
METODOLOGIA SIMPLIFICADA PARA DETECÇÃO DE AFLATOXINAS EM MILHO

SIMPLIFIED METHODOLOGY TO THE AFLATOXINS DETECTION IN THE CORN

CANÇADO, R. A.¹; FREITAS, R. J. S. de²

¹ Doutorando em Tecnologia de Alimentos - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - UFPR, Caixa Postal 19011, CEP: 81531-990 - Curitiba - PR: E-mail: cancado@onda.com.br

² Professor Doutor do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - UFPR.

RESUMO

O presente trabalho consistiu no desenvolvimento de metodologia simplificada para a detecção de aflatoxinas por CFLAE – Contagem por Fluorescência com Luminosidade Amarelo-Esverdeada. Essa metodologia foi comparada com o método analítico oficial de CCD – Cromatografia em Camada Delgada da American Oil Chemists Society. Nas análises CFLAE e CCD além de não constatarem diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$), mostraram a sensibilidade da metodologia em seus resultados.

Palavras-chave: micotoxinas, milho, "Zea mays Linné", aflatoxinas, *Aspergillus flavus*.

ABSTRACT

This paper is concerned to the development of the simplified methodology to the aflatoxins' detection by FGYBC – Fluorescence with Greenish-Yellow Brightness Count. This methodology was likened with the official analytical method TLC – Thin Layer Chromatography of the American Oil Chemists Society. In the analyses FGYBC and TLC besides there were not significant difference statistically ($P < 0.05$), they showed the methodology's sensibility in their results.

Keywords: mycotoxins, corn, kernels, *Zea mays Linné*, aflatoxins, *Aspergillus flavus*.

1 INTRODUÇÃO

As micotoxinas estão espalhadas pelos cinco continentes; na América do Norte observa-se a presença das micotoxinas aflatoxinas, vomitoxinas, zearalenona e ocratoxina; na América Central e do Sul ocorrem aflatoxinas, vomitoxinas, fumonisinas, ocratoxinas e a toxina T-2; já na Europa e Ásia observa-se a presença de aflatoxinas, vomitoxinas e zearalenona; na África observam-se as aflatoxinas, as fumonisinas e a zearalenona; e na Oceania verificam-se as aflatoxinas e as fumonisinas (DEVEGOWDA, 1999).

Em grãos, a maior inconveniência é o crescimento de fungos, já que esses podem ocasionar perdas nutricionais devidas à transformação ou degradação de nutrientes. O principal fator a considerar nesse desenvolvimento de fungos é a possibilidade de espécies toxigênicas produzirem metabólitos tóxicos (micotoxinas) ao homem e aos animais.

Entre métodos com menor custo de análise para detectar as micotoxinas estão aqueles por meio de fluorescência. A fluorescência das aflatoxinas deve-se aos seus radicais, furano, cumarina e lactona que possuem tonalidade azulada. Como o milho possui a xantofila oxigenada chamada zeaxantina, responsável pela coloração amarela, esta também é estimulada pela luz UV produzindo, pela combinação com os radicais das aflatoxinas, uma coloração amarelo-esverdeada para o espectro visual humano (SILVERSTEIN et. al., 1987; AOCS, 1997; BUDAVARI, 2001).

O objetivo deste trabalho foi comparar a metodologia simplificada de detecção das aflatoxinas através da Contagem por Fluorescência com Luminosidade Amarelo-Esverdeada (CFLAE) em grãos de milho, com o método oficial da AOCS, detecção por cromatografia de camada delgada (CCD) (AOCS, 1997).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

A matéria-prima utilizada na pesquisa, foram amostras de grãos de milho integral, totalizando 144 amostras divididas em dois lotes de 72 cada, provenientes de diversas partes do Estado do Paraná, divididas em cinco núcleos e cada uma contendo cinco quilogramas, sendo embaladas em saco de papel multifolhado com a terceira folha impermeável.

Na preparação da amostra foi utilizado 4,5 kg de grãos de milho para a análise de aflatoxinas por CFLAE e para a análise por CCD foi efetuado o quarteamento manual, que consiste em agrupar a amostra e espalhá-la sobre uma superfície lisa em forma de retângulo e por meio de uma tira de madeira cortou-se em metades até adquirir a quantidade de duas amostras de 250g cada, sendo em seguida moída a uma granulometria de 20 mesh.

2.2 Metodologia CFLAE

O equipamento CFLAE possui um gabinete (cuba) nas dimensões 50 x 40 x 65cm, de metal, sendo que a parte interna com pintura fosca na cor preta, com um visor de vidro de proteção à luz ultravioleta, incolor e transparente, no formato retangular nas dimensões 20 x 8cm, com uma abertura retangular e suporte de abrir/fechar, para entrada de amostra. No interior da cuba, junto a saída da abertura retangular se fixa uma rampa de metal com ângulo de inclinação na faixa de 40° a 46° para que a amostra possa deslizar e a partir do visor ser analisada, finalizando com uma abertura na parte inferior da cuba para o descarte da amostra em um recipiente. Essa rampa é iluminada por uma fonte de luz ultravioleta com comprimento de onda de 265nm, conforme Figuras 1, 2.



FIGURA 1 – VISTA DA PARTE EXTERNA DO EQUIPAMENTO DE CONTAGEM POR FLUORESCÊNCIA COM LUMINOSIDADE AMARELO-ESVERDEADA - CFLAE

FONTE: CANCADO, 2001

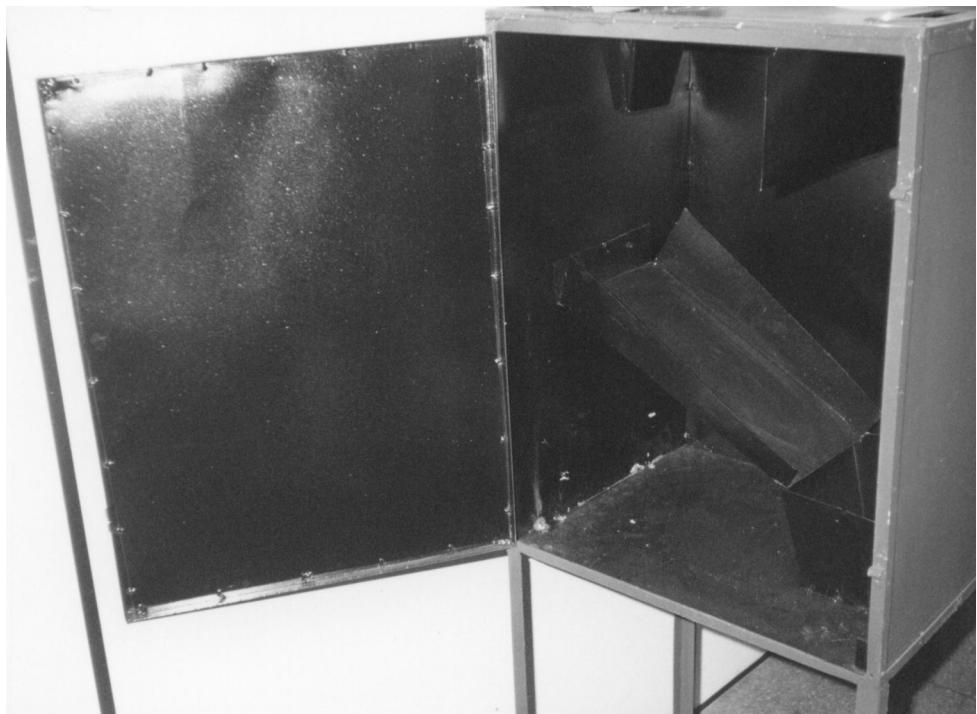


FIGURA 2 – VISTA DA PARTE INTERNA DO EQUIPAMENTO DE CONTAGEM POR FLUORESCÊNCIA COM LUMINOSIDADE AMARELO-ESVERDEADA – CFLAE
FONTE: CANCADO, 2001

O método de análise consiste em pesar 4,5 kg da amostra e colocá-la no funil de entrada do equipamento, liga-se à fonte de luz ultravioleta com comprimento de onda de 265nm, abre-se a parte inferior do funil e o controle de passagem dos grãos é feito manualmente de acordo com cada analista, sendo a leitura feita entre 3 a 8 minutos. Pelo visor conta-se quantos grãos da amostra estão apresentando coloração amarelo-esverdeada. Somente devem ser contados os grãos de coloração amarelo-esverdeada, as outras cores possíveis de aparecer como a branca, verde, amarela forte, rosa, vermelha, azul, roxa, violeta entre outras, são consideradas negativas, indicando ausência da micotoxina.

$$\text{O cálculo segue a fórmula: } \text{CFLAE/kg} = \frac{\text{nº. de grãos positivos}}{4,5\text{kg}}.$$

Para relatar o resultado da análise de aflatoxinas em ppb (ig/kg) , conforme a unidade da CCD, deve-se seguir o resultado calculado pela fórmula; com resultado igual a 1, tem-se em teor de aflatoxina igual a 5,0ppb; igual a 2 tem-se 10,0ppb; igual a 4 tem-se 20,0ppb; igual a 5 tem-se 30,0ppb; igual a 7 tem-se 50,0ppb e igual a 9 tem-se 80,0 ppb. Esses valores estão de acordo com estudos de BARABOLAK (1977,1978) e adaptado com resultados de amostras de milho dos estados de São Paulo e Paraná, no período de 1987 a 1995 e confirmados com as amostras desse trabalho.

2.3 Metodologia CCD

O método de CCD segue a metodologia oficial da *American Oil Chemists Society* (AOCS, 1997).

2.4 Análise Estatística

As variáveis consideradas foram o teor de aflatoxinas pelo método CCD, o teor de aflatoxinas pelo método CFLAE. Esses dados foram obtidos nos grãos de milho em ensaios experimentais onde foi utilizado um delineamento em blocos ao acaso com parcelas subdivididas.

Para os cálculos estatísticos utilizou o Programa STATISTICA para Windows, versão 5.1.D, 1996, da empresa Statsoft, Inc., produzido em Tulsa/OK – USA (STATSOFT, 1996).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizadas 144 amostras de grãos de milho (*Zea mays* Linné), divididas em dois blocos de 72 amostras cada, conforme a safra de 2000 ou 2001. Os núcleos se referem na divisão do Estado do Paraná elaborada pelo autor da seguinte forma: N1 = região de Curitiba, N2 = região de Guarapuava, N3 = região de Cascavel, N4 = região de Campo Mourão e N5 = região de Ivaiporã, de acordo com a tabela 1.

TABELA 1 – DADOS DAS AMOSTRAS DE GRÃOS DE MILHO COLETADAS NO ESTADO DO PARANÁ - SAFRAS 2000/2001.

SAFRAS	NÚCLEOS (QUANTIDADE DE AMOSTRAS)					TOTAL DE AMOSTRAS	MÉDIA POR NÚCLEO
	N1	N2	N3	N4	N5		
2000	18	12	18	12	12	72	14
2001	18	12	18	12	12	72	14

A tabela 2 demonstra os valores médios obtidos nas análises por núcleo do Paraná em contaminação de aflatoxinas via CCD.

TABELA 2 – VALORES MÉDIOS OBTIDOS NAS ANÁLISES DE CCD NOS NÚCLEOS DO ESTADO DO PARANÁ EM CONTAMINAÇÃO DE AFLATOXINAS.

SAFRA	NÚCLEOS	CCD % POSITIVO	CCD % NEGATIVO	VALOR MÉDIO EM ppb (μ g/kg)
2000	N1	0,0	100,0	0,00
	N2	0,0	100,0	0,00
	N3	0,0	100,0	0,00
	N4	16,7	83,3	8,46
	N5	5,5	94,5	7,87
2001	N1	0,0	100,0	0,00
	N2	0,0	100,0	0,00
	N3	0,0	100,0	0,00
	N4	0,0	100,0	0,00
	N5	0,0	100,0	0,00

Nas análises efetuadas pelo método de cromatografia em camada delgada (CCD), a safra 2000 obteve 22,2% das 36 amostras analisadas com contaminação positiva em aflatoxinas, sendo igual ou inferior a 20 ppb; a safra 2001 obteve 100,0% das 36 amostras analisadas com contaminação negativa em aflatoxinas. Vale ressaltar que os valores encontrados são para as aflatoxinas B₁ e G₁, não detectando valores positivos para B₂ e G₂.

Nas análises por CFLAE os resultados são obtidos por número de grãos que contenha a fluorescência amarelo-esverdeada, os valores encontrados são submetidos à formula conforme o item 2.2, o resultado é transformado num valor de contaminação de aflatoxinas em ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

Os valores obtidos pelo CFLAE estão na tabela 3, referentes a valores médios obtidos nas análises por núcleo do Paraná em contaminação de micotoxina aflatoxina.

TABELA 3 – VALORES MÉDIOS OBTIDOS NAS ANÁLISES DE CFLAE NOS NÚCLEOS DO ESTADO DO PARANÁ EM CONTAMINAÇÃO DE AFLATOXINAS.

SAFRA	NÚCLEOS	CFLAE % POSITIVO	CFLAE % NEGATIVO	VALOR MÉDIO EM ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
2000	N1	2,7	97,3	20,0
	N2	5,5	94,5	20,0
	N3	8,3	91,7	5,0
	N4	13,9	86,1	7,0
	N5	5,5	94,5	10,0
2001	N1	0,0	100,0	0,0
	N2	5,5	94,5	8,0
	N3	5,5	94,5	13,0
	N4	0,0	100,0	0,0
	N5	0,0	100,0	0,0

Nas análises efetuadas pelo método CFLAE, a safra 2000 obteve 36,1% das 36 amostras analisadas com contaminação positiva em aflatoxinas, sendo igual ou inferior a 20 ppb; já a safra 2001 obteve 11,1% das 36 amostras analisadas com contaminação positiva em aflatoxinas, sendo inferior a 20 ppb. Vale ressaltar que os valores encontrados são para as aflatoxinas B₁ e G₁, não detectando valores positivos para B₂ e G₂.

Ao interpolar as médias dos resultados conforme mostra a tabela 4 e a figura 4, verifica-se a exatidão dos resultados tanto em CCD como no CFLAE.

TABELA 4 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES MÉDIOS OBTIDOS NAS ANÁLISES DE CFLAE E DE CCD NOS NÚCLEOS DO ESTADO DO PARANÁ EM CONTAMINAÇÃO DE AFLATOXINAS

FONTES DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F _{OBSERVADO}	F _{REQUERIDO} 5%	F _{REQUERIDO} 1%
CCD	4	0,75	0,19	6,05* ^{ns}	9,12	28,71
CFLAE	3	0,33	0,11	3,57* ^{ns}	9,28	29,66
ERRO						
EXPERIMENTAL	3	0,01	0,01			
TOTAL	10	1,09				

NOTA: * = 5% de probabilidade; ns = não significativo.

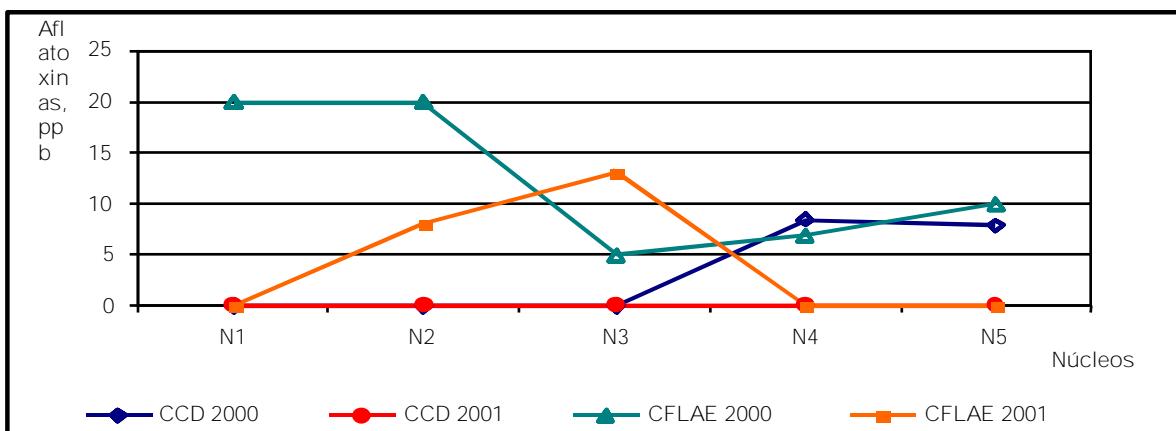


FIGURA 4 – INTERPOLAÇÃO DE RESULTADOS OBTIDOS ENTRE ANÁLISES COM CCD E CFLAE NOS GRÃOS DE MILHO (*Zea mays* Linné)

Os dados dispostos na tabela 4 comprovam que não foram constatadas diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) e o gráfico comparativo CCD x CFLAE (FIG. 4) demonstra que as análises efetuadas via CFLAE foram mais sensíveis que a CCD, tanto para a safra 2000 como para a safra 2001, com um total de 72 análises. Enquanto que a amostra N1 obteve 20ppb de contaminação no CFLAE, em CCD obteve-se valor zero; demonstrando-se que quando é realizado o quarteamento, mesmo utilizando-se uma amostra muito pequena do total adquirido, a CCD pode dar falso negativo. Como a CFLAE utiliza-se uma quantidade de amostra maior e faz-se o rastreamento por completo, considerando-se mais eficiente neste caso que a CCD. É certo que nesse resultado de 20ppb, o valor obtido pela CFLAE é aproximado, podendo ser maior ou menor, porém com um percentual de erro 0,036%, este valor mínimo pode ser desconsiderado, uma vez que apresenta 99,96% de precisão.

4 CONCLUSÕES

A detecção da contaminação por aflatoxinas pelo método de cromatografia em camada delgada (CCD) para o lote A encontrou valores entre 0,00 e 10,57 ppb, com um percentual de 22,2% de contaminação do total de amostras e para o lote B obteve 100,0% das amostras com contaminação negativa, resultados abaixo do valor permitido pela legislação vigente, 20ppb. Quanto à detecção da contaminação por aflatoxinas pelo método de contagem por fluorescência com luminosidade amarelo-esverdeada (CFLAE) para o lote A, foi constatado valores entre 0 e 20 ppb, com um percentual de 36,1% de contaminação do total de amostras. Para o lote B foram constatados valores entre 0 e 20 ppb, com um percentual de 11,1% de contaminação do total de amostras, embora estejam dentro do valor máximo permitido pela legislação vigente, 20 ppb. Na comparação das análises de aflatoxinas por CCD e CFLAE demonstrou a proximidade da sensibilidade entre os métodos, sendo que CFLAE apresentou-se mais sensível. No método CFLAE constatou-se ainda que para a contagem dos grãos de milho não deve ultrapassar a 18 grãos com coloração positiva para o teste, para que esse resultado esteja no limite requerido pela legislação do país, 20 ppb; as amostras com resultados acima desse valor deverão ser descartadas.

REFERÊNCIAS

1. AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY – AOCS. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 5.ed. Champaign, IL: AOCS, 1997. v. 1.
2. ARAÚJO, J.M.A. Química de alimentos: teoria e prática. 2.ed. Viçosa: UFV, 1999. 416p.
3. BARABOLAK, R.; COLBURN, C. R. ; JUST, D. E.; KURTZ, F. A.; SCHLEICHERT, E. A. Apparatus for rapid inspection of corn for aflatoxin contamination. *Cereal Chem.*, Chicago, v 55, n.6, p.1065-1067, 1978.
4. BARABOLAK, R. Recommendation of association between bright greenish-yellow fluorescente of corn kernels and aflatoxin content. Chicago, 1977. p. 1-9. Progress report.
5. BUDAVARI, S. The merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 13.ed. Whitehouse Station, NJ: Merck Research Laboratories, 2001. 1818p.
6. STATSOFT, INC. Statistica for Windows (computer program manual). Programa de cálculos e gráficos estatísticos. Tulsa, OK, 1996. 1 CD-ROM.
7. CANÇADO, R. A. Acervo de fotos experimentais para dissertação. 2001. 1 álbum (51 fotos): color. e p & b; várias dimensões.
8. CIRIO, G. M. Detecção e controle de fungos em sementes de milho (*Zea mays L.*) armazenados. Curitiba, 1998, 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
9. DEVEGOWDA, G. Micotoxinas: assassinos escondidos nas rações animais. *Feeding Times*, New York, v.1, n.1, p. 13-17, 1999.
10. SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. Identificação espectral de compostos orgânicos. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1987. 299p.