

Micotoxinas em Grãos e Derivados¹

Por: Luís César da Silva

Abstract

Mycotoxins in grain and grain products

(Federal University of Espírito Santo - Food Engineering Department - Technical Bulletin: AG: 01/10 - 05/27/2010, Revised: 08/09/2016)

In this extension bulletin is reported the risk of fungal infestation and hence the metabolism of mycotoxins in grain and grain products, as well as, discussed technologies to be adopted to minimize these occurrences. These technologies relate to cleaning, drying and aeration.

Dr. Luís César Silva – website: www.agais.com

Introdução

Fungos, também denominados mofo ou bolores, são microrganismos multicelulares ou filamentosos, que ao infestarem a massa de grãos, alimentos ou rações buscam por nutrientes como carboidratos, proteínas, gorduras, vitaminas e minerais.

Durante o desenvolvimento, os fungos de algumas espécies produzem micotoxinas, que a depender do nível de concentração, podem causar intoxicação alimentar em homens e animais levando a doenças crônicas dos rins ou fígado; danos aos sistemas imunológicos, cardiovascular, endócrino, reprodutivo ou nervoso; além de hemorragias, aborto, doenças de pele, câncer, gangrena, paralisia de membros e óbito.

Pacientes intoxicados por micotoxinas apresentam o seguinte quadro: (1) os antibióticos não são efetivos no tratamento; (2) os sintomas estão associados à ingestão de determinado alimento; (3) as análises dos alimentos ingeridos revelam atividades de fungos; (4) os sintomas não são transmissíveis; e (5) o grau de toxicidade é função da idade, sexo e estado nutricional do indivíduo.

Mesmo não causando quadros acentuados de intoxicação alimentar, a ingestão de rações com micotoxinas levam a perdas econômicas decorrentes das reduções das taxas de crescimento e de conversão alimentar, recusa de alimentos, aumento do estresse e redução ou interrupção da produção de leite e ovos.

A infestação de grãos por fungos pode ocorrer: no campo; no período entre a colheita e o pré-processamento; e durante a armazenagem. Para cada uma dessas situações o teor de água dos grãos define um determinado nível de atividade de água para o qual prevalece uma determinada espécie de fungo.

¹ Artigo publicando na Revista Grãos Brasil, Ano VIII, n. 39, Novembro/Dezembro de 2009, p. 13-16.

O nível de atividade de água varia de 0 a 1. Zero ocorre quando a matéria prima apresenta 0% de teor de água, enquanto um, por exemplo, é constatado na camada limite de ar sobre um espelho de água. Fungos desenvolvem em locais em que a atividade de água apresenta acima de 0,65, ou o mesmo que, ambientes com umidade relativa acima de 65%.

No que se refere à conservação de grãos, os fungos são classificados em: fungos do campo, fungos intermediários e fungos do armazenamento. Fungos do campo infestam grãos antes da colheita, quando o teor de água está próximo de 35%. Para essa condição o nível de atividade de água na superfície dos grãos favorece a proliferação de fungos dos gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* ou *Helminthosporium*.

Os fungos intermediários infestam os grãos no campo, mas têm condições ideais para proliferação após a colheita quando o teor de água apresenta entre 18 e 28%. Desse modo, atrasos na secagem e o não emprego de silos-pulmão adequadamente projetados definirão condições favoráveis de proliferação, principalmente, de fungos do gênero *Fusarium*.

Quanto aos fungos do armazenamento, estes proliferam quando o teor de água do produto é inferior a 18%, conforme demonstrado na Tabela 1. E normalmente a proliferação em silos e graneleiros se dão em pontos de: (i) ocorrências de goteiras e, ou, de infiltração de água; (ii) concentração de impurezas menores do que os grãos; e (iii) acúmulo de produto com teor de água acima do recomendado, o que se deve a falhas na monitoração da secagem ou ao processo de migração de umidade.

Tabela 1 – Condições ideais para o desenvolvimento de fungos em grãos armazenados em temperaturas de 25 a 27 °C

Espécie	Umidade relativa do ar intergranular - %	Teor de água dos grãos - %
<i>Aspergillus halophilieus</i>	68	12-14
<i>Aspergillus restrictus</i>	70	13-15
<i>Aspergillus glaucus</i>	73	13-15
<i>A. candidus</i> , <i>A. ochraeus</i>	80	14-16
<i>A. flavus</i> , <i>parasiticus</i>	82	15-18
<i>Penicillium spp.</i>	80-90	15-18

Fonte: BAKKER-ARKEMA (1999)

Outra situação que facilita a proliferação de fungos em unidades armazenadoras ocorre quando grãos trincados e quebrados removidos na operação de limpeza não são adequadamente armazenados. Assim, pode ocorrer que esse produto apresente níveis de

toxinas acima do permitido, e por fim contamine a massa de grãos quando acrescido durante a expedição. O ideal, quando a unidade não tem como armazenar adequadamente esse produto, é proceder à venda e converter o saldo monetário a favor do depositante. Pois o risco de ocorrência de micotoxinas é alto.

Tipos de Micotoxinas

Segundo relatos científicos cerca de 400 tipos de micotoxinas já foram isolados e identificados. No entanto, para atualidade, as de maior importância em grãos e derivados são as aflatoxinas, ocratoxinas, zearalenona, fumonisinas e tricotíenos.

a) Aflatoxina

O nome aflatoxina tem origem na combinação das palavras *Aspergillus* + **flavus** + **toxina**. Essa substância constitui um grupo de toxinas produzidas pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e são identificadas como B1, B2, G1 e G2. Sendo que as iniciadas B (blue) e G (green) devem ao fato destas apresentarem fluorescência azulada e esverdeada, respectivamente, quando observadas sob luz ultravioleta. Duas outras micotoxinas M1 e M2 foram detectadas em leite, urina e fezes de mamíferos quando da ingestão de alimentos contaminados com aflatoxinas B1 e B2.

A intoxicação por aflatoxina pode causar falhas das funções do fígado em razão da destruição das células parenquimatosas, o que pode levar a ocorrência de hemorragias e alterações das funções do sistema nervoso.

Aves intoxicadas apresentam reduções do consumo de ração, do crescimento e, conseqüentemente, do ganho de peso. O que implica em perdas econômicas. E animais como cavalo, macaco, peru e pato são extremamente sensíveis.

Em humanos o processo de intoxicação, normalmente, ocorre de forma gradual, o que faz com que os efeitos levem anos para manifestar. No entanto, há relatos de intoxicações agudas em 26 pessoas de uma comunidade rural da Tailândia, em 1967. Dentre essas pessoas, 19 eram crianças e três delas morreram. Suspeitou-se na época que a intoxicação ocorreu devido a ingestão de arroz contaminado com 200 ppb (partes por bilhão) de aflatoxina.

Outro relato refere-se ao surto de hepatite na Índia em 1974, que foi associado à ingestão de milho contaminado. O surto afetou 400 pessoas e 100 delas morreram. Investigações demonstram que os adultos afetados ingeriram em um único dia cerca de 2 a 6 miligramas de aflatoxina.

Entretanto, um dos efeitos mais significativos da intoxicação em humanos é o comprometimento do sistema imunológico tornando as pessoas mais propensas a contrair doenças infecciosas.

b) Ocratoxina

A ocratoxina inicialmente era associada ao metabolismo do fungo *Aspergillus ochraceus* presente em cereais e leguminosas. Mas estudos posteriores constataram que os fungos *Aspergillus alutaceus*, *Aspergillus alliaceus* e *Penicillium verrucosum* também sintetizam ocratoxina, principalmente, a última espécie.

A ocratoxina é uma substância lipossolúvel, portanto no organismo de animais está associada ao acúmulo de gordura no fígado. Essa micotoxina para suínos e cães causa sérios danos renais, e para galinhas e codornas poedeiras promove o retardo da maturação sexual e reduz a frequência de postura.

c) Zearalenona

A zearalenona é um tipo de toxina que pode ser produzida pelas espécies *Fusarium roseum* var. *graminearum*, *Gibberella zeae*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium tricinctum* e *Fusarium moniliforme*. Portanto, geralmente contaminam o produto no campo ou no período que antecede a secagem. Milho, sorgo, cevada, trigo, aveia e soja são os principais produtos infectados.

A estrutura química da zearalenona é semelhante ao hormônio feminino estrógeno que pode afetar os tecidos musculares causando dores. Suínos são os mais suscetíveis, tanto que, para a concentração de 1 ppm (parte por milhão) já ocorre recusa da ração. O consumo contínuo de grãos e derivados contaminados leva a ocorrência de aborto, natimortos, falso cio, prolapso retal e da vagina, infertilidade e enfeminização dos machos com desenvolvimento de mamas.

d) Fumonisin

Fumonisin é uma micotoxina associada ao metabolismo do fungo *Fumonisin moniliforme*. Este fungo causa a podridão das espigas de milho, sendo, portanto, um fungo do campo.

Um fato associado à fumonisin é que a alta incidência está associada a longos períodos de estiagem durante o cultivo. E normalmente os grãos de milho infectados apresentam suscetíveis a danos mecânicos, conseqüentemente, ocorrerão maiores índices de grãos quebrados e trincados, o que facilita a proliferação de fungos e insetos durante a armazenagem.

Os efeitos da fumonisina foram poucos estudados devido a descoberta nos anos oitenta. Relatos descrevem poucos efeitos sobre a saúde humana, mas em animais como cavalo, níveis próximos de 5 ppm foram associados sintomas como: desorientação, agitação, cólicas, aumento da pressão craniana, cegueira e óbitos. A toxina afeta o fígado e os rins como outras micotoxinas, no entanto com mais severidade causando em cavalos leucoencefalomalácia, o que leva ao colapso do sistema neural propiciando altas taxas de óbitos.

Atualmente são recomendados os seguintes níveis de tolerância: cavalos 5 ppm, suínos 10 ppm e bovinos 50 ppm.

e) Tricotecenos

Os tricotecenos são micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium*, que podem causar aos homens e animais problemas como: vômitos, hemorragias, recusa de alimento, necrose da epiderme, redução do ganho de peso e da produção de ovos e leite, interferência no sistema imunológico e óbito. Ocorrem em grãos como o milho, trigo, cevada e outros. As micotoxinas mais comuns da família dos tricotecenos são desoxinivalenol (DON) e T-2.

A micotoxina desoxinivalenol (DON) ou vomitoxina é sintetizada pelo fungo *Fusarium graminearum* que causa a doenças podridão-vermelha da ponta em milho (Figura 1) e giberela do trigo e da cevada.



Figura 1 – Espiga de milho contaminada por *Fusarium graminearum*.

(Fonte: Iowa State University – Extension Service)

Os sintomas associados à intoxicação por DON são variados e às vezes dificulta o diagnóstico correto. Em baixos níveis de intoxicação os sintomas podem incluir irritação da pele, recusa de alimento, perda de apetite e vômito. Estes sintomas podem evoluir para

hemorragias, necroses no trato digestivo, problemas neurológicos, supressão do sistema imunológico, redução da produção de sangue e aumentos dos números de abortos e natimortos.

Quanto à micotoxina T2 os principais agentes produtores são os fungos *Fusarium tricinatum* e *Fusarium roseum*.

Durante a Segunda Guerra Mundial, na União Soviética atribuiu-se a ocorrência de um surto de intoxicação alimentar a ingestão da micotoxina T2. Os sintomas constatados foram sensação queimação na boca, língua, esôfago e estômago; e destruição da medula óssea causando anemia.

Em estádios mais avançados de intoxicação são constatadas hemorragias no nariz, gengivas, estômago e intestino. Em aves, a T2 pode causar lesões no bico, anomalias respiratórias, redução da produção de ovos, ocorrência de ovos com casca frágil, perda de peso e óbitos.

Métodos de Determinação de Micotoxinas

Em termos de segurança alimentar a contaminação de alimentos e rações por micotoxinas é um risco que qualquer empresa dos setores de pré-processamento, beneficiamento e industrialização de matérias primas agroalimentares estão sujeitas.

Sob o aspecto de gerenciamento de processos, riscos de qualquer natureza, constituem em ocorrências de comportamento aleatório que podem ser previstas. Portanto, há como monitorar os fatores que favorecem a ocorrência; e então, podem-se estabelecer estratégias para minimizar esses riscos.

Desse modo, em uma unidade armazenadora de grãos, os locais com maiores probabilidades de desenvolvimento de fungos, e conseqüentemente, com maiores potências de focos de concentrações de micotoxinas são: (i) as laterais dos graneleiros; (ii) os pontos de aquecimento na massa de grãos; e (iii) os pontos de concentração de finos (impurezas menores que os grãos). Sendo assim, estes locais devem ser frequentemente amostrados para a detecção e quantificação de micotoxinas.

A concentração de micotoxinas é expressa em: ppb – partes por bilhão; ppm – partes por milhão; ou microgramas de micotoxinas por quilograma de produto ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

Um exemplo, conforme a legislação brasileira para o consumo humano de grãos de milho inteiro, moído e farinhas admite-se o nível máximo de aflatoxinas (B1+B2+G1+G2) de 20 ppb, ou o mesmo que 20 μg de aflatoxina por kg de produto. Isso equivale: (a) 20 miligramas de micotoxinas por tonelada de produto; (b) a massa de quatro grãos de milho em uma saca de 60 kg; ou (c) 600 g de micotoxina em uma unidade armazenadora com capacidade estática de 30 mil toneladas.

Para detectar e quantificar micotoxinas em grãos, alimentos e rações pode ser empregado os seguintes métodos como: ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) e GC/MS (Gas Chromatography/Mass Spectrometry). Sendo o primeiro o mais rápido, o de menor custo e de fácil manipulação.

O método ELISA é empregado para detectar presença de anticorpos ou de antígenos em amostras de substâncias, como sangue, leite, urina, soro sanguíneo e extratos vegetais, sendo, portanto instrumento de diagnóstico médico, veterinário e fitopatológico.

Dentre os procedimentos ELISA aplicados a micotoxinas, um dos mais empregados em ambientes de pré-processamento, beneficiamento e industrialização de grãos é o de detecção por fluxo lateral. Para o emprego desse método diversos fabricantes oferecem ao mercado kits ELISA, Figura 2, específicos para detecção aflatoxina, desoxinivalenol, T2, fumonisina, ocratoxina e zearalenona.

Descrevendo de forma simplificada, o método ELISA visa identificar um antígeno desconhecido, por exemplo, moléculas de aflatoxina. Para tanto, o kit ELISA disponibiliza um anticorpo específico que se ligará a este antígeno. O anticorpo normalmente está vinculado a uma enzima, o que é chamado de conjugado. Quando o anticorpo se liga ao antígeno, a enzima reagirá com um substrato gerando uma coloração de intensidade relacionada à concentração de micotoxina presente.



Figura 2 – Kit ELISA para teste de aflatoxina 20 ppb (Cortesia Romer Labs do Brasil).

Por exemplo, para detecção de aflatoxinas em grãos de milho, empregando um kit ELISA deve-se observar as seguintes etapas:

Preparação da amostra / extração

A quantidade de grãos coletada deve ser moída e passada em peneira de 425 μm . Do material obtido toma-se 10 g, que é colocada em um liquidificador e acrescenta-se 20 mL de solução de extração, metanol a 70%, ou 20 mL de etanol a 50%. O liquidificador deve ser acionado por três minutos.

A mistura obtida é deixada em repouso para que ocorra a decantação da parte sólida. A parte líquida é então filtrada, sendo obtido o extrato da amostra que será analisado.

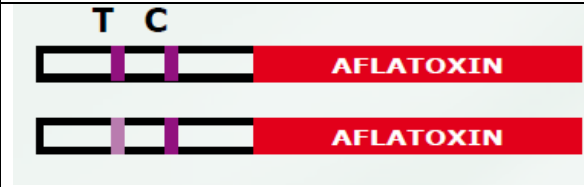

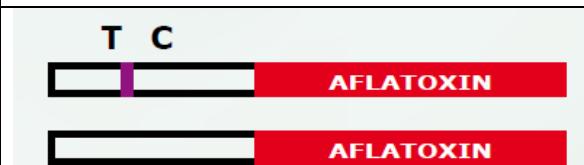
Procedimentos de análise

Os kits ELISA trazem cartelas contendo pequenas cavidades chamadas de micropoços, que têm as paredes impregnadas com conjugado (anticorpo + enzima). Esta substância é diluída para então ser acrescentado cerca de 50 microlitros do extrato de amostra. Então, conforme mostrado na Figura 3 é colocado em cada micropoço as fitas teste, que devem permanecer em contato com a solução por cinco minutos. Nesse período, se a amostra possuir aflatoxina esta vinculará a moléculas do conjugado e por capilaridade subirão lateralmente pela fita teste e concentrarão em uma dada posição formando uma ou mais linhas visíveis. A interpretação dos resultados, pela leitura da fita teste, que pode apresentar duas linhas a de Controle (C) e a Teste (T) é feita conforme descrito na Tabela 2.



Figura 3 – Micropoços com as fitas testes para aflatoxina (Cortesia Romer Labs do Brasil).

Tabela 2 – Interpretação dos resultados para fita teste aflatoxina 20 ppb

Indicativos na fita teste	Resultado
	NEGATIVO: a amostra apresenta níveis totais de aflatoxina abaixo de 20 ppb.
	POSITIVO: A amostra contém no mínimo 20 ppb de aflatoxina.
	RESULTADO IVALIDO: A análise deve ser repetida.

Nota: Cortesia Romer Labs do Brasil.

Ponderações finais

Ocorrências de micotoxinas em unidades armazenadoras podem ser minimizadas com a adoção dos seguintes cuidados: (1) monitore cautelosamente o teor de água das cargas que deixam os secadores; (2) verifique regularmente os relatórios de termometria, pontos de aquecimento estão associados ao aumento de atividade metabólica de fungos e, ou insetos; (3) elimine as goteiras; (4) sane os problemas de infiltração de água nas laterais de graneleiros e bases de silos; (5) conduza aeração somente quando as condições psicrométricas são favoráveis; e (6) minimize o processo de migração de umidade na massa de grãos causados por correntes de ar.

E para o controle de qualidade do produto recebido, armazenado e expedido realize testes de detecção e quantificação de micotoxinas.

Referências

ALMEIDA, J. L. **Manejo em plantio direto no 2º Planalto do Paraná e consequências sobre a produção de micotoxinas.** Universidade Federal do Paraná (Tese de doutorado), Curitiba: PR, 2006. 161 p.

BROOKER, D. B., BAKKER ARKEMA, F. W., HALL, C. W. **Drying cereal grains.** Westport: The Avi Publishing Company, Inc., 1974. 256 p.

JACOBSEN, B. J., COPPOCK, R. W., MOSTROM, M. **Stored Grain: Mycotoxins.** Montana State University, Extension Service. 2007. 16p.

SILVA, J. S. [editor] **Pré-processamento de produtos agrícolas**. Juiz de Fora: Instituto Maria, 1995. 509 p.

SILVA, J. S.; BEBERT, P. A. **Colheita, secagem e armazenagem de café**. Juiz de Fora: Editora Aprenda Fácil, 1999. 137 p.

SILVA, L. C. **Armazenagem de grãos e oleaginosas**. [Notas de aula]. Alegre: UFES, 2008. 105 p.

USDA. **Grain Fungal Diseases & Mycotoxin Reference**. [Grain Inspection, Packers & Stockyards Administration]. 2006. 36p.