Cunninghamella* foi observado por Gayakwad e colaboradores (2001) como contaminante em rações de aves domésticas, porém sua presença em alimento para consumo humano é pouco descrita.

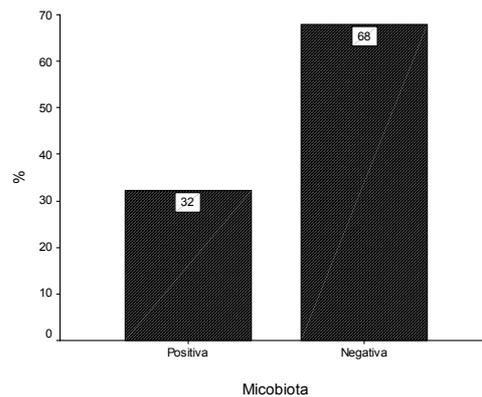


Figura 15 - Presença de micobiota contaminante nas 112 amostras de farinha de milho flocada pré-cozida.

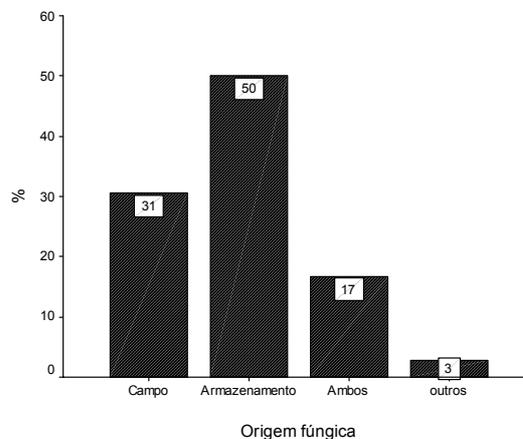


Figura 16 – Origem dos fungos toxígenos isolados nas farinhas de milho flocadas pré-cozidas.

Dentre as colônias características do gênero *Aspergillus* foram isolados as seguintes espécies: *A. fumigatus* 27,8% (10/36), *A. flavus* 22,2% (8/36) e *A. terreus* 2,8% (1/36).

Para a contagem de UFC foram consideradas somente as placas de mesma diluição que apresentaram de 10 a 150 colônias (MISLIVEC et al., 1992). Os valores médios obtidos nas amostras variaram entre $3,3 \times 10^3$ a $0,45 \times 10^3$ UFC/g (Tabela 10), estando de acordo com os limites recomendados internacionalmente (ICMSF, 1980) e pela Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (2002).

Tabela 10 – Gêneros de fungos isolados em farinhas de milho flocada pré-cozida comercializadas em 15 municípios do Estado da Bahia.

Gênero fúngico	Número por amostra	Média (UFC/g) x 10 ³
Fungos do campo		
<i>Fusarium</i>	14	3,3
<i>Cladosporium</i>	3	0,75
<i>Chrisosporium</i>	1	2,2
<i>Cunninghamella</i>	1	0,45
Fungos de armazenamento		
<i>Aspergillus sp.</i>	16	1,7
<i>Penicillium</i>	10	1,3
<i>Paecilomyces</i>	8	0,56
<i>Mucor</i>	2	3,1
<i>Rhizopus</i>	1	2,2
FNE ^a	1	2,2

^a Fungos não-esporulados.

Em relação ao tipo de embalagem, 58% (21/36) das amostras positivas estavam acondicionadas em embalagem de papel (Figura 17), a vulnerabilidade nesse tipo de embalagem à incorporação de umidade é maior do que nas embalagens plásticas, devido a sua porosidade e permeabilidade, resultando em condições mais favoráveis para a permanência dos esporos nas amostras com esse tipo de embalagem.

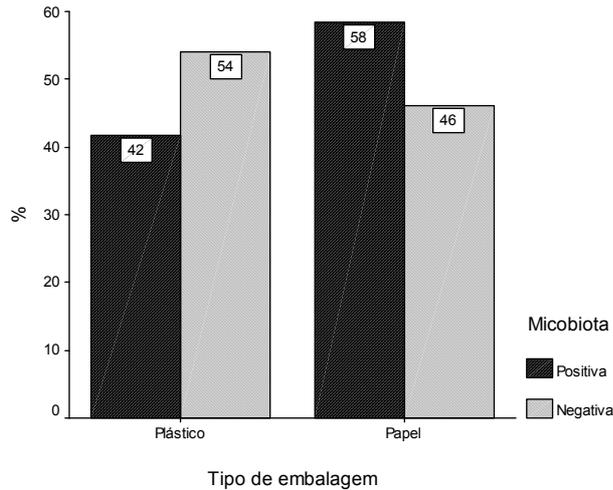


Figura 17 – Tipo de embalagem das farinhas de milho flocadas pré-cozidas que apresentaram fungos toxígenos.

Relacionando-se a ocorrência dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, com os respectivos valores de Aa nas amostras observou-se que, a maior frequência de isolamento dos três gêneros fúngicos ocorreu na faixa de Aa entre 0,50-0,59 (Tabela 11). Segundo Arora et al. (1991) a Aa necessária para o desenvolvimento das principais espécies de fungos toxígenos está acima de 0,76. É importante destacar que no processo de fabricação do derivado de milho em estudo inclui etapas de secagem e posterior moagem, as quais possibilitam a redução da umidade do produto e o conseqüente valor de Aa a níveis não favoráveis ao crescimento fúngico e à produção de micotoxinas. Entretanto, os esporos sobreviventes ao processo, quando inoculados em meios de cultura adequados, com Aa acima de 0,90, como o meio utilizado neste estudo (Ágar Batata Dextrose, Aa = 0,95), conseguem germinar e se desenvolver novamente.

Tabela 11 – Ocorrência dos fungos mais isolados nas amostras de farinha de milho flocada pré-cozida, de acordo com a faixa de atividade de (Aa).

Faixa de Aa	<i>Aspergillus</i>		<i>Penicillium</i>		<i>Fusarium</i>	
	FA ^a	%	FA	%	FA	%
0,40 – 0,49	1	9,1	ND ^b	0,0	ND ^b	0,0
0,50 – 0,59	6	54,5	5	55,5	6	85,7
0,60 – 0,69	4	36,4	4	44,5	1	14,3

^a Frequência absoluta.

^b Não detectado na menor diluição utilizada (10^{-1}).

Foi possível verificar que 41% (15/36) das amostras foram oriundas de municípios com umidade relativa do ar entre 81 e 83% (Figura 18) e que em 72% (26/36) deles a temperatura variou entre 24 e 25,5°C (Figura 19), dados que corroboram com os estudos de Fonseca (1997) que afirma que as condições atmosféricas mais favoráveis à rápida proliferação de fungos se encontravam em torno de 70 a 100% de umidade relativa do ar e temperatura superior a 25°C e os estudos de Taniwaki e Silva (1996) que definem a faixa de 25°C a 28°C como a faixa ótima de crescimento fúngico.

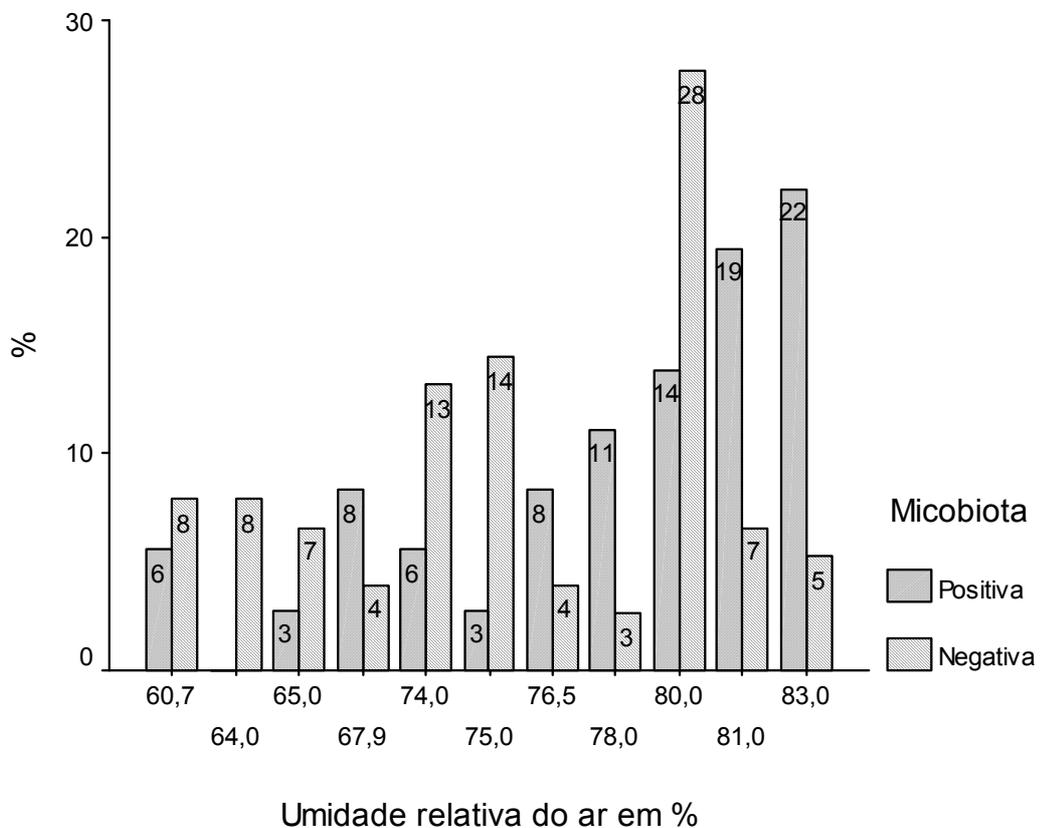


Figura 18 - Umidade relativa do ar nos municípios de origem das farinhas de milho flocadas pré-cozidas com desenvolvimento de fungos toxígenos.

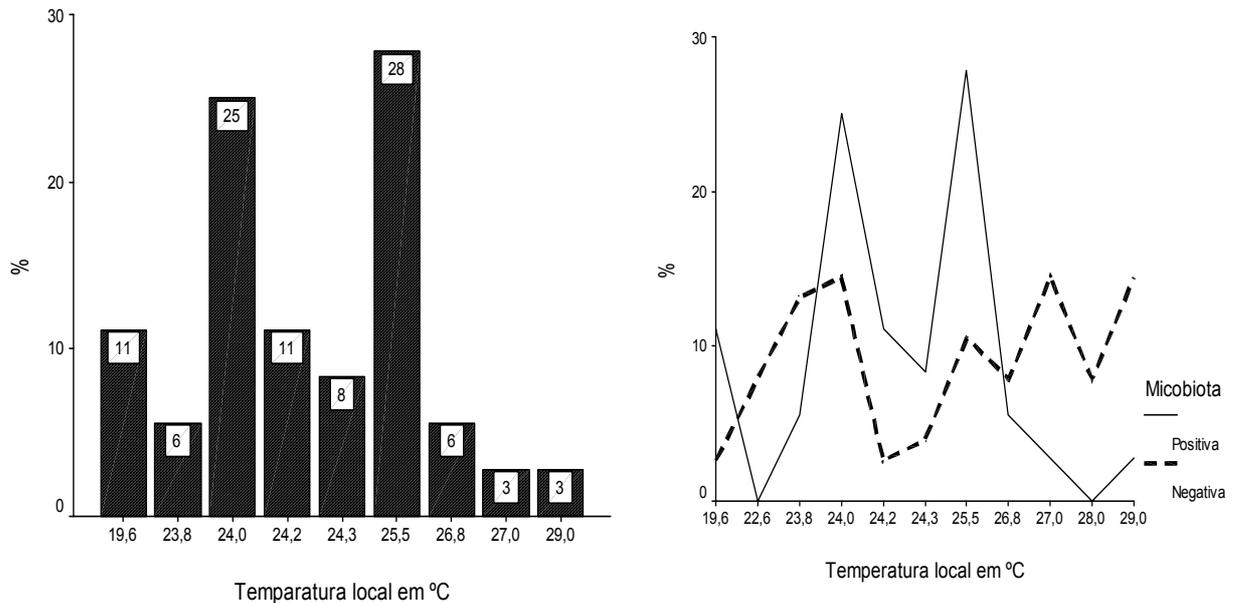


Figura 19 - Temperatura média nos municípios de origem das farinhas de milho flocadas pré-cozidas com desenvolvimento de fungos toxígenos.

Na maioria dos municípios, duas marcas de farinha de milho foram mais comumente encontradas e dentre elas o maior percentual de contaminação fúngica com 25% (9/36) foi procedente de uma empresa de distribuição de alimentos vinculada ao Governo do Estado (Figura 20). Sendo esta empresa responsável pela comercialização de produtos alimentícios a baixo custo, especialmente, para a população carente, este resultado mostra-se importante e preocupante, pois possivelmente é essa parcela da população que mais consome a farinha de milho flocada pré-cozida.

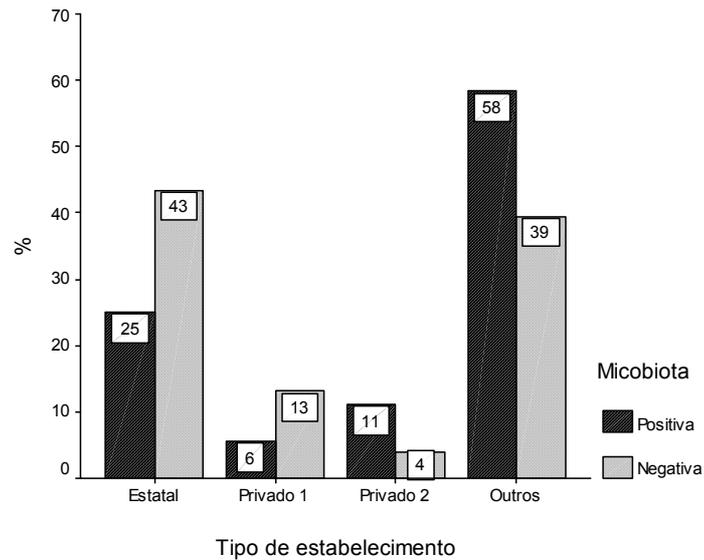


Figura 20 – Tipos de estabelecimentos comerciais onde adquiriu-se as farinhas de milho flocadas e pré-cozidas.

5.6 CONCLUSÃO

Os principais gêneros de fungos identificados nas amostras de farinhas de milho flocada pré-cozida foram *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. A faixa ótima de Aa para os gêneros encontrados estava situada entre 0,50 - 0,59, confirmando os dados encontrados na literatura.

Os resultados da contagem de fungos nos produtos analisados estavam de acordo com os limites recomendados pela Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde e por Órgãos Internacionais.

As amostras com embalagem de papel por terem apresentado maior contaminação fúngica, merecem atenção especial na sua comercialização. Estes produtos alimentícios são largamente consumidos, especialmente, pela população mais carente, assim, estes resultados mostram-se importantes e preocupantes, e, embora a contaminação por fungos toxígenos não se configure necessariamente na presença de micotoxinas, a ocorrência de tais fungos representa um risco à saúde humana, exigindo atenção mais rigorosa, tanto na produção, quanto na distribuição e comercialização de farinhas de milho flocada pré-cozida.

REFERÊNCIAS

ADEBAJO, L. O.; IDOWU, A. A.; ADESANAYA, O. O. Mycoflora, and mycotoxins production in Nigerian corn and corn based snacks. **Mycopathologia**, v.126, p.183-192, 1994.

ALHADAS, R. V.; STUART, R. M.; BEUX, M. R.; PIMENTEL, I. C. Contagem de bolores e leveduras em fubá e identificação de gêneros potencialmente toxigênicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 79-82, jul. - dez./2004.

ARORA, D. K.; MUKERJI, K. G.; MARTH, E. H. **Handbook of applied mycology: foods and feeds**. New York: Marcel Decker, 1991.

ASEVEDO, I. G.; GAMBALE, W.; CORREA, B.; PAULA, C. R.; ALMEIDA, R. M. A.; SOUZA, V. M. Mycoflora and aflatoxigenic species of *Aspergillus* spp. isolated from stored maize. **Revista de Microbiologia**, v.25, p.46-50, 1994.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº. 274, de 15 de outubro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho. **Diário Oficial da União**, 16/10/2002.

CAST. Council of Agricultural Science and Technology. **Mycotoxins**: risks in plant, animal and human systems. Ames: Task Force Report. n. 139, 2003. 199 p.

COULOMBE, R. A. (1991). Aflatoxins. In: SHARMA, R. P.; SALUNKHE, D. K. **Mycotoxins and phytoalexins**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 103-143.

FARIAS, A. X.; ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M.; ANDERSEN, P. M.; CORRÊA, T. B. S. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no Estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.3, p.617-621, 2000.

FISHER, Fran; COOK, Norma B. **Micologia: Fundamentos e Diagnóstico**. Rio de Janeiro: Revinter Ltda, 2001.

FONSECA, Homero. Os fungos e a deterioração de alimentos. **Boletim técnico nº 4**, 1997. Disponível em: www.micotoxinas.com.br. Acesso em 02 de julho de 2008.

GAYAKWAD, S. R.; HARNE, S. D.; KALOREY, D. R.; INGLE, V. C. Prevalence of toxigenic fungi in poultry feed of Nagpur region. **Indian Journal of Comparative Microbiology Immunology and Infections Diseases**, v.22, n.1, p.78-80, 2001.

GONZÁLEZ, H. H. L.; RESNIK, S. L.; BOCA, R.T.; MARASAS, W.F.O. Mycoflora of Argentinian corn harvest in the main production área in 1990. **Mycopathologia**, v. 130, p. 29-36, 1995.

[ICMSF] INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microbiological ecology of foods**. New York: Academic Press, 1980.

JULIAN, A. M.; WARRING, P. W.; PHILLIPS, S. I.; MEDLOCK, V. F. P.; MACDONALD, M. V.; RIO, L. E. Fungal contamination and selected mycotoxins in pre-and-post-harvest maize in Honduras. **Mycopathologia**, v.129, p.5-16, 1995.

KERN, M. E.; BLEVIS, K. S. **Micologia Médica**. 2. ed. São Paulo: Premier. p.256, 1999.

LACAZ CS, PORTO E, MARTINS, JEC. **Tratado de Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Sarvier; 2002.

LARONE, Davise Honing. **Medically important fungi: a guide to identification**. 2. ed. New York: Elsevier, 1987.

LILLEHOJ, E. B.; ZUBER, M. S. Distribution of toxin-producing fungi in nature maize kernels from diverse environments. **Tro. Sci.**, v.28, p. 19-24, 1998

MÁRCIA, B. A.; LÁZZARI, F. A. Monitoramento de fungos em milho em grãos, grits e fubá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.4, p.363-367, 1998.

MERONUCK, R. A. The significance of fungi in cereal grains. **Plant Disease**, v.71, p.287-291, 1987.

MISLIVEC, P. B.; BEUCHAT, L. R.; CAUSIN, M. A. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed., Washington, 1992.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. **Fusarium species: An illustrated manual for identification**. Pennsylvania, University Park, 1983. 193 p.

PITT, J.I; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**, 2. ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997. 593 p.

RIBEIRO, Sandra A.L. *et al.* Fungos filamentosos isolados de produtos derivados do milho comercializados em Recife, Pernambuco. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.26, n.2, jun. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84042003000200010&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 22 out. 2006.

RODRÍGUEZ-AMAYA, D. B.; SABINO, M. Mycotoxins research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, n.1, p.1-11, fev. 2002.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N.; **Fungos deterioradores de alimentos: ocorrência e detecção**. Laboratório de Microbiologia – ITAL. Campinas, 1996.

6. ARTIGO II - OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS E POTENCIAL TOXÍGENO EM CEPAS DE *Aspergillus* spp. ISOLADOS DE FARINHA DE MILHO FLOCADA PRÉ-COZIDA COMERCIALIZADA EM DIFERENTES MUNICÍPIOS DO ESTADO DA BAHIA.

RESUMO

A farinha de milho é um alimento popular amplamente consumido na Bahia. Assim como todos os produtos a base de milho, a farinha de milho é suscetível à contaminação por fungos, e conseqüentemente por micotoxinas, o que representa um problema de saúde pública. No Brasil, dados de produtos para consumo humano, contaminados com micotoxinas, especialmente a AFB1, são escassos, principalmente no caso de derivados de milho, este fato assume maior importância ao se considerar que a AFB1 é um potente carcinógeno e a farinha de milho um dos derivados do milho mais consumidos na Bahia. O objetivo desse trabalho foi avaliar a presença de aflatoxinas e o potencial toxígeno de cepas de *Aspergillus* spp. Isoladas das amostras de farinha de milho flocada pré-cozida adquiridas em 15 municípios do Estado da Bahia. Das 112 amostras analisadas, 14% (16/112) foram positivas para aflatoxinas, onde 5% (6/112) apresentaram concentrações acima dos limites preconizados pela Legislação, variando entre 24,81µg/Kg a 35,93µg/Kg. Os fungos do gênero *Aspergillus* foram isolados em 44,4% (16/36) das amostras analisadas. Deste gênero foram identificadas três espécies: *A. fumigatus* 27,8% (10/36), *A. flavus* 22,2% (8/36) e *A. terreus* 2,8% (1/36), que foram utilizadas para a avaliação do potencial toxígeno. A análise do potencial toxígeno de 28 isolados de *Aspergillus* spp. revelou a presença de aflatoxinas em 50% (14/28) das cepas numa concentração de 24,29µg/Kg a 6.222,00µg/Kg (AFB1 e AFB2). A avaliação do potencial toxígeno revela que tais cepas em condições favoráveis de umidade e temperatura no substrato podem produzir aflatoxinas, representando um potencial risco à saúde humana, exigindo assim, em relação às farinhas de milho uma atenção rigorosa na sua produção, distribuição e comercialização no Estado da Bahia.

Palavras-chave: farinha de milho, controle de qualidade, CCD, aflatoxina B1.

6. ARTICLE II - OCCURRENCE OF THE AFLATOXINS AND POTENTIAL TOXIGEN IN STUMPS OF *Aspergillus* spp. ISOLATED IN MAIZE FLOUR PRE-COOKED FLOCKED MARKETED IN DIFFERENT MUNICIPAL DISTRICTS OF THE STATE OF BAHIA

SUMMARY

The maize flour is a popular food thoroughly consumed in Bahia. As well as all of the products based on corn, is susceptible to the contamination by molds, and consequently a base to produce micotoxins, what represents a problem of public health. In Brazil, data of products for human consumption contaminated with micotoxins, especially AFB1, are scarce, mainly in the case of derived of corn, this fact assumes larger importance when being considered that AFB1 is a potent one carcinogen and the maize flour one of those derived of the corn more consumed in Bahia. The objective of that work was to evaluate the aflatoxins presence and the potential toxigen of strains of *Aspergillus* spp. isolated of the samples of maize flour flocked pre-cooked acquired in 15 municipal districts of the State of Bahia. Of the 112 samples analyzed, 14% (16/112) were positive for aflatoxin, where 5% (6 / 112) had concentrations above the limits prescribed by Legislation, ranging from 24,81µg/Kg to 35,93µg/Kg. The molds of the gender *Aspergillus* were isolated in 44,4% (16/36) of samples analyzed. This gender were identified three species: *A. fumigatus* 27,8% (10/36), *A. flavus* 22,2% (8/36) and *A. terreus* 2,8% (1/36), which were used to assess the potential toxigen. The analysis of potential toxigen of 28 isolates of *Aspergillus* spp. revealed the presence of aflatoxins in 50% (14/28) of strains in a concentration of 24,29µg/Kg the 6.222,00µg/Kg (AFB1 e AFB2). The evaluation of the potential toxigen reveals that such strains in favorable conditions of moisture and temperature substratum can produce aflatoxins, representing a potential risk to the human health, demanding like this, in relation to the maize flour a rigorous attention in its production, distribution and commercialization in the State of Bahia.

Keywords: maize flour, TLC, aflatoxin B1.

6.1 INTRODUÇÃO

Os fungos toxígenos podem contaminar os alimentos nas diferentes fases de produção e beneficiamento, desde o cultivo no campo até o transporte e armazenagem, sobretudo em condições favoráveis de temperatura e umidade. Fatores geográficos, susceptibilidade da variedade do grão, condições de armazenamento também interferem na produção de metabólitos fúngicos secundários, que podem ser mais de um tipo simultaneamente (BULLERMAN; SCHOEREDER e PARK, 1984; SOARES, 1987). As micotoxinas apresentam, de modo geral, grande estabilidade química, o que permite a sua persistência no alimento, mesmo após a remoção dos fungos pelos processos usuais de industrialização e embalagem (COULOMBE, 1991).

As micotoxinas de maior interesse na saúde pública e na Agronomia são: aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona, fumonisinas, toxinas tremorgênicas e alcalóides de ergot. Estas micotoxinas computam milhões de dólares, anualmente, em gastos mundiais na saúde humana, animal e em produtos agrícolas (SHANE, 1994; VASANTHI e BHAT, 1998).

As aflatoxinas constituem-se num grupo de toxinas produzidas, predominantemente pelos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e, raramente, pelo *Aspergillus nomius*, formadas quando se interrompe a redução dos grupos cetônicos na biossíntese dos ácidos graxos, realizados pelos fungos filamentosos, sendo quimicamente derivadas do difuranoisocumarina (GIMENO, 1999; ELLIS et al., 1991). O teor de umidade, a temperatura e a umidade relativa do ar são fatores determinantes para a produção de aflatoxinas (LAZZARI, 1997).

Essas micotoxinas subdividem-se em B1, B2, G1 e G2, conforme fluorescência azul (B, *blue*) ou verde (G, *green*) sob luz ultravioleta. O *Aspergillus flavus* produz somente aflatoxina B, enquanto as outras duas espécies produzem as aflatoxinas B e G, respectivamente. A aflatoxina B1 é a mais estudada e considerada um potente carcinógeno pertencente ao grupo 1 segundo classificação da AIPC, incluída a partir de 1987, como carcinogênico para humanos. Por este motivo, a partir de 1998, a Comunidade Européia passou a adotar o limite máximo de 2 ppb de aflatoxina B1 em alimentos destinados ao consumo humano (MOSS, 2002).

Amaral, et al. (2006) pesquisaram a presença de micotoxinas em vários produtos a base de milho comercializados no Estado do Paraná e concluíram que,

apesar do baixo percentual de amostras contaminadas, a ingestão média provável para aflatoxina B1 encontrava-se acima dos limites permitidos pela Legislação.

No Nordeste, dados de produtos para consumo humano contaminados com micotoxinas, especialmente a AFB1, são escassos, principalmente dos derivados de milho. Este fato assume maior importância ao se considerar que a AFB1 é um potente carcinógeno e a farinha de milho um dos derivados do milho mais consumidos na Bahia, sendo utilizada, sobretudo, pelas camadas mais carentes da população, o que pode acarretar riscos à saúde decorrentes da ingestão do produto final contaminado. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de aflatoxinas e potencial toxígeno de *Aspergillus* spp. isolados em amostras de farinha de milho flocada pré-cozida, comercializadas em diferentes municípios do Estado da Bahia.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos micotoxológicos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Avaliação de Alimentos, Aditivos e Contaminantes (LAPAAC) do Departamento de Análises Bromatológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia – UFBA.

6.3 MATERIAL

Foram analisadas no período de junho de 2007 a junho de 2008, 112 (cento e doze) amostras de farinha de milho flocada pré-cozida, coletadas em embalagens originais e invioladas, com peso líquido de 500g, dentro do prazo de validade. As amostras foram adquiridas nos estabelecimentos da Cesta do Povo e/ou Hipermercados distribuídos em 15 municípios do Estado da Bahia. Foi dado destaque para o tipo de embalagem: papel e plástico, sendo cinquenta e seis amostras de cada tipo. Após aquisição as amostras foram imediatamente processadas para as análises e armazenadas em freezer (-18° C) no LAPAAC. De cada amostra utilizou-se 50g para análise micotoxicológica.

6.4 MÉTODOS

6.4.1 Análise micotoxicológica

Cromatografia em camada delgada (CCD)

A determinação de aflatoxinas foi realizada por CCD segundo o método de Soares e Rodríguez-Amaya (1989), que se fundamenta na extração de toxinas com solvente orgânico (metanol) e solução de cloreto de potássio a 4% (9:1); purificação do extrato por precipitação com clarificante (sulfato de amônio 30%); utilização de agente filtrante (terra diatomácea) e partição líquido-líquido utilizando solvente orgânico e clorofórmio para extração. A quantificação das micotoxinas foi realizada por comparação visual da intensidade da fluorescência apresentada pela amostra em comparação com o padrão sob luz ultravioleta λ : 366nm.

O procedimento analítico foi iniciado com a pesagem de 50g da amostra, que foi transferida para um Erlenmeyer de 500mL, onde foram adicionados 270mL de metanol e 30ml de cloreto de potássio a 4%; a solução foi agitada por 30 minutos em agitador mecânico horizontal, filtrada em papel de filtro pregueado, em seguida foi retirada uma alíquota de 150ml do filtrado e transferida para bquer de 600mL.

O passo seguinte consistiu na purificação do extrato, realizada com a adição de 150mL de clarificante sulfato de amônio a 30%. Foram adicionados 50cm³ de terra diatomácea, homogeneizando e aguardando 10 minutos, novamente filtrado em papel de filtro pregueado, e coletados 150mL do filtrado. Esta alíquota, com a qual foi feita a partição líquido-líquido, foi transferida para um funil de separação com 150mL de água destilada, e acrescida de 10mL de clorofórmio procedendo agitação suave por 3 minutos. Foram aguardados 5 minutos para que as camadas se separassem. O clorofórmio foi recolhido em bquer de 20mL e retirado uma alíquota de 5mL. A seguir, a operação foi repetida com mais 10mL de clorofórmio. Juntou-se a segunda alíquota de 5mL da fase de clorofórmio no em tubo âmbar. Em seguida, foi levado para evaporação em banho Maria a 40° C, sob fluxo de nitrogênio.

O extrato seco presente no tubo foi ressuspenso em 500 μ L de clorofórmio, e a verificação da presença de aflatoxinas foi feita aplicando sobre placas cromatográficas (Alugram[®] SIL G – Silicagel 60G, Macherey-Nagel, Germany) com

utilização de fase móvel clorofórmio:acetona (9:1), alíquotas de 10µl e 20µl dos extratos das amostras. Na mesma placa, foram aplicados 1, 3 e 5µL do padrão da aflatoxina B1 a 2cm da base da cromatofolha. O desenvolvimento da corrida foi realizado por 10cm, emergindo a placa em cuba firmemente vedada e previamente saturada com o solvente clorofórmio: acetona (9:1). A quantificação das aflatoxinas foi realizada sob luz ultravioleta de comprimento de onda longo (λ : 366nm) em aparelho UV Betrachter-Camag, sendo a intensidade das fluorescências das amostras comparadas com a intensidade das fluorescências dos padrões B1 e G1.

Testes confirmatórios foram feitos com os extratos das amostras presuntivas através da derivação química com ácido trifluoroacético (TFA), onde sobre as manchas presuntivas positivas de AFB1 foram aplicados 2 µL de TFA/hexano (1:4). Os valores de Rf do derivado da amostra foram, então, comparados com padrão de aflatoxina B1. Verificou-se a reação desta toxina com o TFA e o hexano, resultando a transformação desta em aflatoxina B2, de acordo com Przybilsky (1975).

A concentração da toxina em µg/Kg foi calculada de acordo com a fórmula:
$$\mu\text{g/Kg} = (S \times Y \times V) / (X \times W).$$

Controle de qualidade analítico

A avaliação dos limites de detecção das aflatoxinas foi realizada através da adição em dia anterior a análise de 20µg/Kg do padrão de AFB1 em amostras consideradas negativas, ou seja nas quais não foram detectadas a presença de aflatoxinas. O cálculo de recuperação foi realizado através da percentagem dos níveis do padrão recuperados, tendo sido encontrado percentuais de recuperação que variaram entre 95%, 97% e 112% com média de 101,33 % $\sigma \pm 9,29$.

6.4.2 Avaliação do potencial toxígeno das cepas de *Aspergillus* spp. isoladas

Produção e extração de aflatoxinas em ágar coco

Após isolamento e identificação, as colônias de *Aspergillus* foram repicadas em BDA inclinado por 7 dias e incubadas à temperatura de 25° C, em estufa B.O.D.

Após esse período, com auxílio de agulha bacteriológica em “L”, as colônias foram inoculadas em placa de Petri com o meio ágar coco em cinco pontos equidistantes. A placa foi, então, incubada por 15 dias nas mesmas condições, em estufa B.O.D. Após crescimento, a cultura juntamente com o ágar foi pesada e transferida para um frasco de boca larga e adicionado clorofórmio na proporção de 10g do cultivo para 30 mL do clorofórmio (para tirar o peso exato do meio, primeiro foi pesada a placa de petri contendo o meio, transferindo o meio para o Erlenmeyer e em seguida foi pesada a placa vazia). Após 30 minutos de agitação em agitador mecânico horizontal, o conteúdo do frasco foi filtrado em papel de filtro pregueado contendo sulfato de sódio anidro e terra diatomácea. O filtrado foi evaporado até a secura em banho Maria e armazenado em freezer até o momento da realização cromatografia (LIN e DIANESE, 1976).

Do mesmo modo que se procedeu anteriormente para as amostras de farinhas de milho, os extratos secos foram ressuspensos em 500µL de clorofórmio e alíquotas de 5, 10 e 15µL do extrato da amostra e 1, 3, 5 e 10µL do padrão de aflatoxina B1 foram aplicadas a 2cm da base da cromatofolha. O cromatograma foi desenvolvido em cuba previamente saturada com o solvente clorofórmio: acetona (9:1) para aflatoxinas e, após a corrida, sob luz ultravioleta foi observada, nas cepas produtoras de aflatoxinas, a presença de manchas fluorescentes azuladas ou verdes das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. O fungo foi identificando mediante a produção de toxina (*A. flavus* produz AFB1 e AFB2; *A. parasiticus* produz AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2). O teor de aflatoxina das cepas foi calculado através de espectrofotometria em equipamento marca FEMTO, após varredura entre 290nm a 470nm, obtendo-se como o espectro de absorção máximo para B1, 355nm e 229nm para G1. Padrões em três diferentes concentrações foram utilizados para elaboração de uma curva padrão conforme figura 21, e cálculo em µg aflatoxina/mL = $A \times CF \times PM \times 1000$. Onde: A → Espectro de absorção; CF → Fator de correção; PM → Peso molecular.

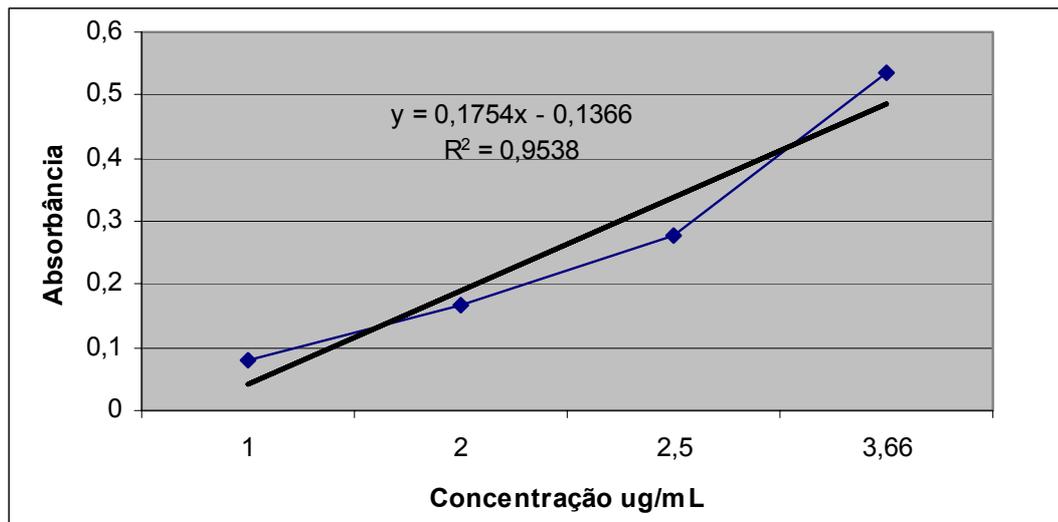


Figura 21 – Curva de leituras de padrões de AFB1 a 355nm.

6.4.3 Processamento de dados

Para o processamento dos dados foi utilizando o *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, versão 13.0), para construção do banco de dados, tabelas e cruzamentos de variáveis.

6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi utilizado padrão da marca Sigma Chemical Company (USA), dissolvido em benzeno:acetonitrila (9:1) e padronizado conforme descrito na AOAC (1998). Os resultados da determinação das concentrações das soluções estoque e de trabalho de aflatoxinas B1 e G1, encontram-se descritas na tabela 12.

Tabela 12 – Concentrações de aflatoxinas nas soluções padrão e de trabalho.

Micotoxina	Solução Estoque concentração µg/mL	Solução de Trabalho concentração µg/mL
B1 (padrão anidro)	36,6	3,60
G1 (padrão anidro)	10,00	2,00

Os resultados da padronização dos procedimentos cromatográficos para determinação de aflatoxinas encontram-se descritos na tabela 13.

Tabela 13 – Padronização dos procedimentos cromatográficos para determinação de aflatoxinas.

Micotoxina	*N	**Rf
B1	6	0,55
G1	6	0,39

*N = número de determinações realizadas. ** Rf = fator de relação.

As aflatoxinas foram detectadas em 14% (16/112) de todas as amostras analisadas, em uma concentração total média de 15,5µg/Kg, variando de 1,31µg/Kg a 35,93µg/Kg (Figura 22). Entre as amostras positivas, 5% (6/112) apresentaram concentrações acima dos limites recomendados (20µg/Kg) pelo Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária e pelo Ministério da Saúde. Os resultados obtidos são semelhantes aos encontrados por outros autores em amostras avaliadas em diferentes décadas: Kawashima e Valente-Soares (2006) analisaram 123 amostras de vários produtos a base de milho comercializadas no Estado do Paraná, onde constatou que, 7% das amostras estavam com teores de aflatoxinas acima dos padrões recomendados. Furlong et al. (1999) relataram que 7,7% das 39 amostras analisadas apresentaram contaminação por aflatoxinas. Pich et al. (1998) encontraram níveis de 3 a 25µg/Kg em 29 amostras de farinha de milho analisadas. Soares e Rodriguez-Amaya (1989) verificaram que cinco amostras das 130 analisadas continham de 20 a 47µg/Kg de AFB1 em diversos produtos derivados de milho.

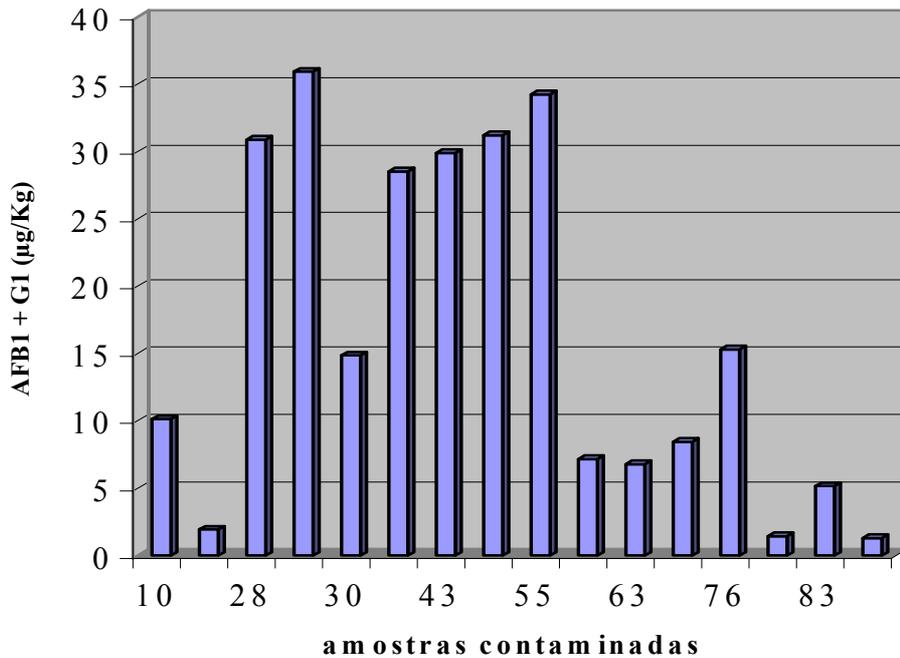


Figura 22 – Teores de aflatoxinas totais nas 16/112 amostras de farinha de milho flocada pré-cozida contaminadas.

Esses dados demonstram que, mesmo com os avanços tecnológicos na agricultura, a contaminação por aflatoxinas em milho e derivados ainda perdura. Deste modo o controle de qualidade em relação ao milho e seus derivados é de suma importância, especialmente para aqueles produtos destinados à alimentação humana, pois pesquisadores encontraram uma relação direta entre amostras que apresentavam elevada concentração de grãos ardidos, mofados, queimados e brotados e a contaminação por micotoxinas (GLÓRIA et al., 2004).

Essas frações de grãos não sadios, segundo Piedade et al. (2002), que encontraram níveis de até 1665 µg/Kg de aflatoxinas, atribuem que esses podem contribuir com até 84% da contaminação estimada.

Não somente a qualidade, mas a própria matriz pode interferir na contaminação, como constataram Vieira et al. (2007), que a farinha de castanha de caju é pouco susceptível à contaminação por aflatoxinas. Prado et al. (2008), embora não tenham encontrado presença de aflatoxina B1 em 30 amostras de *Piper nigrum* e 20 de *Origanum vulgare* analisadas, ressaltam a importância do controle de qualidade nos procedimentos de pós-colheita, com destaque para secagem e armazenamento de amostras.

Em outros países em desenvolvimento como Marrocos, Zinedine et al. (2006) avaliaram amostras de cereais (aveia, milho e trigo) e especiarias e encontraram maior contaminação por fumonisinas. Já na Tunísia, estudos realizados por Ghali et al. (2008) revelaram contaminação por aflatoxinas em 50,5% dos alimentos ali analisados, que incluíam sorgo, frutas secas e especiarias.

6.5.1 Avaliação do potencial toxígeno das cepas de *Aspergillus* spp. isoladas nas amostras analisadas

Os fungos do gênero *Aspergillus* foram isolados em 44,4% (16/36) das amostras analisadas. Deste gênero foram identificadas três espécies: *A. fumigatus* 27,8% (10/36), *A. flavus* 22,2% (8/36) e *A. terreus* 2,8% (1/36), que foram utilizadas para a avaliação do potencial toxígeno. A análise do potencial toxígeno de 28 isolados de *Aspergillus* spp. oriundos das farinhas de milho positivas para esse gênero, revelou a presença de aflatoxinas em 50% (14/28) das cepas numa concentração variando de 24,29µg/Kg a 6.222,00µg/Kg (AFB1 e AFB2). Das 28 cepas isoladas 4,64% (5/28) produziram AFB1 e AFG1. Achados semelhantes também foram apontados por outros autores, estudando cepas de *Aspergillus* spp. em grãos de milho e derivados. Segundo Almeida (2000), 71,4% das cepas de *Aspergillus* spp. foram produtoras de aflatoxinas. Por sua vez, Huang et al. (1990), verificaram que 72,9% das cepas isoladas de grão de milho foram produtoras de aflatoxinas. Em 85,7% das amostras analisadas para o potencial toxígeno das cepas isoladas foram procedentes de amostras de farinha de milho negativas para a presença de aflatoxinas.

5.6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que as amostras de farinha de milho flocada pré-cozida na sua maioria estavam livres de aflatoxinas; das amostras positivas para aflatoxinas apenas 5% encontravam-se acima dos limites preconizados pela Legislação (20µg/Kg). Ainda assim, as amostras que

apresentaram contaminação representam uma preocupação no consumo desse produto, já que ele faz parte da cesta básica baiana. Quanto ao potencial tóxico, em condições laboratoriais, constatou-se que 50% das cepas de *Aspergillus* spp., identificadas como *A. flavus* foram responsáveis pela produção de aflatoxinas em uma concentração que variou de 24,29µg/Kg a 6.222,00µg/Kg. A presença de *Aspergillus flavus* em gêneros alimentícios constitui um fator de risco à saúde humana, uma vez que, em condições favoráveis de umidade e temperatura no substrato, podem produzir aflatoxinas, exigindo assim, em relação às farinhas de milho uma atenção rigorosa em relação ao controle da qualidade desde o plantio até sua produção, distribuição e comercialização no Estado da Bahia.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. P.; CORRÊA, B.; MALLOZZI, M. A. B.; SAWAZAKI, E.; VALENTE SOARES, L. M. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 321-326, 2000.

AMARAL, K. A. S.; NASCIMENTO, G. B.; SEKIYAMA, B. L.; JANEIRO, J.; MACHINSKI JR, M. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.26, n.2, p. 336-342, abr.-jun. 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. "**Official Methods of Analysis**", 16th.ed. Arlington, Virgínia, v. 2, cap. 49, p. 49-53, 1998.

BULLERMAN, L. B.; SCHOEREDER, L. L. & PARK, K. Y. Formation and control of mycotoxins in food. **Journal of Food Protection**, v. 47, n. 8, p. 637-646, 1984.

COULOMBE, R. A. (1991). Aflatoxins. In: SHARMA, R. P.; SALUNKHE, D. K. **Mycotoxins and phytoalexins**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 103-143.

ELLIS, W. O. et al. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, 30 : 403-439, 1991.

FURLONG, E.B.; SOARES, L.A.S.; VIEIRA, A.P.; DADALT, G. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em alimentos da região sul do Rio Grande do Sul. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 58, p. 105-111, 1999.

GHALI, R. HMAISSIA-KHLIFA, K. GHORBEL, H. MAAROUFI, K HEDILI, A. Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Tunisian foods **Food Control**, v. 19, n. 9, p.921-924, 2008.

GIMENO, A. Thin Layer Chromatographic Determination of Aflatoxins, Ochratoxins, Sterigmatocystin, Zearalenone, Citrin, T-2 Toxin, Diacetoxyscirpenol, Penicillic Acid, Patulin and Penitrem A. **Association of Official Analytical Chemists**. n.3, v. 62, p. 579-585, 1999.

GLORIA, E.M.; CIACCO, C.F.; LOPES FILHO, J.F.; ERICSSON, C.; AND ZOCCHI, S.S. Distribution of aflatoxin contamination in maize samples. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, p. 71-75, 2004.

HUANG, C. J.; CHUANG, T. Y.; TSENG, T. C. Contamination of *Aspergillus flavus* on corn kernels and production of aflatoxin by the fungus in Taiwan. **Plant Protect. Bull.**, 32: 195-202, 1990.

KAWASHIMA, L. M., VALENTE SOARES L.M. Incidência de fumonisina Baflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina a e zearalenona em produtos de milho. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.26, n.3, 516-521, 2006.

LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2.ed. Curitiba: Ed. do Autor, 1997. p.148.

LIN, M. T.; DIANESE, J. C. A Coconut-Agar M for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, 66: 1466-1469, 1976.

MOSS, M. O. Risk assessment for aflatoxins. In: foodstuffs Intern. **Biodeterioration and Biodegradation**. v.50, n.3-4, p.137-142, 2002.

PICH, P.H.; NORDIN, N.S.D.; NOLL, I.B. Detecção de aflatoxinas em produtos derivados de milho comercializados na região de Porto Alegre (RS). In: **Anais do IX Encontro Nacional de Micotoxinas** (Brasil:Florianópolis), p. 120, 1998.

PIEIDADE, F.S.FONSECA, H. GLORIA, R.M *et al.* Distribuição de aflatoxinas em frações de milho segregadas visualmente por defeitos. **Braz. J. Microbiol.**, vol.33, no.3, p.250-254, 2002.

PRADO, Guilherme et al . Determinação de aflatoxina B1 em pimenta (*Piper nigrum* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L.) por cromatografia em camada delgada e densitometria. **Quím. Nova** , São Paulo, v. 31, n. 3, 2008 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000300009&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 02 de julho de 2008.

PRZYBYLSKI, W. Formation of aflatoxin derivatives on thin layer chromatographic plates. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v: 58, p. 163-164, 1975.

SHANE, S.H. Economic issues associated with aflatoxins. In: EATON, D.L.; GROOPMAN, J. D. (Eds). **The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance**. San Diego: Academic Press, 1994. p.513-527.

SOARES, L.M.V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Arlington, v. 72, p. 22-26, 1989.

SOUZA; S. V. C.; VARGAS; E. A.; de CASTRO; L.; JUNQUEIRA, R. G. Validação interlaboratorial de método para determinação de Aflatoxina M1 em leite por cromatografia em camada delgada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23 , p. 213-220, 2003

VASANTHI, S.; BHAT, R. V. Mycotoxins in foods occurrence, health & economic significance & food control measures. **Indian Journal of Medical Research**, Jodhpur, v.108, p.212-22,1998

ZINEDINE, A. BRERA, C. ELAKHDARI, S. CATANO, C. DEBEGNACH, F. ANGELINI, S. DE SANTIS, B. FAID, M. BENLEMLIH, M. MINARDI, V.. MIRAGLIA M. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Marroco. **FoodControl**, v17,n.11,868-874,2006

VIEIRA, Í. G. P; FREIRE, F. C. O.; ANDRADE, J.A., MENDES, F. N. P.; MONTEIRO, M.C.N. Determinação de aflatoxinas em amêndoas de cajueiro por cromatografia em camada delgada. **Rev. Ciên. Agron.** Fortaleza, v.38, n. 4, p.430-435, 2007

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O consumo de produtos à base de milho oferece riscos à saúde da população devido à presença das aflatoxinas, principalmente por ser este um alimento freqüente na cesta básica baiana.

Apesar do baixo percentual de aflatoxinas nas amostras, a elevada toxicidade e associação entre as aflatoxinas e os hepatocarcinomas apontada em estudos científicos destaca a necessidade de se implantar um programa de monitoramento para micotoxinas neste tipo de alimento.

A porcentagem de amostras de farinha de milho com contaminação fúngica pode ser decorrente das condições ambientais da indústria (manuseio, processamento e armazenamento) e da qualidade da matéria prima, tornando necessária uma fiscalização mais rigorosa e o monitoramento desde o plantio do milho até a comercialização de seus derivados.

De acordo com as Resoluções da ANVISA/MS, RDC nº 344 e CNNPA nº 12, cada produto (farinha de milho) com peso líquido de 500g deve apresentar embalagem primária do tipo plástica resistente, atóxica. Assim não foi encontrado nenhuma recomendação ou amparo legal direcionado para a embalagem de papel.