

## Estudo sobre a ocorrência de fungos e aflatoxina B<sub>1</sub> na dieta de bovinos leiteiros em São Paulo<sup>1</sup>

Thiago P. Motta<sup>2</sup>, Adriana Frizzarin<sup>2</sup>, Thamires Martins<sup>2</sup>, Mariana S. Miranda<sup>2</sup>,  
Juliana R.P. Arcaro<sup>2</sup>, Luiz A. Ambrósio<sup>2</sup> e Claudia R. Pozzi<sup>2\*</sup>

**ABSTRACT-** Motta T.P., Frizzarin A., Martins T., Miranda M.S., Arcaro J.R.P., Ambrósio L.A. & Pozzi C.R. 2015. [Study on the occurrence of fungi and aflatoxina B<sub>1</sub> in the diet of dairy cattle in São Paulo, Brazil.] Estudo sobre a ocorrência de fungos e aflatoxina B<sub>1</sub> na dieta de bovinos leiteiros em São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 35(1): 23-28. Centro Apta Bovinos de Leite, Instituto de Zootecnia, Rua Heitor Penteado 56, Nova Odessa, SP 13460-000, Brazil. E-mail: [pozzi@iz.sp.gov.br](mailto:pozzi@iz.sp.gov.br)

The quality of the diet offered to lactating cows is a concern to health officials the possibility of detecting mycotoxins harmful to human and animal health. The objectives were to evaluate the profile of mycoflora, determine the water activity (Aw) and the natural occurrence of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) in diets offered to lactating cows from dairy farms in the state of São Paulo, Brazil. Samples of the diets were taken directly from the troughs batch of 15 cows, on two consecutive days at intervals of 24 hours and every 15 days with a period of 45 sampling days per farm. Purification and determination of AFB<sub>1</sub> were performed on immunoaffinity columns and High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The study of mycobiota present in samples of diets (288) revealed that yeast cells were predominant in all diets (83.97 to 99.98%). 15 genera were isolated from filamentous fungi, with *Aspergillus* spp (20.09%), *Fusarium* spp. (14.16%) and *Penicillium* spp. (11.48%) the most prevalent. The counts of colony forming units per gram of food (UFC.g<sup>-1</sup>) ranged from 10<sup>2</sup> a 10<sup>11</sup>. The water activity of the samples ranged from 0.91 to 0.98. We have detected the presence of AFB<sub>1</sub> in 31.44% of samples with levels between 1.68 a 194.51µg.kg<sup>-1</sup>. Measures of good production, storage and use should be taken to reduce the occurrence of aflatoxin B<sub>1</sub> in the diet offered to lactating cow.

INDEX TERMS: Aflatoxina B<sub>1</sub>, mycotoxins, foods, lactating cows, farms.

**RESUMO.-** A qualidade da dieta ofertada às vacas em lactação é uma preocupação dos agentes de saúde devido à possibilidade da detecção de micotoxinas prejudiciais a saúde humana e animal. Os objetivos do trabalho foram avaliar o perfil da micobiota, determinar a atividade de água (Aa) e a ocorrência natural de aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) em dietas ofertadas a vacas em lactação de fazendas leiteiras no estado de São Paulo, Brasil. As amostragens das dietas foram realizadas diretamente dos cochos de lote de 15 vacas, em dois dias consecutivos com intervalos de 24h e a cada 15 dias, perfazendo um período de 45 dias de amostragens por fazenda. A purificação e determinação de AFB<sub>1</sub> foram realiza-

das em colunas de imunoafinidade e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O estudo da micobiota presente nas amostras das dietas (288) revelou que as leveduras foram predominantes em todas as dietas (83,97 a 99,98%). Foram isolados 15 gêneros de fungos filamentosos, com os gêneros *Aspergillus* spp (20,09%), *Fusarium* spp (14,16%) e *Penicillium* spp (11,48%) os mais prevalentes. As contagens de Unidades Formadoras de Colônias por grama de alimento (UFC. g<sup>-1</sup>) variaram de 10<sup>2</sup> a 10<sup>11</sup>. A atividade de água das amostras variou entre 0,91 a 0,98. Foi detectada a presença de AFB<sub>1</sub> em 31,44% das amostras com teores entre 1,68 a 194,51µg.kg<sup>-1</sup>. Medidas de boas práticas de produção, estocagem e utilização devem ser tomadas para diminuir a ocorrência de AFB<sub>1</sub> nas dietas ofertadas às vacas em lactação.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Aflatoxina B<sub>1</sub>, micotoxinas, alimentos, vacas em lactação, fazendas.

<sup>1</sup> Recebido em 20 de março de 2014.

Aceito para publicação em 30 de dezembro de 2014.

<sup>2</sup> Centro Apta Bovinos de Leite, Instituto de Zootecnia, Rua Heitor Penteado 56, Nova Odessa, SP 13460-000, Brasil. \*Autor para correspondência: [pozzi@iz.sp.gov.br](mailto:pozzi@iz.sp.gov.br)

## INTRODUÇÃO

Garantir a segurança dos alimentos tem sido um grande foco de ação internacional nos últimos anos. Os perigos microbiológicos e químicos são motivos de preocupação e, entre os contaminantes naturais, a contaminação de alimentos e rações por micotoxinas pode ter efeitos graves na saúde humana e animal. Os fungos toxigênicos crescem e se proliferam em grãos de cereais, principalmente, milho, trigo, cevada, sorgo, algodão, ingredientes básicos da dieta de vacas leiteiras, seja na forma de concentrados ou volumosos conservados sob a forma de silagem. As aflatoxinas são metabólitos produzidos por diferentes espécies do gênero *Aspergillus* seção *Flavi* e têm grande importância econômica na contaminação de cereais em vários países, conhecidos por contaminar várias culturas tanto no pré como na pós-colheita. São conhecidas 18 diferentes moléculas do grupo das aflatoxinas, mas a aflatoxina B<sub>1</sub> é considerada uma das substâncias carcinogênicas mais conhecidas e também uma das mais isoladas dos alimentos contaminados (Zeringue et al. 1993). Pesquisas realizadas em várias regiões no Brasil demonstraram a presença de altos teores de AFB<sub>1</sub> em grãos de milho antes e após a colheita e em ingredientes de rações (Rodríguez-Amaya & Sabino 2002, Rocha et al. 2009), sendo frequente o envolvimento desses metabólitos em patologias de animais e, em especial, na bovinocultura leiteira. Assim, o presente trabalho teve por objetivos avaliar o perfil da microbiota, a atividade de água e a presença de AFB<sub>1</sub> nas dietas completas fornecidas as vacas em lactação em fazendas leiteiras no estado de São Paulo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 288 amostras de dieta completa (volumoso+concentrado, v/v), de 135 vacas em lactação das raças Holandesa Preta e Branca e cruzadas distribuídas em fazendas produtoras de leite no estado de São Paulo, Brasil, identificadas por letras de A até E. O volumoso ofertado às vacas era constituído de silagem de milho, sorgo e cevada úmida. O concentrado ofertado era constituído de grãos de milho, farelo de soja e caroço de algodão e mistura mineral. A amostragem foi realizada diretamente do cocho de um lote de 15 vacas em lactação com produções médias de 20 kg de leite por dia, a cada 15 dias e durante período de 45 dias. Foram retiradas amostras incrementais em 25 pontos diferentes do cocho para compor uma amostra composta de 5 kg que foi homogeneizada e subdividida em quatro sub-amostras de 1,25 kg cada (Brasil 2010). Os dados climáticos (precipitação pluvial total, temperaturas máxima e mínima e umidade relativa do ar) foram obtidos nas estações meteorológicas do Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO, Campinas).

O isolamento, contagem e identificação da microbiota das dietas foram realizados por meio da técnica de diluição seriada (Busta et al. 1984). Os fungos isolados foram classificados até gênero, mas aqueles pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* foram classificados até espécie, de acordo com os compêndios: Raper e Fennell (1965) e Nelson et al. (1983). A atividade de água (Aa) das amostras das dietas foi determinada por meio do aparelho Testo® 650 (Testo, Brasil).

A extração e purificação de AFB<sub>1</sub> foram realizadas em coluna de imunoafinidade (Vicam, EUA). Vinte e cinco gramas de cada amostra (288) foram trituradas com 5g de NaCl e transferidas para um frasco de boca larga e adicionados 125mL de metanol:água (70:30 v/v). Após agitação por 30 minutos em agitador mecânico hori-

zontal, o conteúdo do frasco foi filtrado em papel de filtro e 15 mL da solução desse extrato, obtida a partir da primeira diluição, foi diluído em 30mL de água destilada. Em seguida, 15 mL do extrato filtrado foram transferidos para uma coluna de imunoafinidade a um fluxo de cerca de 1-2 gotas/segundo. Concluída a operação, a coluna foi lavada com 10mL de água destilada a um fluxo de cerca de duas gotas/segundo e eluída com 1,0mL de metanol padrão Cromatografia Líquida de Alta Eficiência CLAE a um fluxo de cerca de uma a duas gotas por segundo. Após a eluição, o extrato foi recolhido e armazenado em temperatura de congelamento até o momento da quantificação.

A AFB<sub>1</sub> presente no extrato metanólico foi separada e quantificada por CLAE, tendo como fase móvel metanol: acetonitrila: ácido fosfórico 0,1% (24:24:52 v/v/v), fluxo de 1,0 mL/minuto, detector de fluorescência (364nm de excitação e 440nm de emissão), coluna Shim-pack VP-ODS C<sub>18</sub> 4,6x250mm de 5 micron (Shimadzu, Japão), volume da amostra injetada de 20mL (AOAC, 2000). O método de quantificação das amostras foi padrão externo utilizando curva de calibração construída por meio do preparo de uma solução trabalho de 1,0µg L<sup>-1</sup> AFB<sub>1</sub> (Sigma-Aldrich, EUA) e soluções com cinco diferentes concentrações do padrão de 5, 10, 15, 20 e 25ng.mL<sup>-1</sup>

O limite de detecção teórico calculado como três vezes o ruído da linha de base, foi de 0,08ng.mL<sup>-1</sup>. O limite de quantificação teórico foi de 0,125ng.mL<sup>-1</sup> a menor concentração da toxina possível de ser confirmada.

Os valores médios dos testes de recuperação das amostras fortificadas em triplicata nas concentrações de 0,2ng.g<sup>-1</sup>, 0,4ng.g<sup>-1</sup> e 1,25ng.g<sup>-1</sup> foram 60,23%, 73,22% e 84,60%, respectivamente, e estão de acordo com a metodologia descrita (AOAC 2000).

Foi utilizada a análise estatística para descrever os padrões gerais da distribuição dos dados de UFC.g<sup>-1</sup> de *Aspergillus* spp, atividade de água e teores de AFB<sub>1</sub> nas amostras das dietas. Foram calculadas as médias, as medianas, desvio padrão e desvio padrão da média, por número de amostras, fazenda e período de coleta de amostras. Preferiu-se a mediana em relação à média como medida de tendência central. Nas amostras individuais e por período foi aplicado o teste de Correlação de Pearson para as variáveis UFC.g<sup>-1</sup> de *Aspergillus* spp., atividade de água e teores de AFB<sub>1</sub>. Para as inferências presença de AFB<sub>1</sub> nos cochos com atividade de água e presença de *Aspergillus* spp foram utilizados os testes não paramétricos qui-quadrado ( $\chi^2$ ), e análise de regressão logística binomial. (Minitab® 15 2010).

## RESULTADOS

Das 288 amostras de dietas analisadas houve predominância de leveduras em relação à população geral de fungos, onde se observou frequências de isolamentos que variaram de 83,97% a 99,98% para as leveduras e de 0,02% a 16,03% para isolamentos de fungos filamentosos. Os principais gêneros de fungos filamentosos isolados foram: *Aspergillus* (20,09%), *Fusarium* (14,16%), *Penicillium* (11,42%), *Rhizopus* (9,31%), *FNE* (6,85%), *Cladosporium* (6,39%), *Absidia* (5,48%), *Mucor* (5,48%), *Emericella* (4,57%), *Monascus* (4,57%), *Alternaria* (3,65%), *Moniliella* (3,65%), *Scopulariopsis* (2,74%), *Eurotium* (0,91%) *Trichoderma* (0,46%), *Geotrichum* (0,46%) e *Acremonium* (0,46%). O número UFC/g variou de 5,28x10<sup>4</sup> a 6,80x10<sup>11</sup> para as leveduras e 3,0x10<sup>2</sup> a 1,73x10<sup>10</sup> para os fungos filamentosos

Dentro do gênero *Aspergillus* as principais espécies isoladas foram: *A. flavus* (79,70%), *A. parasiticus* (12,94%), *A. alutaceus* (7,14%) e *A. nidulans* (0,22%). A espécie *A. flavus*

foi isolada nas amostras das dietas em todas as fazendas avaliadas com contagens entre  $3,0 \times 10^2$  a  $1,6 \times 10^9$  UFC/g<sup>-1</sup>. Não houve diferença significativa entre as fazendas quanto às medianas de contagens de UFC/g<sup>-1</sup> para *Aspergillus*. (P=0,000) pelo intervalo de confiança de 95%.

A atividade de água das amostras das dietas variou de 0,88 a 0,99. As fazendas B e A apresentaram os maiores valores de atividade de água nas amostras das dietas (0,98 e 0,95), respectivamente e foram diferentes das demais fazendas pelo intervalo de confiança de 95%. (Quadro 1). Quando analisada atividade de água das amostras por período de coleta dentro de cada fazenda verificou-se não haver diferença entre eles no intervalo de confiança de 95%. A precipitação pluvial total nas regiões das fazendas variou entre 9,10 a 546,70 mm, as médias da temperatura máxima variaram de 23,47 a 31,76 °C, as médias da temperatura mínima de 10,26 a 19,99 °C e a umidade relativa do ar média ficaram entre 67,10 a 76,60%. (Quadro 1)

No Quadro 2 estão apresentados os dados de contaminação por AFB<sub>1</sub> nas dietas completas ofertadas às vacas em lactação. Das 288 amostras avaliadas 89 (30,90%) apresentaram níveis detectáveis de AFB<sub>1</sub> com teores variando de 1,68 a 194,51 µg.Kg<sup>-1</sup>. A Fazenda H não apresentou níveis detectáveis da micotoxina nas 32 amostras analisadas. As maiores frequências de contaminação foram observadas

**Quadro 1. Atividade de água das amostras e clima nas regiões das fazendas no período de 45 dias, Estado de São Paulo**

Fazendas	Atividade água	Precipitação (mm)	Temperatura máxima °C	Temperatura mínima °C	Umidade relativa ar (%)
A	0,95 <sup>a</sup>	165,00	29,23	15,82	69,50
B	0,98 <sup>a</sup>	438,70	29,79	19,60	75,00
C	0,93 <sup>b</sup>	546,70	31,76	19,99	76,60
D	0,93 <sup>b</sup>	306,31	27,60	19,40	69,18
E	0,92 <sup>b</sup>	190,25	27,52	18,43	67,88
F	0,92 <sup>b</sup>	137,20	25,99	14,89	74,10
G	0,92 <sup>b</sup>	13,40	25,92	11,02	69,90
H	0,91 <sup>b</sup>	31,60	23,47	11,68	67,10
I	0,91 <sup>b</sup>	9,10	23,97	10,26	72,40

Medianas na coluna, seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo IC da Mediana a 95% de confiança.

**Quadro 2. AFB<sub>1</sub> nas amostras das dietas das vacas em lactação nas fazendas, Estado de São Paulo**

Fazendas	Amostras N	n=32%	AFB <sub>1</sub> (µg.Kg <sup>-1</sup> )*		
			Média	Mediana	Varição
A	15	46,84	12,47	9,92 <sup>b</sup>	1,93-43,78
B	12	37,50	6,56	3,41 <sup>b</sup>	2,12-29,26
C	11	34,37	5,62	2,72 <sup>b</sup>	1,82-21,30
D	04	12,50	3,25	2,26 <sup>b</sup>	2,07-6,38
E	24	75,00	33,47	27,30 <sup>a</sup>	2,15-194,51
F	13	40,26	8,02	2,79 <sup>b</sup>	1,72-74,98
G	05	15,62	2,86	3,41 <sup>b</sup>	1,68-3,85
H	ND	ND	ND	ND	ND
I	05	15,62	13,20	4,40 <sup>b</sup>	2,50-37,26
Total	89	30,90	15,69	2,26	1,68-194,51

N = número de amostras positivas, ND = não detectado. Medianas na coluna, seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo IC da Mediana a 95% de confiança. \* MAPA-Portaria MA/SNDA/SFA, 09/11/1988 - LMT aflatoxinas 50µg.kg<sup>-1</sup>.

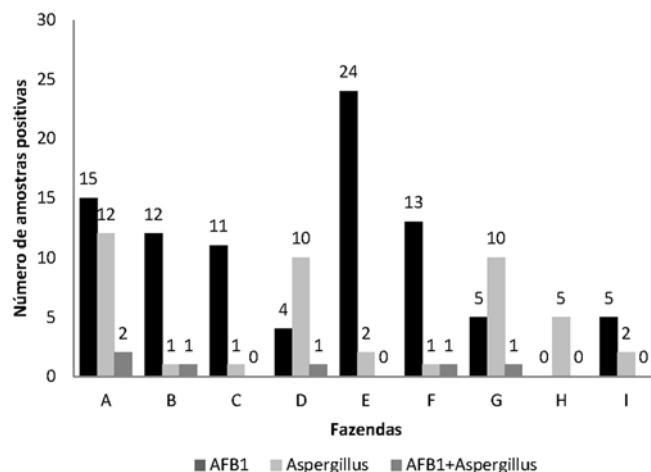


Fig.1. Ocorrência de AFB<sub>1</sub>, *Aspergillus* e AFB<sub>1</sub> associado a *Aspergillus* nas amostras das dietas das vacas em lactação em fazendas no Estado de São Paulo.

nas fazendas E (75,00%), A (46,84%) e F (40,26%). Houve diferença significativa entre as medianas de AFB<sub>1</sub> pelo intervalo de confiança a 95%, a fazenda E apresentou as maiores medianas nas concentrações de AFB<sub>1</sub> nas dietas.

Não foi observada correlação significativa (P>0,05) na análise de correlação de Pearson entre as medianas das variáveis transformadas *Aspergillus* (UFC. g<sup>-1</sup>), medida de atividade de água (Aa) e teores de AFB<sub>1</sub>. Para testar a independência dos teores da micotoxina em relação à ocorrência de isolados de *Aspergillus* foi aplicado o teste de  $\chi^2$ . O teste foi não significativo a 5% de probabilidade ( $\chi^2=1.823$ , DF=1, P=0.177),

A Fig. 1 ilustra as frequências absolutas de amostras de dietas positivas para aflatoxinas e isolamentos de *Aspergillus* sem cada fazenda, o que mostra a ausência de associação entre essas duas variáveis nas amostras das dietas coletadas dos cochos. Há fortes indícios de que os teores de aflatoxinas observados se devem aos efeitos de processos anteriores e não à atividade microbiana presente nessas amostras nos cochos

Para analisar a dependência da AFB<sub>1</sub> positiva em relação à atividade de água (Aa), procedeu-se a regressão logística binomial. A análise revelou que a relação de atividade de água e teor de AFB<sub>1</sub> nas amostras por período foi significativa (P<0,05), mas com valor de R<sup>2</sup> considerado moderado (R<sup>2</sup>=0,565) indicando uma tendência de detecção maior de AFB<sub>1</sub> nas amostras de atividade de água mais baixas.

## DISCUSSÃO

A maior frequência de isolamentos de leveduras nas dietas compostas principalmente por gramíneas conservadas sob a forma de silagem está de acordo com dados de pesquisadores que mostram grandes populações de leveduras em silagens decorrente da exposição ao oxigênio no momento do desabastecimento dos silos ou manejo inadequado durante a confecção. As leveduras são consideradas as principais responsáveis pela deterioração aeróbia de silagens (Amaral 2011). Os silos em cada propriedade estavam abertos e sendo utilizados pelos fazendeiros quando do início

do trabalho experimental, o que pode ter contribuído para os maiores isolamentos de leveduras. As contagens obtidas no presente trabalho foram elevadas e estavam acima das contagens recomendadas pela International Commission Microbiological Specifications for Foods (1980), que estabelece limites entre  $10^2$  a  $10^4$  como tolerados para UFCg<sup>-1</sup> unidades formadoras de colônias por grama de alimentos. Apenas uma fazenda apresentou contagens de UFCg<sup>-1</sup> dentro desse limite, as demais propriedades apresentaram contagens de UFCg<sup>-1</sup> acima de  $10^5$ . As coletas de amostras nessa fazenda foram realizadas nos períodos de menores índices de precipitação pluvial. O aumento da disponibilidade de água no alimento favorece a atividade microbiana, principalmente o crescimento de fungos filamentosos e leveduras Segundo Amaral (2011) contagens de leveduras acima de  $10^5$  em silagens indicam processos de deterioração instalados no sistema de preparo do alimento, que ocorre normalmente no período das chuvas.

Os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* são considerados como os mais importantes fungos toxigênicos isolados em grãos de cereais, oleaginosas e rações (Frisvad et al. 2006). O gênero *Aspergillus* foi o mais prevalente em nosso trabalho. Espécies desse fungo têm afinidade por sementes oleaginosas como o caroço de algodão fornecido nas dietas das vacas e cereais como o milho. Em estudo do perfil da microbiota em grãos de milho recém-colhidos em diferentes regiões do Brasil, Rocha et al. (2009) isolaram *Aspergillus* spp como o segundo gênero em frequência no estado de Mato Grosso (14,0%) e estado da Bahia (12,6%). Outros trabalhos também têm verificado a presença de *Aspergillus* como parte da biota de grãos de milho recém-colhidos no Brasil, sendo superado em termos de frequência de isolamentos pelos fungos *Fusarium* e *Penicillium* (Pozzi et al. 1995, Almeida et al. 2000).

Em nossa pesquisa, os fungos do gênero *Fusarium* apresentaram menores índices de isolamentos quando comparados ao gênero *Aspergillus*. Isso pode ter ocorrido devido aos maiores isolamentos de leveduras nas dietas dos animais, composta de forragem conservada como as silagens de milho (50%). Auerback et al. (1998) verificaram que populações de fungos filamentosos decresceram em silagens de milho ao longo do período de fermentação até 100 dias em condições estritas de anaerobiose. A partir desse dia apenas *Penicillium roqueforti* estava presente, isso porque esporos dessa espécie fúngica mostram-se menos sensíveis aos ácidos orgânicos do que espécies de outros fungos. O crescimento dos bolores em silagem geralmente está restrito às superfícies e laterais do silo e o desenvolvimento dos fungos ocorre em estágio avançado de deterioração, tendo um papel coadjuvante ao das leveduras. As espécies mais frequentemente isoladas pertencem aos gêneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Byssoschlamys*, *Absidia*, *Arthrinium*, *Geotrichum*, *Monascus*, *Scopulariopsis* e *Trichoderma* (Pelhate 1977, Nout et al. 1993).

Várias espécies de *Aspergillus* spp. foram isoladas de culturas de cereais no campo, entretanto as espécies do fungo *Fusarium* spp são as mais encontradas no Brasil quando analisados os isolamentos em grãos de cereais destinados à alimentação animal (Almeida et al. 2002). Considerados

como fungos de campo, os fungos desse gênero invadem os tecidos da planta durante o desenvolvimento, quando os teores de umidade no grão são mais elevados, ao contrário do gênero *Aspergillus* spp., mais tolerantes a conteúdos de umidade mais baixos e considerados fungos de armazenamento. (Christensen & Kaufmann 1965).

Segundo Berjak (1984) os fungos de armazenamento geralmente em número mais baixo superam os de campo logo após o armazenamento, competindo pelos nutrientes presentes no substrato e a mais baixa disponibilidade de água. A tendência de queda na frequência de isolamentos de fungos do gênero *Fusarium* spp. em grãos de milho e sorgo armazenados em galpões durante período de 12 meses e aumento dos isolamentos de fungos do gênero *Aspergillus* spp foi observado por Pozzi et al. (1995) e Silva et al. (2000), respectivamente. Vários estudos realizados com amostras de grãos de milho e sorgo recém colhidos e armazenado no Brasil identificam a espécie *A. flavus* como a mais isolada (Pozzi et al. 1995, Almeida et al. 2000, Rocha et al. 2009, Reis et al. 2010). Em ingredientes de ração destinados a bovinos leiteiros a espécie *A. flavus* foi identificada como a espécie predominante em 58% (n=90) das amostras analisadas, cepas do fungo (20%) foram capazes de produzir AFB<sub>1</sub> *in vitro*.

O teor mais elevado de atividade de água nas amostras de dietas de duas fazendas ocorreu provavelmente pelas colheitas das amostras terem sido realizadas entre os meses de outubro-novembro para a fazenda A e dezembro-janeiro para a fazenda B. Nesses meses ocorreram as maiores precipitações e umidades relativas do ar, ou 165 mm e 438,7mm para precipitação pluvial total e 69,5±24,7% e 75,0±18,9% de umidade relativa do ar nas regiões das fazendas A e B, respectivamente.

A atividade de água das amostras das dietas dentro fazendas não diferiram entre si durante os diferentes períodos de amostragem (P>0,05). Os valores de atividade de água observados nas amostras, teores entre 0,91 a 0,98 permitiram a germinação, esporulação e crescimento dos fungos. Os fungos que colonizam os grãos e plantas antes da colheita necessitam de um mínimo de atividade de água para germinação de 0,85, esporulação 0,90 e crescem em temperaturas de -5°C até 30 a 34°C. Espécies de fungos comuns no armazenamento como *Aspergillus flavus* germinam com atividade de água de 0,72 a 0,80 e crescem dentro de limites mais amplos de temperatura entre -4°C até 30-55°C, sendo que para a produção de aflatoxinas a atividade de água varia de 0,83 a 0,87 (Lacey & Magan 1991). De acordo com Lillejoh et al. (1982) *F. verticilloides* é um forte competidor em relação ao *A. flavus*. Os fungos possuem um antagonismo passivo em que o crescimento é inibido pela competição de espaço e nutrientes essenciais ao desenvolvimento, com vantagem ao microrganismo que estiver em maior número ou maior adaptação ao substrato.

A análise de regressão logística binomial por período revelou uma tendência moderada (R<sup>2</sup>=0,565) de detecção de AFB<sub>1</sub> nas dietas com atividades de água mais baixas, ocorrido nas amostras colhidas nos períodos de ano com as precipitações pluviais e umidade relativas mais baixas. Rocha (2010) detectou aflatoxinas em amostras de grãos

de milho recém colhidos com atividades de água menores (0,82), na região de Várzea Grande (MT), quando comparadas com grãos de milho em Santa Maria (RS) e Nova Odessa (SP), onde os grãos recém colhidos apresentaram maiores atividades de água e baixos teores de aflatoxinas.

O milho é um dos principais produtos agrícolas contaminados pelas aflatoxinas. Gloria et al. 1997 analisaram 292 amostras de grãos de milho recém colhidos e encontram 33,6% contaminadas por aflatoxinas. A análise de 1.263 amostras de grãos de milho e 1.006 amostras de rações de base de milho em vários estados no Brasil, num período de dez anos, revelou a presença das aflatoxinas em quase 50% dos alimentos analisados, com níveis máximos de 14,4 µg.kg<sup>-1</sup> (Santurio *et al.*, 1996). Os altos níveis de contaminação por AFB<sub>1</sub> encontrados nas dietas foram semelhantes aos encontrados por Almeida *et al.*, (2009) que, analisando amostras de milho utilizado na formulação de ração animal, encontraram 10% das amostras contaminadas com teores entre 1 a 5 µg.kg<sup>-1</sup>. Rocha et al. (2009) analisando a co-ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em 200 amostras de grãos de milho recém colhidos em quatro regiões do Brasil (Mato Grosso, Rio Grande do Sul, Bahia e São Paulo) verificaram que 2 a 18% das amostras estavam contaminadas com as aflatoxinas, com índices entre 5.6 a 1.393,0 µg/kg<sup>-1</sup>. Das 21 amostras positivas, 16 (76,2%) estavam acima do limite estabelecido pela legislação do Brasil (20 µg/kg<sup>-1</sup>). A fazenda H foi a única fazenda a não apresentar níveis detectáveis de AFB<sub>1</sub>, apesar do perfil de contaminação por *Aspergillus* spp. ter sido semelhante ao das demais fazendas. Observou-se uma independência do teor de aflatoxinas em relação à ocorrência de isolados de *Aspergillus*. Não há evidências, portanto, de que os teores de aflatoxinas estejam associados à ocorrência de isolados de *Aspergillus*. Há fortes indícios de que os teores de aflatoxinas observados se devem aos efeitos de processos anteriores e não a atividade microbiana presente nas amostras das dietas. Uma possibilidade é a do desaparecimento do fungo e não da toxina, produzida em momentos anteriores ao da amostragem (Pitt & Hocking 1997). Segundo Taniwaki & Silva (2001) a ausência de sinais visíveis do crescimento fúngico não pode ser interpretada como ausência de toxinas, já que essas são capazes de permanecer no alimento mesmo depois que o fungo produtor tenha sido eliminado.

Trabalhos realizados no Brasil com grãos de cereais e oleaginosas indicam a presença de aflatoxinas no campo durante diferentes etapas de crescimento das plantas, e apontam fatores como a temperatura e atividade de água como os principais fatores responsáveis pela produção das micotoxinas (Zorzete et al. 2008, Rocha et al. 2009, Zorzete et al. 2011). AFB<sub>1</sub> foi detectada em 14% das 200 amostras analisadas de grãos de milho recém-colhidos em Santa Maria (RS) com níveis variando entre 13,7 a 1.393 µg.kg<sup>-1</sup>. No Mato Grosso do Sul, 18% das amostras de grãos de milho analisadas estavam contaminadas com AFB<sub>1</sub> com níveis médios de 27,7 µg.kg<sup>-1</sup> (Rocha et al. 2009). A presença AFB<sub>1</sub> em silagens de milho foi verificada por Amaral (2011) durante período de utilização do silo, na época das águas, sendo detectados até 2,25 µg.kg<sup>-1</sup> no início do período chuvoso. As micotoxinas, em geral, não são produtos voláteis e per-

manecem associados à estrutura dos fungos, conídios ou no substrato em que crescem (Fernandes 2004). Estudos diversos têm demonstrado que as aflatoxinas são estáveis e não são destruídas durante a maioria dos procedimentos de processamento de alimentos (Bullerman e Bianchini 2007, Scudamore et al. 2008, Copetti 2009, Alborch et al. 2012). Durante o processo de moagem úmida dos grãos de milho, por sua característica hidrossolúvel, AFB<sub>1</sub> foi detectada principalmente na água de maceração (50%), fibra (28%), glútem (11%), germe (11%) e amido (0,2%). Os fungos produzem micotoxinas em circunstâncias específicas e é parte da estratégia do fungo para se proteger das agressões do meio em situações de estresse. As condições mais favoráveis para o desenvolvimento e proliferação fúngica não são as mais favoráveis para a produção de micotoxinas. Assim, mesmo após a morte dos fungos, as micotoxinas permanecem por longos períodos no substrato (Novinsky 2013) e são carregadas para outros ingredientes ou componentes derivados de processamento industrial (Copetti 2009, Leite 2010).

## CONCLUSÕES

A presença de elevada população de leveduras e fungos filamentosos, elevada atividade de água indicam condição sanitária inadequada da dieta ofertada às vacas em lactação, principalmente nos períodos de maiores precipitações pluviais.

A maioria das fazendas apresentou contagens de UFC/g acima de 10<sup>5</sup>, e a contaminação com AFB<sub>1</sub> com elevados teores indicam falhas de manejo e logística de abastecimento e silos e de controle de qualidade dos ingredientes adquiridos e preparados nas fazendas.

**Agradecimentos.**- À FAPESP pelo suporte financeiro (Proc. 2008/05428-0).

## REFERÊNCIAS

- Alborch L., Bragulat M.P., Castellá G., Allbarca M.L. & Cabañes F.J. 2012. Mycobiota and mycotoxin contamination of maize flours and popcorn kernels for human consumption commercialized in Spain. *Food Microbiol.* 32:97-103.
- Almeida A.P., Corrêa B., Mallozzi M.A.B., Sawazaki E. & Valente Soares L.M. 2000. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. *Braz. J. Microbiol.* 31:321-326.
- Almeida A.P., Fonseca H., Fancelli A.L., Direito G.M., Ortega E.M. & Correia B. 2002. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. *J. Agri. Food Chem.* 50:3877-3882.
- Amaral R.C. 2011. Estratégias de controle da deterioração aeróbica em silagem de milho e seu valor alimentício para vacas em lactação. Tese de Doutorado em Ciências Agrárias, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. 173p.
- AOAC 2000. Aflatoxins in corn, raw peanuts and peanut butter: immunoaffinity column (aflatest) Method. Association of Official Analytical Chemists International, Washington, DC, p.49.2.18
- Auerback H., Oldenburg E. & Weissbach F. 1998. Incidence of *Penicillium roqueforti* and roquefortine C in silages. *J. Sci. Food Agric.* 76:565-572.
- Berjak P. 1984. Report of seed storage committee working group on the effects of storage fungi on seed viability, 1980-1983. *Seed Sci. Technol.* 12:233-253.
- Brasil 2010. Instrução Normativa no. 8. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, publicada no Diário Oficial da União de 29/04/2010.

- Brasil 2002. Instrução Normativa no. 51. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, publicada no Diário Oficial da União em 18/09/2002.
- Bullerman L.B. & Bianchini A. 2007. Stability of mycotoxins during food processing. *Int. J. Food Microbiol.* 119:140-146.
- Busta F.F., Peterson E.A. & Addam D.M. 1984. Colony count methods, p. 62-83. In: Speck M.L. (Ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 2nd ed. American Public Association Health, Washington, DC.
- Christensen C.M. & Kaufmann H.H. 1965. Deterioration of stored grains by fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 3:69-84.
- Copetti M.V. 2009. Micobiota do cacau: fungos e micotoxinas do cacau ao chocolate. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.155p.
- Fernandes F.C. 2004. Micotoxinas: risco biológico para trabalhadores em aviários. *Revta Bras. Med. Vet.* 2:200-208
- Frisvad J.C., Nielsen K.F. & Samson R.A. 2006. Recommendations concerning the chronic problem of misidentification of mycotoxigenic fungi associated with foods and feeds. *Adv. Exp. Med. Biol.* 571:33-46.
- Gloria E.M., Fonseca H. & Souza I.M. 1997. Occurrence of mycotoxins in maize delivered to the food industry in Brasil. *Trop. Sci.* 37:107-110.
- Lacey J. & Magan N. 1991. Fungi in cereal grain: their occurrence and water and temperature relations, p.77-118 In: Chelkoski J. (Ed.), *Cereal Grain: mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. Elsevier Science, Amsterdam.
- Leite C.C. 2010. Perfil de solutos e micotoxinas na água do cultivo e beneficiamento do arroz. Dissertação de Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS. 87p.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods 1980. *Microbiological Ecology of Foods*. Academic Press, New York. 914p.
- Minitab. 2010. Minitab 15 statistical software. Minitab Inc., State College.
- Nelson P.E., Touson T.A. & Marasas W.F.O. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. University Press, Pennsylvania.193p.
- Nout M.J.R., Bouwmeester H.M., Haaksme J. & Van Dijk H. 1993. Fungal growth in silages of sugar beet press pulp and maize. *J. Agric. Sci.* 121: 323-326.
- Novinsky C.O. 2013. Composição de micotoxinas e bromatologia de silagens de milho em silos de grande porte utilizando imagens de infravermelho. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Faculdade de Ciências Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 85p.
- Pel hate J. 1977. Maize silage: incidence of moulds during conservation. *Folia Vet.* 7:1-16.
- Pitt J.I. & Hocking A.D. 1997 *Fungi and Food Spoilage*. 2<sup>nd</sup> ed. Aspen Publishers Inc., Maryland. 593p.
- Pozzi C.R., Correa B., Gambale W., Paula C.R., Chacon-Reche N.O., Meirelles M.C.A. & Correa B. 1995. Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotics factors and mycotoxins occurrence. *Food Addit. Contam.* 12:313-319.
- Oveisi M.R., Jannat B., Sadeghi N., Hajimahmoodi M. & Nikzad A. 2007. Presence of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and infant milk products in Tehran, Iran. *Food Control* 18:1216-1218.
- Raper K.B. & Fennell D.I. 1965. *The Genus Aspergillus*. Williams and Williams, Baltimore. 686p.
- Reis T.A., Zorzete P., Pozzi C.R., Silva V.N., Ortega E. & Correa B. 2010. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian sorghum from sowing to harvest *J. Sci. Food Agric.* 90:1445-1451.
- Rocha L.O., Nakai V.K., Braghini R., Reis T.A., Kobashigawa E. & Correa B. 2009. Co-occurrence of fumonisin and aflatoxins in freshly harvested corn in different regions of Brazil. *Int. J. Mol. Sci.* 10:5090-5103.
- Rocha L.O. 2010. Distribuição de fungos e micotoxinas em grãos de milho recém-colhidos e variabilidade genética das cepas de *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus flavus* isoladas. Doutorado em Ciências, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 174p.
- Rodríguez-Amaya D.B. & Sabino M. 2002. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. *Braz. J. Microbiol.* 33:1-11.
- Romer T. 1984. Detecting mycotoxins in corn and corn-milling products. *Feedstuffs* 56:22-23.
- Santúrio J.M., Mallmann C.A., Baldissera M.A., Almeida C.A.A., Possobon M.C. & Scheineder L.G. 1996. Qualidade micotoxicológica do milho, sorgo e rações produzidos no Brasil. *Anais XXI Congresso Nacional de Milho e Sorgo*, Embrapa, Londrina, SC, p.132. (Resumo)
- Scudamore K.A., Guy R.C.E., Kellehan B. & MacDonald S.J. 2008. Fate of the *Fusarium mycotoxins*, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone during extrusion of whole meal wheat grain. *Food Addit. Contam.* 25: 331-337.
- Silva J.B., Pozzi C.R., Malozzi M.A.B., Ortega E. & Correa B. 2000. Mycoflora and occurrence of aflatoxin B<sub>1</sub> and fumonisin B<sub>1</sub> during storage of Brazilian sorghum. *J. Agric. Food Chem.* 48:4352-4356.
- Tanikawi M.H. & Silva N. 2001. Fungos em alimentos: ocorrência e detecção. Núcleo de Microbiologia do ITAL, Campinas. 82p.
- Zeringue J.R., Bhatnagar D. & Cleveland T.E. 1993. C15H24 volatile compounds unique to aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2264-2270.
- Zorzete P., Castro R.S., Pozzi C.R., Israel A.L., Fonseca F., Yanaguibashi G. & Correa B. 2008. Relative populations and toxin production by *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* in artificially inoculated corn at various stages of development under field conditions. *J. Sci. Food Agric.* 88:48-55.
- Zorzete P., Reis T.A., Felício J.D., Baquião A.C., Makimoto P. & Correa B. 2011. Fungi, mycotoxins and phytoalexin in peanut varieties during plant growth in the field. *Food Chem.* 129:957-964.