

MILHO

Grupo Operacional QUALIMILHO

NOVAS ESTRATÉGIAS DE INTEGRAÇÃO SUSTENTÁVEIS QUE GARANTAM A QUALIDADE E SEGURANÇA NA FILEIRA DO MILHO NACIONAL

Carla Moita Brites,

Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV)

O Grupo Operacional QUALIMILHO é uma parceria da ANPROMIS e da AGROMAIS com o Instituto Nacional de Investigação Agrária (INIAV), o Instituto de Soldadura e Qualidade (ISQ) e cinco agricultores da região da Golegã, com o propósito de identificar os fungos potencialmente produtores de micotoxinas, desenvolver soluções que limitem a presença desses fungos e, em paralelo, implementar um sistema de monitorização de temperatura e teor de humidade, em todas as fases da cadeia de produção do milho.

AS MICOTOXINAS E O SEU IMPACTO

As micotoxinas são metabolitos secundários tóxicos produzidos por fungos que pertencem na sua maioria aos géneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

Segundo a FAO, 25% da produção mundial de *commodities* agrícolas estão contaminadas com micotoxi-

nas. A presença das micotoxinas é um problema de grande complexidade e gravidade à escala global e que afeta toda a cadeia de valor do milho, pela elevada probabilidade de ocorrência e pelo efeito direto sobre a segurança dos alimentos.

Para que exista contaminação por micotoxinas é indispensável a contaminação fúngica prévia, que ocorre

no campo e também após a colheita, principalmente durante o armazenamento do milho. Devido às condições propícias e específicas para o desenvolvimento das diferentes espécies de fungos produtoras de micotoxinas, as fumonisinas, zearalenona (ZEA) e desoxinivalenol (DON) surgem principalmente no campo e as aflatoxinas e a ocratoxina A (OTA) durante o armazenamento (**ver Tabela 1**).

TIPO DE MICOTOXINA	ESPÉCIES DE FUNGOS PRODUTORES (A.- <i>Aspergillus</i> ; F.- <i>Fusarium</i>)	PRINCIPAL OCORRÊNCIA
Aflatoxinas	<i>A. flavus</i> ; <i>A. parasiticus</i>	Armazenamento
Ocratoxina A (OTA)	<i>A. Ochraceus</i> ; <i>A. Carbonarius</i> ; <i>Penicillium Verrucosum</i>	Armazenamento
Desoxinivalenol (DON)	<i>F. culmorum</i> ; <i>F. graminearum</i>	Campo
Zearalenona (ZEA)	<i>F. culmorum</i> ; <i>F. graminearum</i>	Campo
Fumonisin	<i>F. veticiilioides</i> ; <i>F. proliferatum</i> ; <i>F. moniliforme</i>	Campo

Tabela 1: Tipos de micotoxinas mais frequentes no milho, espécies de fungos produtores e sua principal ocorrência.



Figura 1: Plano de ação do grupo operacional QUALIMILHO.

PLANO DE AÇÃO DO QUALIMILHO

A estratégia de prevenção e redução das micotoxinas é complexa e o plano de ação do QUALIMILHO envolve atividades aplicadas no campo e após a colheita do milho (ver Figura 1).

A utilização de boas práticas de gestão no campo, nomeadamente a escolha adequada da cultura precedente, o conveniente tratamento dos resíduos, a redução dos fungos patogénicos no solo, a escolha da variedade de acordo com as classes de risco, a proteção da cultura ao ataque de insetos e a antecipação da colheita são possíveis ações para reduzir os desafios associados à contaminação do milho por micotoxinas.

Após a colheita, as ocorrências de micotoxinas dependem das condições de humidade e temperatura, daí que, deve evitar-se a pré-armazenagem de grão húmido e a secagem deve ser conduzida de modo a não danificar a estrutura do grão. As condições de temperatura, ventilação e duração da secagem são fatores muito relevantes para a qualidade porque os grãos partidos ficam mais vulneráveis ao ataque de insetos que são vetores de fungos produtores de micotoxinas.

O grão deve ser convenientemente limpo antes de armazenado e durante o armazenamento é essencial controlar a temperatura e humidade, e a circulação do grão poderá vir a ser necessária para garantir a estabilidade sanitária.

Entre 2017 e 2021 as atividades desenvolvidas pelo QUALIMILHO compreenderam várias fases: desde a implementação e validação de metodologias para quantificação das micotoxinas, a caracterização da colheita e pré-colheita, o controle e mitigação, até ao desenvolvimento de um sistema de apoio à decisão para garantir a qualidade e segurança na fileira do milho nacional.

METODOLOGIAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DAS MICOTOXINAS

De acordo com o Regulamento (CE) n.º 1831/2003 consolidado com n.º 1126/2007, o milho para ser classificado para a alimentação humana tem como limites máximos de 4000 µg/kg para as fumonisinas, 1750 µg/kg para DON, 5 µg/kg para aflatoxina B1, 10 µg/kg para aflatoxinas totais, 5 µg/kg para OTA e 350 µg/kg para ZEA.

A análise das micotoxinas é muito sensível, a maioria dos métodos contempla etapas de preparação da amostra em que a matriz complexa é homogeneizada e as micotoxinas são solubilizadas. Para a quantificação das micotoxinas existem métodos de referência que são sistemas cromatográficos de elevada resolução com diferentes tipos de deteção acoplados a detetor de massa (LC-MS/MS).

No âmbito do QUALIMILHO, o INIAV implementou e validou o método de referência por cromatografia líquida de elevada resolução, acoplada a detetor de massa com analisador por tempo de voo (UHPLC-ToF-MS) para quantificar em simultâneo as aflatoxinas B1, B2, G1, G2, OTA, T2, ZEA e fumonisinas B1 (FB1) e B2 (FB2). Paralelamente, implementou também um outro método rápido, de rastreio por imunoensaio com limites de deteção inferiores ao UHPLC-ToF-MS mas que foi validado satisfatoriamente para despiste de amostras positivas para as fumonisinas totais (B1+B2), OTA, Aflatoxinas (G1+G2), DON, T2, Aflatoxina B1 e ZEA. Este método de rastreio quantifica as fumonisinas totais, contudo, não permite a discriminação das FB1 e FB2.



ID: 93055344

31-05-2021

A distribuição das micotoxinas nos grãos de milho é muito heterogênea, as concentrações estipuladas para os limites máximos são muito baixas, expressos em partes por bilhão (ppb ou µg/kg). Uma amostra correspondente a uma única espiga contaminada atinge valores muito superiores aos limites máximos estipulados na legislação (**ver Figura 2**). Portanto, para que se possa controlar e garantir a precisão e a reprodutibilidade dos resultados analíticos, importa também implementar um plano de amostragem representativo e eficaz.

O plano de amostragem adotado pelo QUALIMILHO considerou a retirada aleatória de várias porções incrementais de grão que foram misturados, por forma a obter uma amostra agregada ou global de, pelo menos, 5 kg que foi homogeneizado por trituração. A homogeneização por trituração significa que toda a amostra global foi moída e a farinha passou por um crivo de 1 mm. Depois da moenda, o moinho foi limpo para evitar contaminações cruzadas. As análises das micotoxinas realizaram-se em três porções (repetições) de 50g retiradas aleatoriamente da farinha completamente homogeneizada.

CARACTERIZAÇÃO DA COLHEITA E PRÉ-COLHEITA

Nas colheitas de 2018, 2019 e 2020 e num conjunto significativo de amostras representativas das explorações do

Figura 2: Espigas de milho que revelam sintomatologia de contaminação com *Fusarium* e cuja totalidade do grão moído e homogeneizado conduziu a amostras com totais de fumonisinas >4000 µg/kg.



Vale do Tejo, foram realizadas análises para despistar todas as micotoxinas validadas. Em todas as amostras analisadas, apenas foram detetadas fumonisinas em níveis variáveis e abaixo dos limites legais, sendo a FB1 a micotoxina predominante.

Na colheita de 2019 e em oito ensaios com diferentes tratamentos realizados em três explorações do Vale do Tejo, as micotoxinas foram monitorizadas numa amostragem de 25 espigas recolhidas diretamente no campo e em três períodos que antecederam a colheita. As espigas foram recolhidas na maturidade fisiológica, dez e 20 dias após a primeira colheita e os valores mais altos de fumonisinas (>1000 µg/kg) foram obtidos nas 2ª e 3ª datas para o ensaio que não foi tratado (**ver Figura 3**). O grão proveniente do ensaio em que foi aplicado azoto foi aquele que revelou os valores mais baixos de fumonisinas. Os maiores níveis de

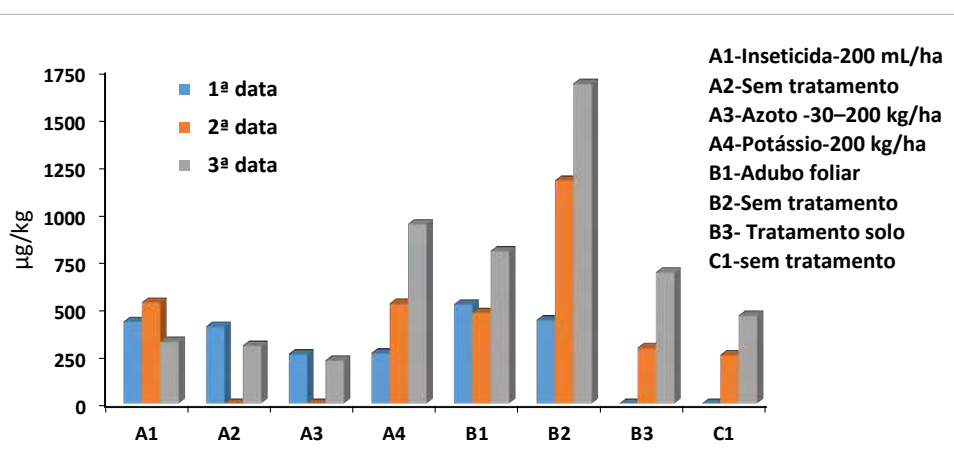
fumonisinas foram obtidos no grão proveniente da 3ª data e esses resultados evidenciam que há um maior risco de contaminação em colheitas tardias.

CONTROLE E MITIGAÇÃO DAS FUMONISINAS

As fumonisinas foram identificadas como sendo as micotoxinas com origem no campo mais relevantes no milho recolhido nas explorações do Vale do Tejo e esses resultados orientaram o plano de ação para a caracterização das diferentes espécies de *Fusarium*.

Outra atividade do QUALIMILHO foi a avaliação da evolução do grão armazenado, tanto ao nível das espécies de *Fusarium* presentes como da quantificação das micotoxinas. As

Figura 3: Total de fumonisinas (FB1+FB2) no milho recolhido em oito ensaios conduzidos em explorações da região do Vale do Tejo (A, B, C) recolhidas na maturidade fisiológica (1ª data), após dez dias (2ª data) a após 20 dias (3ª data).





ID: 93055344

31-05-2021

avaliações realizaram-se durante seis meses de armazenamento do grão em barricas monitorizadas com sondas de temperatura, humidade relativa e CO₂. O *Fusarium verticillioides* foi a espécie predominante em três períodos de monitorização, foram identificadas apenas fumonisinas com maior incidência da FB1 (4:1). Os níveis de fumonisinas aumentaram durante o período de armazenamento em cerca de 20 a 40% (ver Figura 4). A par do aumento de fumonisinas também aumentaram os valores de humidade relativa, temperatura e CO₂ monitorizados. ■

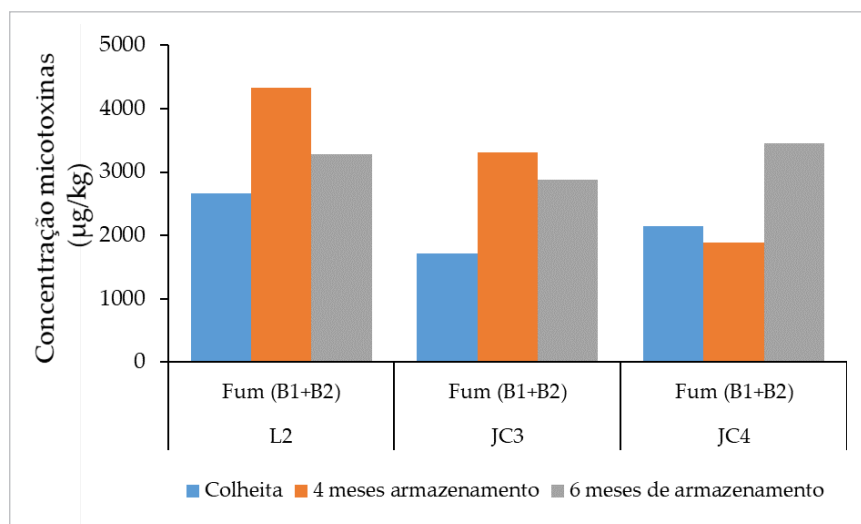


Figura 4: Total de fumonisinas no milho proveniente de três ensaios e de duas explorações do Vale do Tejo determinadas na altura da colheita, após quatro e seis meses de armazenamento em barricas.

CONCLUSÕES DO QUALMILHO



1

Sensores para monitorizar humidade, temperatura e CO₂ são ferramentas úteis para alertar o incremento da atividade fúngica e acumulação de micotoxinas durante o armazenamento

2

F. verticillioides predomina e as fumonisinas são as principais micotoxinas presentes no milho analisado

3

A antecipação da colheita diminui o risco de aparecimento das fumonisinas

TRABALHOS PUBLICADOS

- Brites C, Sanches Silva A, Freitas A, Barbosa J (2019). Micotoxinas no milho e seu controle. *Vida Rural* n° 1848, 34-36.
- Carbas B, Soares A, Freitas A, Silva AS, Pinto T, Andrade E, Brites C. Mycotoxin Incidence in Pre-Harvest Maize Grains. *Proceedings*. 2021; 70(1):24. https://doi.org/10.3390/foods_2020-07667
- Carbas B, Simões D, Soares A, Freitas A, Ferreira B, Carvalho ARF, Silva AS, Pinto T, Diogo E, Andrade E, Brites C. Occurrence of *Fusarium spp.* in Maize Grain Harvested in Portugal and Accumulation of Related Mycotoxins during Storage. *Foods*. 2021; 10(2):375. <https://doi.org/10.3390/foods10020375>
- Freitas A, Barros S, Brites C, Barbosa J, Silva AS (2019). Validation of a Biochip Chemiluminescent Immunoassay for Multi-Mycotoxins Screening in Maize (*Zea mays* L.). *Food Analytical Methods*. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01625-1>
- Silva AS, Brites C, Vila Pouca A, Barbosa J, Freitas A (2019). UHPLC-ToF-MS method for determination of multi-mycotoxins in maize: Development and validation. *Current Research in Food Science* 1:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2019.07.001>
- Silva AS, Freitas A, Soares A, Pinto T, Barbosa J, Brites C (2019). New insights for mycotoxin mitigation in the maize chain. 1º Simpósio INIAV para Segurança Alimentar, Vila do Conde, 28 Nov 2019.
- Simões D, Andrade E, Brites C, Diogo E (2019). Detection of *Fusarium* species producers of fumonisins in maize grains in Portugal. 18th Congress of European Mycologists, Varsóvia, Polónia, 16-21 de Set 2019.

EQUIPA PARTICIPANTE



Tiago Pinto - Manuela Varela



Susana Covao



Carlos Silva
Nuno Tomé



instituto de soldadura
e qualidade

António Dias - Alexandre Carvalho
Bruno Ferreira - João Ribau
Mário Lopes - Pedro Miranda
Ricardo Coimbra - Sílvia Vara



Instituto Nacional de
Investigação Agrária e
Veterinária, I.P.

Ana Sanches - Andreia Freitas
Andreia Soares - Carla Brites
Bruna Carbas - Daniela Simões
Eugénia Andrade - Eugénio Diogo
João Fernandes - Jorge Barbosa
José Semedo