

## OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS, OCRATOXINA A E ZEARALENONA EM MILHO DE MINAS GERAIS. PARTE 1 \*

Myrna SABINO \*\*  
Guilherme PRADO \*\*\*  
Gecernir COLEN \*\*\*

RIALA6/611

SABINO, M.; PRADO, G. & COLEN, G. — Ocorrência de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em milho de Minas Gerais. Parte 1 — *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 46(1/2):65-71, 1986.

**RESUMO:** Em amostras de milho em grão, safra 1984, coletadas em diversas localidades do Estado de Minas Gerais, foi verificada a incidência de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona. Foi utilizada a técnica de cromatografia em camada delgada. Das 83 amostras analisadas, 15 apresentaram aflatoxinas e apenas uma apresentou zearalenona. Não foi detectada ocratoxina A em nenhuma das amostras.

**DESCRITORES:** milho em grão, contaminação por micotoxinas; aflatoxina, ocratoxina A, zearalenona, detecção em milho em grão.

### INTRODUÇÃO

Micotoxinas são metabólitos produzidos por fungos que infestam as culturas, no campo e durante o armazenamento, e também os produtos alimentícios destinados ao consumo humano<sup>20</sup>.

As aflatoxinas pertencem a um grupo de metabólitos secundários derivados do bis-furano-isocumarina, produzidos por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, com atividade carcinogênica, teratogênica e mutagênica<sup>10</sup>. No campo, fatores como danos por insetos e condições climáticas influenciam a produção de aflatoxina. Para formação desta toxina, durante o armazenamento dos produtos, a temperatura deve estar acima de 25 °C e o teor de umidade, superior a 16%<sup>22</sup>.

Zearalenona é um composto estrogênico que causa problemas reprodutivos em animais, principalmente em suínos<sup>20</sup>, e é produzida por espécies de *Fusarium*<sup>25</sup>. O hiperestrogenismo, principal sinal de infecção por *Fusa-*

*rium*, tem sido relatado nos Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, URSS, Itália, Japão, África do Sul, China, Austrália, Hungria. A zearalenona é encontrada em milho, trigo, cevada, sorgo<sup>9</sup>. O milho é geralmente invadido por *Fusarium*, durante o armazenamento<sup>11</sup>, possibilitando a produção de zearalenona, se a umidade do grão for superior a 14% e a temperatura entre 12 e 18 °C<sup>18</sup>.

Ocratoxina A é uma micotoxina produzida por várias espécies de *Aspergillus* e de *Penicillium*<sup>8</sup>, tendo pronunciada atividade nefrotóxica em todas as espécies de animais estudadas<sup>6</sup>. Os cereais são as principais fontes de ocratoxina A na dieta humana, sendo o trigo, o milho e a cevada os mais susceptíveis<sup>7</sup>.

No Brasil, a ocorrência de aflatoxinas é alta<sup>3, 4, 12, 14, 15, 16, 21</sup>, mas se desconhece a incidência de zearalenona e ocratoxina A. O objetivo desse trabalho, na sua Parte 1, dentro da orientação do Programa Nacional de Monitoração e Controle de Micotoxinas, é o de fornecer dados sobre a presença de afla-

\* Realizado na Seção de Química Biológica do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, e na Divisão de Bromatologia da Fundação "Ezequiel Dias" da Secretaria de Estado da Saúde, Belo Horizonte, Minas Gerais.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

\*\*\* Da Fundação "Ezequiel Dias".

toxinas, ocratoxina A e zearalenona em milho.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas oitenta e três amostras de milho em grão coletadas pela Empresa Estadual de Assistência Técnica e Extensão Rural, MG (EMATER), no período de dezembro de 1984 a janeiro de 1985, em fazendas e sítios do interior de Minas Gerais, em quantidade nunca inferior a 2 kg. Após pulverização das amostras em moinho apropriado, seguiu-se tamização e quarteamento, onde estas foram reduzidas a cerca de 200 g.

A metodologia empregada para análise da zearalenona foi a da "Association of Official Analytical Chemists"<sup>24</sup>, e para a aflatoxina foi utilizado o método C.B. da "A.O.A.C."<sup>24</sup>.

Agitaram-se 50 g da amostra por 30 minutos com 250 ml de clorofórmio, 25 ml de água e 25 g de "Hyflo-Supercel". Em seguida, procedeu-se à filtração, recolhendo-se duas porções de 50 ml do filtrado. Para análise de zearalenona passou-se uma parte do filtrado em uma coluna de sílica gel 60, sendo a coluna eluída com hexano e benzeno para, eliminar lipídios e pigmentos, e com benzeno-acetona (95:5), para extrair a toxina. Para análise de aflatoxina, outra parte do filtrado foi também fracionada por cromatografia em coluna de sílica gel 60, usando-se hexano e éter etílico como eluentes, sendo as aflatoxinas eluídas com clorofórmio-metanol (97:3). As frações puras foram então concentradas em banho-maria, sob atmosfera de nitrogênio. O resíduo de aflatoxina foi guardado no refrigerador até o momento da sua quantificação. O resíduo contendo zearalenona foi purificado por partição com hexano e acetonitrila. A camada de acetonitrila foi evaporada e o resíduo guardado em refrigerador.

Para a determinação de aflatoxina, o resíduo foi dissolvido em 300  $\mu$ l de benzeno-acetonitrila (98:2). Em placa de sílica gel G foram aplicados 5, 10 e 10  $\mu$ l do extrato da amostra, e 1, 3, 5 e 10  $\mu$ l dos padrões de B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> de concentrações conhecidas. Na segunda mancha de 10  $\mu$ l da amostra, foram aplicados 5  $\mu$ l de padrões de B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub>. O cromatograma foi desenvolvido em tolueno-acetato de etila-clorofórmio-ácido fórmico a 90% (70:50:50:20), conforme recomendado por GIMENO<sup>5</sup>, sendo a visualização das fluorescências das aflatoxinas feita sob luz ultravioleta (366 nm) e, após comparação das intensidades das manchas fluorescentes, foi calculado o teor de aflatoxina presente na amostra analisada.

Desde que a detecção de aflatoxina por cromatografia em camada delgada não é prova conclusiva da identidade de aflatoxina, confirmação adicional foi efetuada usando o método de PRZYBYLSKY<sup>13</sup>, que consiste na formação dos derivados hemiacetais B<sub>2a</sub> e

G<sub>2a</sub> em placa de sílica gel G na presença de água e ácido trifluoroacético, usando como fase móvel clorofórmio-acetona (85:15). Esses derivados apresentam fluorescência em R<sub>f</sub> a cerca de 0,15-0,30 sob luz ultravioleta (366 nm). Em todas as amostras foi confirmada a positividade para aflatoxina.

Para quantificação de zearalenona, o resíduo foi dissolvido em 300  $\mu$ l de benzeno. Em duas placas A e B de sílica gel 60 foram aplicados 5, 10 e 10  $\mu$ l do extrato da amostra e 1, 3, 5 e 10  $\mu$ l do padrão de zearalenona de concentração conhecida. Na segunda mancha de 10  $\mu$ l da amostra foram aplicados 5  $\mu$ l do padrão de zearalenona. O cromatograma A foi desenvolvido em etanol-clorofórmio (5:95). Quando presente, a zearalenona apresenta uma fluorescência azul em R<sub>f</sub> 0,5-0,6 sob luz ultravioleta (254 nm). Fez-se então a comparação entre a intensidade de fluorescência das alíquotas das amostras com a dos padrões e calculou-se a quantidade de zearalenona presente.

Em seguida, pulverizou-se a placa com tricloreto de alumínio e aqueceu-se a 130 °C, por 5 minutos. O aparecimento de fluorescência azul a 366 nm comprova presença de zearalenona causada pelo deslocamento batocrômico. Paralelamente, utilizou-se o método descrito por SCOTT et alii<sup>19</sup> para a placa B, cujo cromatograma foi desenvolvido em clorofórmio-acetona (88:12). Pulverizou-se a seguir com solução de "Fast Violet B" e tampão pH 9,0. Secou-se com ar quente e observou-se mancha rosa sob luz visível. Pulverizou-se a placa com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 50% e aqueceu-se a 120 °C, por 5 minutos. O aparecimento de mancha violeta comprova a presença de zearalenona. A quantificação pode ser feita também por comparação das colorações dos derivados formados das alíquotas das amostras e padrões.

Para análise de ocratoxina A foi utilizado o método descrito por SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA<sup>23</sup>, que envolve extração com metanol-solução aquosa de cloreto de potássio, a 4%, purificação com sulfato de amônio a 30% e partição com clorofórmio. O extrato assim obtido foi usado para triagem em coluna de alumina-sílica gel e posterior confirmação e quantificação por cromatografia em camada delgada.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na análise das 83 amostras de milho em grão são apresentados na tabela 1.

Verificando a tabela 2, observa-se que das quinze amostras positivas para aflatoxina somente duas apresentaram teor acima de 30  $\mu$ g/kg, que é a tolerância máxima permitida pela legislação brasileira<sup>1</sup>, calculada pela soma dos teores das aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub>.

Observando a tabela 3, em que é mostrada a relação de positividade de aflatoxina com predominância de aflatoxina B<sub>1</sub> e/ou G<sub>1</sub>, nota-se uma correspondência nos resultados

encontrados em Minas Gerais com os da monitoração de milho em grão realizada em São Paulo, em 1981, ou seja, uma predominância de aflatoxina G<sub>1</sub>.

TABELA 1

*Incidência de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em milho em grão*

Amostras analisadas	Amostras positivas para		
	aflatoxinas	ocratoxina	zearalenona
83	15	0	1

TABELA 2

*Níveis de aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> em milho em grão*

Amostras positivas	Procedência	Aflatoxina B <sub>1</sub> μg/kg (ppb)	Aflatoxina G <sub>1</sub> μg/kg (ppb)
1	Santa Rita de Caldas	6	ND
1	São João Del Rey	2	19
1	Lagoa Dourada	6	ND
1	Elói Mendes	24	6
1	Muzambinho	ND *	3
1	Cristais	ND	3
1	Inconfidentes	355	ND
1	Estiva	710	75
3	Adrelândia	ND	3
1	Alterosa	12	3
1	Monte Santo de Minas	ND	3
1	Monsenhor Paulo	ND	6
1	Boa Esperança	12	ND
15	* ND = não detectado.		

TABELA 3

*Relação positividade — presença de aflatoxina B<sub>1</sub> e/ou G<sub>1</sub> em amostras de milho em grão de Minas Gerais, 1984, e de São Paulo, 1981*

Localidade	Amostras analisadas	Amostras positivas	Amostras com B <sub>1</sub>	Amostras com G <sub>1</sub>	Amostras com B <sub>1</sub> e G <sub>1</sub>
Minas Gerais (1984)	83	15	4	7	4
São Paulo (1981)	198	18	3	13	2

Trabalho realizado por FONSECA <sup>4</sup>, com torta e farelo de amendoim da safra de 1966/67 de São Paulo, relata predominância da aflatoxina G na região de Araraquara-Fernandópolis. Explicação para esse fato pode estar ligada à presença de metais no solo, como o zinco, que leva o *A. flavus* a produzir mais aflatoxina G do que B, ou à ocorrência de linhagens específicas de *A. flavus*, produtoras de aflatoxina G em maior escala <sup>2, 4</sup>. Observando a tabela 2, nota-se que três amostras provenientes da cidade de Andrelândia apresentaram positividade para aflatoxina G <sub>1</sub>.

Quanto à incidência de zearalenona, nesta primeira fase do trabalho, verificou-se que foi baixa, tendo sido detectada, em apenas uma amostra, no teor de 126 µg/kg. Quanto à sensibilidade de revelação, nos procedimentos adotados, um melhor resultado

foi obtido através do método descrito por SCOTT et alii <sup>19</sup> do que pelo método de STOLOFF & SCOTT <sup>24</sup>. Isso pode ser verificado nas tabelas 4 a 7 onde, após contaminação do milho com quantidades que variaram de 40 a 560 µg/kg de zearalenona, o limite de detecção encontrado para "Fast Violet B", que foi o revelador usado por SCOTT et alii <sup>19</sup>, está próximo de 10 ng, enquanto o limite para cloreto de alumínio, recomendado por STOLOFF & SCOTT <sup>24</sup> é cerca de 20 ng. No milho contaminado com 110 e 60 µg/kg de zearalenona, nas concentrações na placa de 4 a 37 ng, esta não foi detectada pelo método de STOLOFF <sup>24</sup> e pelo de SCOTT et alii <sup>19</sup>. Cumpre salientar que a amostra que deu positividade para zearalenona não apresentou fluorescência a 254 nm e a 366 nm, após reação com cloreto de alumínio, o que demonstra a melhor sensibilidade do primeiro método.

TABELA 4

Milho contaminado com 560 µg/kg de zearalenona

Concentração de zearalenona na placa ng	Detecção pelos métodos de		
	Stoloff & Scott <sup>24</sup>		Scott et alii <sup>19</sup>
	254 nm	366 nm após AlCl <sub>3</sub>	Luz visível após "Fast Violet B"
5,0	—	—	—
11,0	—	—	+
22,0	—	+	+
56,0	+	+	+
112,0	+	+	+

(+) = positivo para zearalenona.

(—) = negativo para zearalenona.

TABELA 5

Milho contaminado com 450 µg/kg de zearalenona

Concentração de zearalenona na placa ng	Detecção pelos métodos de		
	Stoloff & Scott <sup>24</sup>		Scott et alii <sup>19</sup>
	254 nm	366 nm após AlCl <sub>3</sub>	Luz visível após "Fast Violet B"
7,0	—	—	—
15,0	—	—	+
30,0	—	+	+
75,0	+	+	+
150,0	+	+	+

(+) = positivo para zearalenona.

(—) = negativo para zearalenona.

TABELA 6

*Milho contaminado com 140 µg/kg de zearalenona*

Concentração de zearalenona na placa ng	Detecção pelos métodos de		
	Stoloff & Scott <sup>24</sup>		Scott et alii <sup>19</sup>
	254 nm	366 nm após AlCl <sub>3</sub>	Luz visível após "Fast Violet B"
10,0	—	—	—
15,0	—	—	—
19,0	—	—	+
24,0	—	+	+
47,0	+	+	+

(+) = positivo para zearalenona.

(—) = negativo para zearalenona.

TABELA 7

*Recuperação de zearalenona adicionada ao milho em diferentes níveis*

Níveis de zearalenona µg/kg	Resultado encontrado µg/kg	Porcentagem de recuperação
560	535	96,0
450	534	118,0
340	320	94,0
225	214	95,0
170	171	100,6
140	143	102,0

Foi realizada, também, para os diferentes níveis de contaminação citados a quantificação de zearalenona, utilizando Fast Violet B como revelador, o que demonstrou que o procedimento adotado neste trabalho foi correto (tabela 7).

Outra vantagem que pode ser citada é a da maior especificidade da revelação descrita por SCOTT et alii<sup>19</sup>. Alternariol e metil éter alternariol, dois metabólitos fenólicos da *Alternaria*, já detectados em sorgo<sup>17</sup>, apresentaram as mesmas características, a 254 e a 366 nm, após pulverização com cloreto de alumínio, que a zearalenona, podendo então ser confundidos com esta; entretanto, não reagem com Fast Violet B. Uma das amostras, após tratamento segundo STOLOFF & SCOTT<sup>24</sup>, apresentou cromatograma típico da presença de zearalenona. Contudo, a positividade não se confirmou após reação com Fast Violet B.

Quanto à incidência de ocratoxina A, observa-se pela tabela 1 que esta não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas. O limite de detecção do método utilizado é de 10 µg/kg, não sendo citado na literatura nenhum outro procedimento cromatográfico com sensibilidade menor.

## CONCLUSÃO

Os dados obtidos nesta primeira parte do trabalho indicam que a incidência de aflatoxinas, zearalenona e ocratoxina A em milho de Minas Gerais não reflete uma preocupação mais séria como a que ocorre com aflatoxina em amendoim. Entretanto, teremos uma visão real quando avaliarmos a safra de milho de 1985/86, e que constituirá a parte 2 do nosso trabalho.

SABINO, M.; PRADO, G. & COLEN, G. — Occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in corn grain from Minas Gerais state Brazil. Part I. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 46(1/2):65-71, 1986.

**ABSTRACT:** The occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone was shown by thin-layer chromatography, in samples of corn grain from the 1984 crop in various places of Minas Gerais state. Of eighty three samples analyzed, fifteen had aflatoxin and only one zearalenone. Ochratoxin A was not detected in any sample.

**DESCRIPTORS:** corn (grain), contamination by micotoxins; aflatoxin, ochratoxin A, zearalenone, detection in corn grain.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Leis, decretos etc. — Resolução n.º 34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 19 jan. 1977. Seção I, pt. I, p. 710. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos.
- DAVIS, N.D.; DIENER, V.L. & ELDRIDGE, D.W. — Production of aflatoxins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> by *Aspergillus flavus* in a semisynthetic medium. *Appl. Microbiol.*, 14:378-80, 1966.
- FONSECA, H. — *Contribuição ao estudo da aflatoxina no amendoim (Arachis hypogaea L.) da colheita à industrialização*. Piracicaba, 1969. [Tese livre-doc. — Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP]
- FONSECA, H. — *Contribuição ao estudo da ocorrência de aflatoxinas em tortas, farelos e farinhas de amendoim (Arachis hypogaea L.) no Estado de São Paulo*. Piracicaba, 1968. 65 p. [Tese — Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP]
- GIMENO, A. — Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, t-2-toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin and penitrem A. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 62:579-85, 1979.
- KROGH, P. — Microbial nature and biological property of ochratoxins. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS. Cairo, 1981. *Proceedings*. Cairo, NIDOC/AOAC, 1983. p. 81-6.
- KROGH, P. & NESHEIM, S. — Ochratoxin A. In: INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER — *Environmental carcinogens selected methods of analysis*. v. 5: *Some mycotoxins*. Edited by H. Egan et alii. Lyon, IARC, 1982. p. 249. (IARC publ. n.º 44)
- LEE, S.C. & CHU, F.S. — Enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A in wheat. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 67: 45-7, 1984.
- MIROCHA, C.J. — Fusarium toxins. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS. Cairo, 1981. *Proceedings*. Cairo, NIDOC/AOAC, 1983. p. 71-9.
- MIROCHA, C.J. — Historical aspects of mycotoxicology and developments in aflatoxicosis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS. Cairo, 1981. *Proceedings*. Cairo, NIDOC/AOAC, 1983. p. 23-31.
- MIROCHA, C.J.; SCHAUERHAMER, B. & PATHRE, S.V. — Isolation, detection, and quantitation of zearalenone in maize and barley. *J. Assoc. off. anal. Chem.* 57:1104-10, 1974.
- PRADO, G. — Incidência de aflatoxina B<sub>1</sub> em alimentos. *Rev. Farm. Bioquim.*, 5: 147-57, 1983.
- PRZYBYLSKI, W. — Formation of aflatoxin derivatives on thin layer chromatographic plates. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 58:163-4, 1975.
- SABINO, M. — Variações de níveis de aflatoxina B<sub>1</sub> em alimentos e rações animais no período de 1971 a 1979. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40:153-8, 1980.
- SABINO, M. & CORRÊA, M.J.S. — Aflatoxina B<sub>1</sub> em feijão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41:83-7, 1981.
- SABINO, M.; INOMATA, E.I. & LAMARDO, L.C.A. — Variação dos níveis de aflatoxina B<sub>1</sub> em pasta de amendoim e paçoca consumidas no Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42:39-44, 1982.
- SEITZ, L.M.; SAUER, D.B.; MOHR, H.E.; BURROUGHS, R. & PAUKSTELIS, J.V. — Metabolites of alternaria in grain sorghum. Compounds which could be mistaken for zearalenone and aflatoxin. *J. agric. Food Chem.*, 23:1-4, 1975.

18. SHERWOOD, R.F. & PEBERDY, J.F. — Production of the mycotoxin, zearalenone, by *Fusarium graminearum* growing on stored grain. I. Grain storage at reduced temperatures. *J. Sci. Food Agric.*, 25: 1081-7, 1974.
19. SCOTT, P.M.; PANALAKS, T.; KANHERE, S. & MILES, W.F. — Determination of zearalenone in cornflakes and other corn-based foods by thin layer chromatography, high pressure liquid chromatography, and gas-liquid chromatography/high resolution mass spectrometry. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 61:593-600, 1978.
20. SCOTT, P.M.; TRENHOLM, H.L. & SUTTON, M.D., ed. — *Mycotoxins: a canadian perspective*. Ottawa, National Research Council of Canada, 1985, p. 15, 21. (NRCC publ. n.º 22848)
21. SCUSSEL, V.M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. — Teores de aflatoxinas em amendoim e seus produtos comercializados em Campinas em 1980/82. *Bol. Soc. bras. Cienc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 19(2): 109-19, 1985.
22. SHOTWELL, O.L. — Aflatoxin in corn. *J. amer. Oil Chem. Soc.*, 54:216A-224A, 1977.
23. SOARES, L.M.V. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. — Screening and quantitation of ochratoxin A in corn, peanuts, beans, rice and cassava. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 68:1128-30, 1985.
24. STOLOFF, L. & SCOTT, P.M. — Natural poisons. In: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14th ed. Arlington, Virginia, A.O.A.C., 1984. p. 481-483; 499.
25. WORLD HEALTH ORGANIZATION — *Mycotoxins*. Geneva, UNEP/WHO, 1979. 127 p. (Environmental Health Criteria 11)

Recebido para publicação em 13 de fevereiro de 1986.

