

INCIDÊNCIA DE AFLATOXINAS EM MILHO (*ZEA MAYS L.*) COM DIFERENTES NÍVEIS DE UMIDADE, APÓS TRATAMENTO COM FUNGICIDA, ARMAZENADO EM ATMOSFERA COM E SEM AERAÇÃO

Guilherme PRADO¹
Nicézio Janssen ALMEIDA PINTO²
Marize Silva de OLIVEIRA¹

RIALA6/788

PRADO, Guilherme e col. - Incidência de aflatoxinas em milho (*Zea mays L.*) com diferentes níveis de umidade, após tratamento com fungicida, armazenado em atmosfera com e sem aeração. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 55(2):79-84, 1995.

RESUMO: Foi verificada a produção de aflatoxinas em amostras de milho, cultivar BR 201, plantada em 1994, no Centro Nacional de Milho e Sorgo (EMBRAPA), em Sete Lagoas, Minas Gerais. As amostras, coletadas em duplicata, apresentando diferentes níveis de umidade, foram tratadas com solução aquosa e oleosa de Iprodiona (20ppm), seguido de um armazenamento em tambores metálicos, com e sem aeração, proporcionando uma temperatura de 18-20°C e 35-40°C, respectivamente. Os resultados encontrados mostraram uma redução dos níveis de aflatoxinas nas amostras tratadas com Iprodiona e armazenadas em atmosfera aerada. Quando o acondicionamento foi realizado em atmosfera sem aeração (temperatura 35-40 °C), o decréscimo dos teores de aflatoxinas não foi significativo, principalmente nos níveis de umidade mais elevados, indicando que temperatura e umidade são fatores importantes na biossíntese de aflatoxinas.

DESCRIPTORIOS: Milho, aflatoxinas, iprodiona, controle.

INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos do gênero *Aspergillus* que contaminam as culturas no campo, os grãos durante o armazenamento e também os produtos alimentícios destinados ao consumo humano. Devido aos efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos, as aflatoxinas representam um risco à saúde pública, havendo pois a necessidade de desenvolver medidas de controle durante o processo de produção de alimentos: cultivo, colheita, armazenamento e transporte¹⁵.

Vários são os fatores que influenciam o desenvolvimento de fungos e a produção de aflatoxinas em alimentos, sendo a temperatura e a umidade (atividade de água e teor de umidade) dois parâmetros descritos como fundamentais neste processo da bios-

síntese. DIENER & DAVIS², SCHINDLER et alii¹¹ verificaram que a temperatura mínima de produção de aflatoxina é 12°C e a máxima de 42°C, sendo a ótima entre 24 e 30°C. Com relação à umidade relativa observou-se que o limite mínimo é de 85%, ou seja, o substrato deve apresentar atividade de água de no mínimo 0,85 para que o fungo possa produzir a toxina. Em milho, foi verificado que a atividade de água que mais favorece a produção de aflatoxina por *Aspergillus parasiticus* é de 0,90⁴. PRADO et alii⁷ verificaram a influência da atividade de água no crescimento de fungos e mesófilos e na produção de aflatoxinas durante o armazenamento de amendoim, variedade Tatu Vermelho. Após o armazenamento do amendoim, a temperatura ambiente, em câmaras equilibradas em atividade de água 0,75, 0,83, 0,86, 0,93 e 0,97, os autores verificaram que a produção máxima de aflatoxina ocorreu em atividade de água de 0,93 e

1. Divisão de Bromatologia e Toxicologia Fundação Ezequiel Dias Belo Horizonte/M.G.
2. EMBRAPA/Centro Nacional de Milho e Sorgo Cx. Postal 151, Sete Lagoas/M.G.

que a 0,86 não houve síntese por um período de 120 dias.

O milho é um importante cereal para a nutrição humana, sendo o Estado de Minas Gerais um dos maiores produtores do Brasil. Com uma área plantada de 14 milhões de hectares e uma produção de 30 milhões de toneladas, o Brasil é o maior produtor de milho da América do Sul, sendo o responsável por aproximadamente 75% do total produzido no subcontinente em 1993⁵. Trabalhos desenvolvidos nos últimos anos^{9,10,12 e 14}, relatam ser o milho um bom substrato para o desenvolvimento de fungos e produção de aflatoxinas. Esse fato, juntamente com as condições ambientais favoráveis (temperatura e umidade) encontradas em países tropicais, como o Brasil, mostram a necessidade de um monitoramento constante e desenvolvimento de novas técnicas de cultivo, pós-colheita, armazenamento e transporte, capazes de impedir a ocorrência de fungos e a biossíntese de aflatoxinas.

O fungicida Iprodiona é utilizado na proteção de grãos e frutas, antes e pós-colheita, tendo uma ação efetiva contra espécies de *Alternaria*, *Botrytis*, *Didymella*, *Rhizoctonia* e *Sclerotinia*^{3,6}. O único trabalho descrito na literatura que relaciona o efeito de Iprodiona e a produção de aflatoxina foi desenvolvido por ARINO & BULLERMAN¹. Foi observado que esporos de *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, quando inoculado em caldo de extrato de levedura e sacarose, contendo Iprodiona (0 a 20 µg/ml) e incubado a 25° C por 4 a 21 dias, apresentaram menor crescimento vegetativo, sendo que não houve produção de aflatoxinas em níveis de Iprodiona de 20 µg/g.

O objetivo desse trabalho foi verificar a eficácia da Iprodiona em inibir a produção de aflatoxinas por fungos, em grãos de milho com alta umidade, em condições de clima tropical.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram cultivados, em 1994, sob irrigação, dois hectares de milho da cultivar BR 201, no Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, Sete Lagoas em Minas Gerais. A colheita foi realizada no período de 28/03/94 a 06/05/94, à medida que os grãos atingiam as umidades desejadas.

O tratamento foi efetuado imediatamente após a colheita, utilizando-se solução de Iprodiona (20ppm), em

veículo aquoso e oleoso. Paralelamente, uma amostragem foi obtida sem a aplicação do princípio ativo.

Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em 72 tambores metálicos de 200 litros de capacidade. Trinta e seis (36) foram adaptados com fundo falso perfurado e dutos de aeração, promovida por dois ventiladores. Todos os tambores foram dotados de pontos de retirada de amostras e pontos para determinação da temperatura da massa de grãos.

O período de armazenamento foi estabelecido em função do exame visual de fungos nos grãos de milho. As amostras de milho com maiores teores de umidade (25,8% e 22,9%), ficaram 14 e 16 dias armazenadas, respectivamente, em atmosfera aerada e não aerada. As amostras com menores níveis de umidade (18,8%, 17,7%, 16,1% e 11,7%) ficaram 28 dias armazenadas, também em atmosfera aerada e não aerada.

Após o período de armazenamento, amostras em duplicata, foram retiradas (5kg), moídas (granulometria de 20 mesh), e acondicionadas à baixa temperatura até o momento da análise.

As aflatoxinas foram extraídas e quantificadas pela técnica descrita por SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA¹³, sendo a confirmação efetuada pelo método de PRZYBYLSKI.⁵

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados são apresentados nas Tabelas 1 e 2. Observa-se que nas amostras controle (sem fungicida), que foram armazenadas sob aeração (temperatura 18-20 °C), os níveis de aflatoxinas foram superiores aos encontrados nas amostras tratadas com fungicida e armazenadas em aeração, indicando um efeito protetor do tratamento efetuado. No caso de acondicionamento das amostras sem aeração (temperatura 35-40 °C), verificou-se que algumas amostras que sofreram tratamento com fungicida em veículo aquoso, apresentaram níveis de aflatoxinas superiores ao do grupo controle, indicando que a temperatura e/ou a água são fatores paralelos que influenciam a produção de aflatoxinas. A heterogenicidade das amostras, bem como a distribuição das aflatoxinas nos alimentos, pode explicar os resultados encontrados. Os experimentos com Iprodiona em veículo oleoso reduziram os níveis de aflatoxinas em milho de uma maneira mais significativa do que quando foi utilizado a água como diluente.

TABELA 1
Níveis de aflatoxinas em milho em grão, com diferentes níveis de umidade, e armazenado em atmosfera aerada (Temperatura: 18-20°C)

Amostra	Iprodiona (20 ppm)	Umidade a 105°C (%)	Aflatoxina Total (µg/kg) ¹
		25,8	
P ₁	Água		274
P ₂	Água		181
P ₃	Óleo		492
P ₄	Óleo		90
P ₅	Controle		863
P ₆	Controle		501
		22,9	
P ₇	Água		500
P ₈	Água		485
P ₉	Óleo		420
P ₁₀	Óleo		568
P ₁₁	Controle		1156
P ₁₂	Controle		1201
		18,8	
P ₁₃	Água		35
P ₁₄	Água		56
P ₁₅	Óleo		30
P ₁₆	Óleo		25
P ₁₇	Controle		64
P ₁₈	Controle		54
		17,7	
P ₁₉	Água		ND
P ₂₀	Água		ND
P ₂₁	Óleo		ND
P ₂₂	Óleo		ND
P ₂₃	Controle		ND
P ₂₄	Controle		ND
		16,1	
P ₂₅	Água		ND
P ₂₆	Água		ND
P ₂₇	Óleo		ND
P ₂₈	Óleo		ND
P ₂₉	Controle		ND
P ₃₀	Controle		ND
		11,7	
P ₃₁	Água		ND
P ₃₂	Água		ND
P ₃₃	Óleo		ND
P ₃₄	Óleo		ND
P ₃₅	Controle		ND
P ₃₆	Controle		ND
I Média de duplicata	P ₁ a P ₆ : 14 dias de armazenamento		
ND: Não detectado	P ₇ a P ₁₂ : 16 dias de armazenamento		
	P ₁₃ a P ₃₆ : 28 dias de armazenamento		

TABELA 2
Níveis de aflatoxina em milho em grão, com diferentes níveis de umidade, e armazenado em atmosfera não aerada (Temperatura: 35-40°C)

Amostra	Iprodiona (20 ppm)	Umidade a 105°C (%)	Aflatoxina Total (µg/kg) ¹
		25,8	
P37	Água		2909
P38	Água		2976
P39	Óleo		1421
P40	Óleo		1587
P41	Controle		2876
P42	Controle		2726
		22,9	
P43	Água		2623
P44	Água		2292
P45	Óleo		928
P46	Óleo		1008
P47	Controle		2766
P48	Controle		2945
		18,8	
P49	Água		1002
P50	Água		1197
P51	Óleo		366
P52	Óleo		784
P53	Controle		1258
P54	Controle		1072
		17,7	
P55	Água		818
P56	Água		415
P57	Óleo		179
P58	Óleo		237
P59	Controle		866
P60	Controle		867
		16,1	
P61	Água		75
P62	Água		127
P63	Óleo		29
P64	Óleo		19
P65	Controle		47
P66	Controle		40
		11,7	
P67	Água		ND
P68	Água		ND
P69	Óleo		ND
P70	Óleo		ND
P71	Controle		ND
P72	Controle		ND

1 Média de duplicata P37 a P42: 14 dias de armazenamento

ND: Não detectado P43 a P48: 16 dias de armazenamento

P49 a P72: 28 dias de armazenamento

Foi observado que mesmo com teores de umidade relativamente elevados (16,1% e 17,7%), somente o acondicionamento com aeração é suficiente para inibir a produção de aflatoxinas. Entretanto, para evitar a formação de aflatoxinas em amostras acondicionadas em ambiente sem aeração, há necessidade de um menor nível de umidade das amostras (11,7%). Observou-se também, em análises complementares, que nesse nível de umidade, em atmosfera aerada, não houve formação de aflatoxinas após 60 e 120 dias de armazenamento.

As amostras que sofreram o processo de aeração (temperatura 18-20 °C), apresentaram em todas as umidades testadas e nas mesmas condições, níveis de aflatoxinas inferiores às amostras não aeradas (35-40°C), indicando ser a temperatura um fator importante para a biossíntese de aflatoxinas pelo *Aspergillus flavus* e/ou *Aspergillus parasiticus*. Observou-se também, nos dois tratamentos, que os níveis de aflatoxinas foram superiores nas amostras com teores de umidade mais elevados, sugerindo que a água influencia o processo de formação de aflatoxinas.

Foi verificado que nas amostras de milho aeradas e com teor de umidade 22,9%, os níveis de aflatoxinas foram superiores aos encontrados nas amostras aeradas e com umidade de 25,8%. Uma possível explicação pode ser o tempo de armazena-

mento dessas amostras (14 dias), inferior em relação às amostras com umidade de 22,9%, que ficaram armazenadas durante 16 dias. Resultados semelhantes não foram encontrados no experimento sem aeração. Talvez o efeito temperatura tenha uma influência maior na produção de aflatoxinas que o tempo de armazenamento.

CONCLUSÃO

De uma maneira geral, a aplicação da Iprodiona, tanto na forma aquosa quanto oleosa, provocou um decréscimo nos níveis de aflatoxinas nas amostras de milho, armazenadas em ambiente aerado e não aerado. Entretanto, não houve inibição da biossíntese de aflatoxinas. Nos próximos ensaios, alterações nas condições experimentais deverão ser efetuadas (concentração do princípio ativo na formulação, temperatura de armazenamento) com o objetivo de tentar reduzir a contaminação de milho com aflatoxina.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Rhodia Agro Ltda., pelo apoio financeiro.

RIALA6/788

PRADO, Guilherme et alii Incidence of aflatoxins in corn (*Zea mays L.*) with different levels of moisture, after treatment with fungicide, at atmosphere with and without ventilation, *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 55(2):79-84, 1995.

ABSTRACT: It was verified the production of aflatoxins in corn samples, cultivar BR 201, grown in 1994, at Centro Nacional de Milho e Sorgo, in Sete Lagoas, Minas Gerais. Duplicate samples, showing different levels of moisture, were treated with Iprodione aqueous and oily solution (20 ppm), and were stored in metal containers, with and without ventilation, at temperatures ranging from 18 to 20 °C and from 35 to 40 °C, respectively. The found results showed a reduction of the aflatoxins levels in samples treated with Iprodione and stored at a ventilated atmosphere. When the samples were stored without ventilation (temperature between 35 and 40 °C), the decrease of the aflatoxins levels was not significant, mainly when the moisture values were high, showing that temperature and moisture were important factors in aflatoxins biosynthesis.

DESCRIPTORS: corn, aflatoxins, iprodione, control.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARINO, A.A. & BULLERMAN L. B. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 as affected by the fungicide Iprodione. *J. Food Prot.*, 56: 718-721, 1993.
2. DIENER, U.L. & DAVIS, N.D. Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids by *Aspergillus flavus* in sterile peanuts. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 44:259-263, 1967.
3. FRANK, R.; BRAUN, H.E.; RIPLEY, B.D. Residues of insecticides, and fungicides in fruit produced in Ontario, Canada, 1986-1988. *Food Add. Contam.* 7: 637-648, 1990.
4. MONTANI, M.L. & VAAMOND, G. Water activity influence on aflatoxin accumulation in corn. *Intern. J. Food Microb.*, 6:349-353, 1988.
5. NICÁCIO, MAURÍCIO AGUIMAR DE SOUZA. Determinação de aflatoxinas e identificação da microbiota fúngica em milho (*Zea mays L.*) pós-colheita. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1995. 72p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, 1995.
6. OSORIO, J. M.; ADASKAVEG, J.E.; OGAWA, J.M. Comparative efficacy and systemic activity of Iprodione and the experimental anilide E-0858 for control of brown rot on peach fruit. *Plant-Disease*, 77:1140-1143, 1993.
7. PRADO, G.; MARTINS VIEIRA, M.B.C.; NICÁCIO, M.A.S.; GLÓRIA, M.B.A. Efeito da umidade relativa na contaminação microbiana e produção de aflatoxinas em amendoim em grão. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 11:264-273, 1991.
8. PRZYBYLSKI, W. Formation of aflatoxin derivatives on thin layer chromatographic plates. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 58: 163-164, 1975.
9. SABINO, M.; PRADO, G.; COLEN, G. Ocorrência de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em milho de Minas Gerais. Parte I. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 46:65-71, 1986.
10. SABINO, M.; PRADO, G.; INOMATA, F.I.; PEDROSO, M.O. & GARCIA, R.V. Natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in maize in Brasil. Part II. *Food Add. Contam.*, 6:327-331, 1989.
11. SCHINDLER, A.F.; PALMER, J.G.; EISENBERG, W.V. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* as related to various temperatures. *Appl. Microb.*, 15: 1006-1009, 1967.
12. SHOTWELL, O.L. & HESSELTINE, C.W. Five-years study of mycotoxins in Virginia wheat and dent corn. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 6:1466-1469, 1983.
13. SOARES, L.M.V & RODRIGUES-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic methods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 73: 22:26, 1989.
14. STOLOFF, L.; HENRY, S.; FRANCIS, O.J. - Survey for aflatoxins and zearalenone in 1973 crop corn stored on farms and in country elevators. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 59: 119: 121, 1976.
15. WHO - Environmental Health Criteria 11: *Mycotoxins*. Geneve, World Health Organization, 1979, 127p.

Recebido para publicação em 28/03/95