

"DETOXIFICAÇÃO DE MILHO (*ZEA MAYS* L.) CONTAMINADO COM AFLATOXINAS ATRAVÉS DO PROCESSAMENTO POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA"

JOSÉ MARCOS GONTIJO MANDARINO^a
DILSON TEIXEIRA COELHO^b
JOSÉ CARLOS GOMES^b
JUNE FERREIRA MAIA PARREIRAS^b

RESUMO

Foram realizados experimentos com a finalidade de se estudar a detoxificação de milho, naturalmente contaminado com aflatoxinas, através do processamento por extrusão termoplástica. A quantificação foi realizada por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (CLAD). O método de extração utilizado foi bastante eficiente pois apresentou percentuais de recuperação de 104,0; 102,7; 92,5 e 77,0% para as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ respectivamente. O processamento por extrusão termoplástica de farinha de milho a 35% umidade reduziu o teor das aflatoxinas contaminantes da amostra (B₁, B₂, G₂) a níveis inferiores aos limites permitidos pela legislação Americana (FDA) que é de 20 ppb.

PALAVRAS-CHAVE: Aflatoxina, Aflatoxina-Milho; Aflatoxina-Detoxificação por extrusão termoplástica; Alimentos; Microbiologia.

1 – INTRODUÇÃO

Na natureza existe uma grande variedade de fungos que se desenvolvem em sementes e grãos, no campo ou durante o armazenamento. Alguns deles ao interagirem com o substrato, tornam-se capazes de produzir toxinas nocivas à saúde humana e animal, quando ingeridas, inaladas ou postas em contato com a pele (DIENER⁵, MOREAU¹³, NORTHOLT¹⁴, PANG¹⁶, STOLOFF²⁴).

As aflatoxinas são metabólitos secundários sintetizados por fungos, principalmente, do gênero *Aspergillus*, destacando-se duas espécies intimamente relacionadas *A. flavus* e *A. parasiticus* (LIN⁹, MIROCHA¹²).

Essas toxinas são responsáveis por graves intoxicações e têm se mostrado carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas a diversas espécies animais, inclusive o ser humano (ALPERT¹, BAXTER³, BURG⁴, DVORÁCKOVÁ⁷, PANG¹⁶, PHILLIPS¹⁸, SHANK²²). A ingestão prolongada de produtos com níveis de contaminação acima de 50 ppb tem efeitos fatais, caracterizados por alterações anatomofisiológicas, tais como degeneração gordurosa e fibrosa do fígado e hiperplasia das vias biliares, quadro esse que pode evoluir para hepatocarcinomas (SHANK²²).

A contaminação de produtos agrícolas tais como milho, amendoim, castanha do Brasil, sementes de algodão, arroz e outros, com aflatoxinas evidencia um perigo potencial para a saúde animal e humana, decorrente da ingestão de rações tóxicas, grãos, sementes e alimentos contaminados (DIENER⁵, MOREAU¹³). Essa contaminação atinge diretamente consumidores, fabricantes de rações, produ-

tores de aves, criadores de suínos e produtores de leite (STOLOFF²⁴).

No Brasil, os fabricantes de rações animais são diretamente atingidos pelo problema da contaminação de produtos agrícolas (grãos e sementes) pelos fungos produtores de aflatoxinas. Geralmente, as tortas e farelos de algodão e amendoim, bem como o milho, matérias-primas utilizadas na fabricação de rações, podem estar contaminadas, causando assim grandes perdas econômicas para o país.

Outro fator importante a ser considerado é a perda de divisas econômicas em termos de exportações de produtos agrícolas, caso estes estejam contaminados com aflatoxinas, uma vez que os mercados compradores possuem rígido controle para a importação de produtos passíveis de contaminação por aflatoxinas.

O objetivo deste trabalho foi o estudo da detoxificação de grãos de milho, naturalmente contaminados com aflatoxinas, através do processamento por extrusão termoplástica. A avaliação da eficiência do processo de detoxificação empregado, foi feita através de análises quantitativas dos teores residuais de aflatoxinas no produto detoxificado. Para essa quantificação utilizou-se como técnica analítica a Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (CLAD).

2 – MATERIAL E MÉTODOS

Os grãos de milho naturalmente contaminados com aflatoxinas foram triturados em moinho de martelo para se obter um produto com granulometria semelhante ao fubá.

a. Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos – CCA/Universidade Estadual de Londrina

b. Departamento de Tecnologia de Alimentos – UFV.

Em seguida o produto foi homogeneizado (misturador helicoidal de fita), pesado e acondicionado em barris de plástico hermeticamente fechados.

Padrões das Aflatoxinas — Os padrões das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ foram adquiridos dos Laboratórios Sigma Co., USA. As soluções padrão foram preparadas segundo o método Padrão de Testes de Materiais de Referência descrito pela WORLD HEALTH ORGANIZATION^{2,7} e de acordo com as recomendações de RODRICKS e STOLOFF^{1,9}. As concentrações das soluções padrão das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ foram calculadas segundo o método recomendado pela WORLD HEALTH ORGANIZATION^{2,7} utilizando-se para isso um espectrofotômetro UV-Vis (marca Varian, modelo 634-S).

Extração de aflatoxinas — O procedimento utilizado para a extração das aflatoxinas foi o mesmo descrito por PARREIRAS^{1,2}, o qual é uma adaptação do método I, "Screening Methods for Corn" da AOAC². Neste procedimento (Figura I) a precipitação dos pigmentos do milho foi feita pela adição de solução saturada de sulfato de amônio ao filtrado extrator (acetona : água). A remoção dos pigmentos precipitados foi feita através de filtração em papel de filtro (Framex 389) e por minicoluna de sílica (SEP-PAK), que removeu pigmentos e lipídios.

Análise Qualitativa — A Cromatografia de Camada Fina foi utilizada para determinar qualitativamente as aflatoxinas contaminantes da amostra. Utilizou-se placas de 5 x 10 cm de sílica gel G-60 (0,2 mm de espessura) previamente ativadas em estufa a 105°C, por uma hora e a fase móvel constituiu-se de clorofórmio: acetona (9+1, v/v).

Análise Quantitativa — A determinação do nível de contaminação da amostra pelas aflatoxinas, bem como o teor residual das mesmas no produto detoxificado foi realizada por CLAD. Nestas análises utilizou-se o sistema de bombeamento CG-480 C, com injetor Rheodyne 7125 e "loop" de 100 µl acoplado a uma coluna Varian Micropak Si-5 com 4mm de diâmetro interno e 300mm de comprimento. O fluxo da fase móvel foi de 0,9ml/min e, esta constituiu-se de tolueno: acetato de etila: metanol: ácido fórmico bidestilado: acetonitrila (81 + 4,5 + 2,25 + 2,25 + 10, v/v/v/v/v/v). A separação dos componentes foi feita através de eluição isocrática. Para a detecção foi utilizado o detector de fluorescência (Fluorichrom, Varian Assoc.), equipado com filtros CS4-76 e CS3-73 para emissão de Cs7-60 para excitação. Trabalhou-se com uma atenuação de 50. O registro dos picos e o cálculo de suas respectivas áreas foram feitos em integrador processador (modelo CG-200). O método de cálculo adotado foi o de normalização de área.

Recuperação das Aflatoxinas — Para a determinação do percentual de recuperação do procedimento de extração utilizado, foram adicionados à amostras de fubá, isentas de contaminação, 10 ppb de cada uma das quatro aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂). Estas amostras artificialmente contaminadas, em triplicata, foram então submetidas ao mesmo procedimento de extração das toxinas, utilizado para a amostra contaminada e produto detoxificado. A quantificação foi também por CLAD e, as condições de análise

foram idênticas àquelas adotadas para a quantificação das toxinas na amostra contaminada e no produto detoxificado.

Processo de detoxificação — Em um misturador helicoidal de fita foi feita a incorporação da água destilada à amostra, para se atingir o nível de 35% de umidade. O tempo de homogeneização foi de uma hora.

Após esse procedimento a amostra foi submetida ao processamento por extrusão termoplástica (extrusor Italmecânica, modelo MG 100), cujas condições foram as seguintes: velocidade da rosca extrusora 600 rpm; temperaturas atingidas 50°C, 75°C, 110°C e 140°C no 1º, 2º, 3º e 4º estágios do cilindro extrusor respectivamente; a pressão final foi de 18 Kgf/cm² e tráfila com 10 orifícios de 5mm de diâmetro cada um.

O produto extrusado foi seco à uma temperatura de 80–90°C em um secador de túnel (Italmecânica — modelo MG 100) equipado com esteira rolante e circulação forçada de ar quente. A umidade final dos produtos foi de 9%.

Análise de Aminoácidos — Foram feitas análises quantitativas dos aminoácidos do milho contaminado e do produto detoxificado. A técnica utilizada foi a cromatografia de troca iônica, segundo o método de SPACKMAN et alii^{2,3}, pelo uso de analisador automático.

A determinação do triptofano foi feita através de hidrólise enzimática e ensaio colorimétrico conforme o método descrito por OPIÉNSKA-BLAUTH et alii^{1,5}.

3 — RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato obtido ao final do procedimento de extração das aflatoxinas apresentou-se praticamente límpido demonstrando assim a eficiência do método utilizado, na eliminação de interferentes como pigmentos e lipídeos.

Os percentuais de recuperação para as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ foram de 104,0; 102,7; 92,5 e 77,0%, respectivamente, evidenciando assim que o método de extração empregado foi adequado e eficiente para extração das toxinas (Figura II).

A análise qualitativa da amostra, por cromatografia de camada fina, identificou apenas a presença das aflatoxinas B₁ e B₂. A aflatoxina G₂ estava presente na amostra, em concentrações muito baixas, pouco mais de 1,0 ppb. Essa observação foi evidenciada na análise quantitativa por CLAD. A presença da aflatoxina G₁ não foi evidenciada em nenhuma das duas análises.

Através da técnica de CLAD, conforme pode ser observado na Figura III, foram determinados os níveis de contaminação da amostra e os teores residuais das aflatoxinas no produto detoxificado.

O nível de contaminação da amostra, bem como o teor residual das aflatoxinas no produto extrusado e, o percentual de destruição das mesmas pelo processamento por extrusão termoplástica, ao qual a amostra contaminada foi submetida, encontram-se no Quadro 1.

O percentual de destruição obtido, principalmente para as aflatoxinas B₁ e B₂, foi satisfatório e, esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por diversos métodos de tratamento térmico (MAN et alii^{1,0},

SEENAPPA & NYAGAHUNGU²¹, TREVOR et alii²⁶, LEE et alii⁸, MARTH & DOYLE¹¹ e DOYLE et alii⁶). Estes autores, empregaram na detoxificação de alimentos e produtos agrícolas contaminados com aflatoxinas, agentes físicos (calor, pressão e umidade) separadamente e associados.

Os teores residuais das aflatoxinas no produto detoxificado, pelo processamento por extrusão termoplástica, estão à níveis inferiores ao limite máximo de contaminação, permitido pelas legislações Brasileiras (30ppb) e Americana (20ppb).

QUADRO 1 – Nível de contaminação da amostra, teor residual das aflatoxinas no produto detoxificado e percentual de destruição das toxinas pelo processo de detoxificação empregado (extrusão termoplástica)

Aflatoxina	Nível de contaminação da amostra (ppb + dp ^a)	Teor residual no produto extrusado (ppb + dp ^a)	Percentual de destruição (%)
B ₁	29,0 ± 1,5	12,9 ± 0,19	55,5
B ₂	14,8 ± 1,8	1,5 ± 0,29	90,0
G ₂	1,4 ± 0,1	1,07 ^b ± 0,04	23,6

dp^a = Desvio padrão de três repetições

b = Valor corrigido em função do percentual de recuperação do método de extração, para G₂ ter sido de 77%.

A composição dos aminoácidos obtida no milho contaminado e no produto detoxificado pela extrusão termoplástica encontra-se no Quadro 2.

Os aminoácidos que sofreram maiores reduções nos

seus teores percentuais foram: ácido aspártico, ácido glutâmico, prolina, valina e leucina. Essas reduções verificadas, podem estar relacionadas com as reações de escurecimento não enzimático (Reação de Maillard) entre os açúcares redutores e os aminoácidos do milho. No processamento por extrusão existem dois fatores que favorecem tais reações: a umidade e temperaturas elevadas.

4 – CONCLUSÃO

O método utilizado para a extração das aflatoxinas contaminantes do milho apresentou percentuais de recuperação de 104,0; 102,7; 92,5 e 77,0%, para as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, respectivamente, indicando assim ser esse método de elevada eficiência na extração das toxinas.

A técnica de processamento por extrusão termoplástica à um nível de 35% de umidade, utilizada como meio para detoxificação do milho naturalmente contaminado com aflatoxinas, mostrou-se bastante eficiente, pois os percentuais de destruição das aflatoxinas B₁ e B₂ foram superiores a 50 e 90% respectivamente.

Embora tenham ocorrido reduções nos teores dos aminoácidos do milho contaminado, essas reduções não foram muito drástica e, geralmente ocorrem em qualquer processamento de grãos por extrusão termoplástica.

Os resultados obtidos neste trabalho, viabilizam a utilização do processamento por extrusão termoplástica como um processo de detoxificação de farinha de milho contaminada com aflatoxinas e, a utilização dos produtos extrusados detoxificados para alimentação humana ou animal.

QUADRO 2 – Composição de Aminoácidos do Milho Contaminado e do Produto Detoxificado

Aminoácidos	% de Aminoácido no Material Natural		% de Aminoácido na Proteína (g de aa/16 g N)	
	Milho Contaminado	Produto Extrusado	Milho Contaminado	Produto Extrusado
Lisina	0,11	0,08	1,12	0,75
Histidina	0,09	0,08	0,94	0,75
Arginina	0,11	0,07	1,12	0,66
Triptofano*	0,09	0,09	0,94	0,94
Ác. aspártico	0,53	0,42	5,25	4,22
Treonina	0,28	0,20	2,81	1,97
Serina	0,41	0,34	4,03	3,37
Ác. glutâmico	1,24	1,01	12,28	10,03
Prolina	0,61	0,49	6,09	4,87
Glicina	0,36	0,31	3,56	3,09
Alanina	0,49	0,41	4,87	4,12
Cistina	0,07	0,03	0,66	0,28
Valina	0,27	0,17	2,72	1,69
Metionina	0,14	0,11	1,41	1,12
Isoleucina	0,18	0,12	1,78	1,22
Leucina	0,75	0,63	7,40	6,28
Tirosina	0,18	0,15	1,78	1,50
Fenilalanina	0,26	0,21	2,62	2,06

* Determinado, separadamente, por hidrólise enzimática.

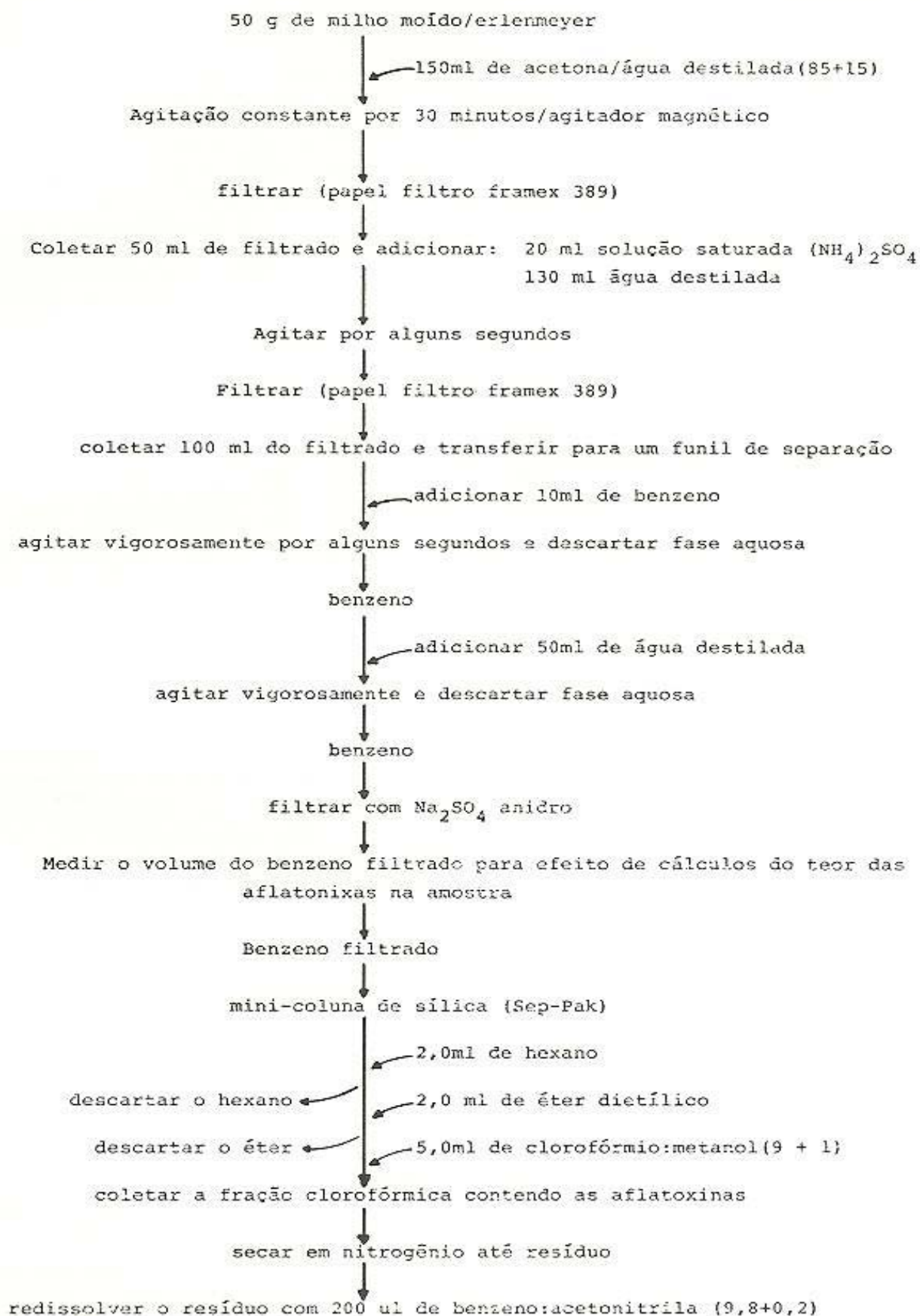


FIGURA 1 – Diagrama do Procedimento de Extração das Aflatoxinas em Amostras de Milho

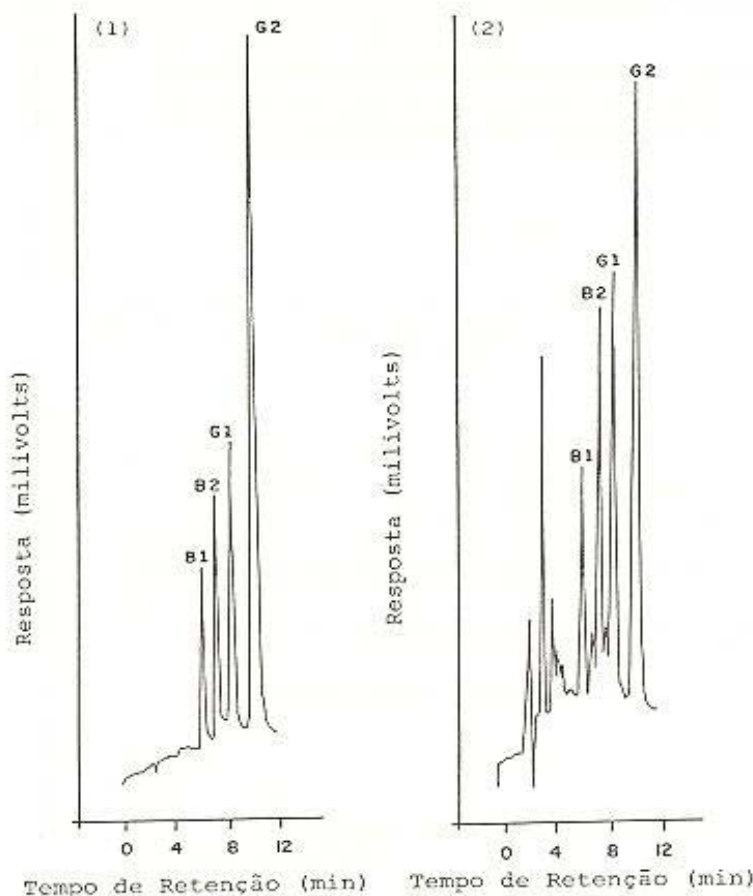


FIGURA 2 - Cromatogramas: (1) Mistura de padrões das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, volume aplicado 1,5 µl; (2) Adição de 10 ppb de cada uma das aflatoxinas a amostra de milho isenta de contaminação (recuperação do método de extração), volume aplicado 20 µl. Condições de análise; coluna Micropak Si-5, 300 x 4mm; fase móvel - tolueno: acetato de etila: metanol: ácido fórmico: acetonitrila (81 + 4,5 + 2,25 + 10, v/v/v/v/v); fluxo = 0,9 ml/min e detector de fluorescência.

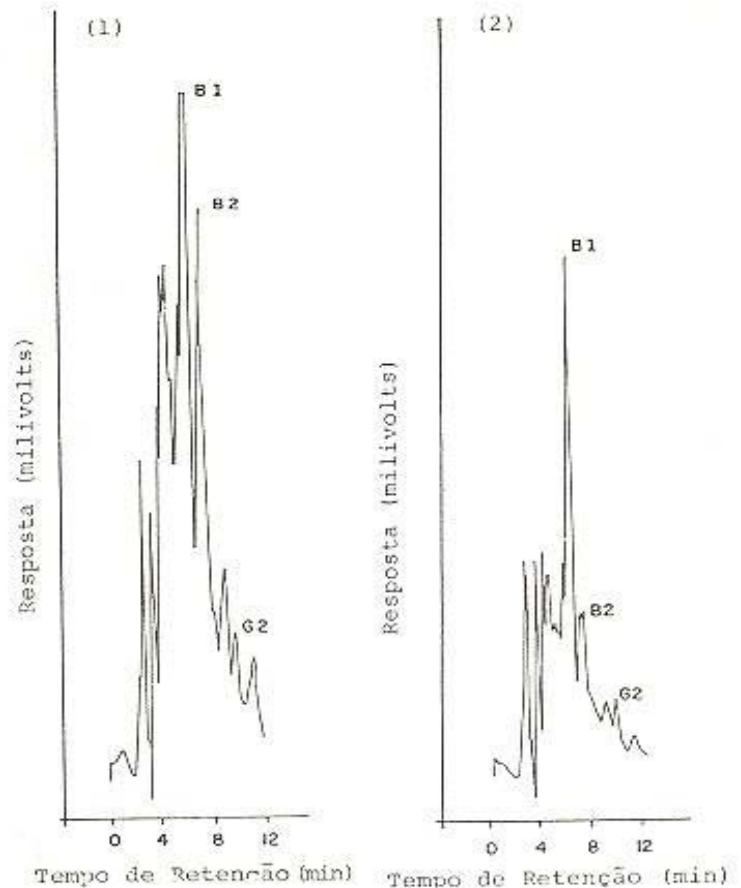


FIGURA 3 - Cromatogramas: (1) Amostra de Milho contaminada (2) Produto detoxificado pelo processamento por extrusão. Volume aplicado 20 µl. Condições de análise: Coluna Micropak Si-5, 300 x 4mm; fase móvel: tolueno: acetato de etila: metanol: ácido fórmico bidestilado: acetonitrila (81 + 4,5 + 2,25 + 10, v/v/v/v/v); fluxo 0,9ml/min; fluxo = 0,9ml/min e detector de fluorescência

ABSTRACT

Experiments were conducted to study the efficiency of the thermoplastic extrusion process in reducing aflatoxin levels on naturally contaminated yellow dent corn. Quantification was accomplished by high performance liquid chromatography (HPLC). The extration method used was efficient, since recovery of added aflatoxins B₁, B₂, G₁ e G₂ (10 ppb each) was 104,0; 102,7; 92,5 and 77,0% respectively. Subjecting contaminated yellow corn flour samples at 35% moisture the thermoplastic extrusion process reduced aflatoxin B₁, B₂ and G₂ levels below the FDA guideline of 20 ppb total aflatoxin.

KEY WORDS: Aflatoxin; Corn-aflatoxin; Aflatoxin-detoxification by thermoplastic extrusion process; Food; Microbiology.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALPERT, M.E.; HUTT, M.S.R.; WOGAN, G.N.; DAVIDSON, C.S. Association between aflatoxin content of food and hepatoma frequency in Uganda. *Cancer*, 28: 253-60, 1971.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Natural poisons. In: ——. *Official methods of analysis*. 12 ed. Washington, D.C., 1975. cap. 26, p. 462-82.
- BAXTER, C.S.; WEY, H.E.; BURG, W.R. A prospective analysis of the potential risk associated with inhalation of aflatoxin-contaminated grain dusts. *Food Cosmet. Toxicol.*, 19(6): 765-9, 1981.
- BURG, W.R.; SHOTWELL, O.L.; SALTZMAN, B.E. Measurements of airborne aflatoxins during the handling of contaminated corn. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 42(1): 1-11, 1981.
- DIENER, V.L. & DAVIS, N.D. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. In: GOLDBLATT, L.A. *Aflatoxins: scientific background, control and implications*. New York, Academic Press, 1969. cap. 2, p. 13-46.

- 6 – DOYLE, M.P.; APPLEBAUM, R.S.; BRACKETT, R.E.; MARTH, E.H. Physical, chemical and biological degradation of mycotoxins in foods and agricultural commodities. *J. of Food Prot.*, 45(10):964-71, 1982.
- 7 – DVORÁČKOVÁ, I.; STORA, C.; AYRAUND, N. Evidence for aflatoxin B₁ in two cases of lung cancer in man. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 100(2): 221-4, 1981.
- 8 – LEE, L.S.; CUCULLU, A.F.; FRANZ Jr., A.O.; PONS Jr., W.A. Destruction of aflatoxins in peanuts during dry and oil roasting. *J. Agric. Food Chem.*, 17(3): 451-3, 1969.
- 9 – LIN, M.T. Biologia dos fungos toxigênicos. ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS: PROBLEMAS E SOLUÇÕES, 1980. *Anais...* 1980. p.11-2.
- 10 – MANN, G.E.; CODIFER, L.P.; DOLLER, F.G. Effect of heat on aflatoxins in oilseed meals. *J. Agric. Food Chem.*, 15(6): 1090-2, 1967.
- 11 – MARTH, E.H. & DOYLE, M.P. Update on molds: degradation of aflatoxin. *Food Technol.*, 33(2):81-7, 1979.
- 12 – MIROCHA, C.J.; PATHRE, S.V.; CHRISTENSEN, C.M. Mycotoxins. Secondary products of metabolism. In: ROSE, A.H. *Economic microbiology*. New York, London, San Francisco, Academic Press, 1979. v.3, 595 p.
- 13 – MOREAU, C. *Molds, toxins and Food*. New York, Wiley & Sons, 1979, 477 p.
- 14 – NORTHOLT, M.D.; VERHULSDONK, C.A.H.; SOENTORO, P.S.S.; PAULSCH, W.E. Effect of water and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *J. Milk Food. Technol.*, 39: 170-4, 1976.
- 15 – OPIÉNSKA-BLAUTH, J.; CHAREZINSKI, M.; BEBEC, H.A. A new rapid method of determining tryptofan. *Anal. Biochem.*, 6: 69-76, 1963.
- 16 – PANG, R.T.L.; HUSAINI, S.N.; KARYADI, D. Aflatoxin and primary hepatic cancer in Indonesia. In: CONGRESSO MUNDIAL DE GASTROENTEROLOGIA, V, México, 1974.
- 17 – PARREIRAS, J.F.M. *Ocorrência de aflatoxinas M₁ e B₁ em leite e forragens na Microrregião de Viçosa - MG*. Viçosa, Impr. Univ., 1985. 62 p. Tese (M.S.)
- 18 – PHILLIPS, D.L.; YOURTEE, D.M.; SEARLES, S. Presence of aflatoxin B₁ in human liver in the United States. *Toxicol Appl. Pharmacol.*, 36: 403-6, 1976.
- 19 – RODRICKS, J.V. & STOLOFF, L. Determination of concentration and purity of aflatoxin standards. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 53(1): 96-100, 1975.
- 20 – SCHROEDER, H.W. & CARLTON, W.W. Accumulation of only aflatoxin B₂ by a strain of *Aspergillus flavus*. *Applied Microbiology*, 25: 146-8, 1973.
- 21 – SEENAPPA, M. & NYAGAHUNGU, I.K. Retention of aflatoxin in "Ugali" and bread made from contaminated maize flour. *J. Food Sci. and Technol.*, 19(2): 64-5, 1982.
- 22 – SHANK, R.C.; GORDON, J.E.; WOGAN, G.N.; NONDASUTA, A.; SUBHAMANI, B. Dietary aflatoxins and human liver cancer III. Field survey of rural Thai families for ingested aflatoxins. *Food Cosmet. Toxicol.*, 10: 71-84, 1972.
- 23 – SPACKMAN, D.H. & STANFORD, M. Automatic recording apparatus for use in chromatography of aminoacids. *Anal. Chem.*, 30: 1190-206, 1958.
- 24 – STOLOFF, L. Aflatoxins – an overview. In: RODRICKS, J.V.; HESSELTINE, C.W.; MEHLMAN, M.A. *Mycotoxins in human and animal health*. Park Forest South, Pathtox Publisher, 1977. p. 8-36.
- 25 – STUBBLEFIELD, R.D. Stability and molar absorptivity of aflatoxin M₁ in acetonitrile-benzene (1 + 9). *J. Assoc. off. Anal. Chem.*, 63(3): 634-6, 1980.
- 26 – TREVOR, J.C.; CROWTHER, P.C.; FEUELL, A.J.; FRANCIS, B.J. Experimental detoxification of groundnut meals containing aflatoxin. *Nature*, 269: 406-7, 1966.
- 27 – WORLD HEALTH ORGANIZATION AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Preparation and testing of micotoxin standard reference materials. In: ——. *Environmental carcinogens selected methods of analysis*. Lyon, 1982. v. 5, cap. 4, p.63-84.

Recebido para publicação em 14/01/88