Avaliação físico-química e quantificação de micotoxinas em silagens de resíduo de cervejaria do estado do Rio de Janeiro

Leonardo de Assunção Pinto¹, Wagner Ladeira², Marcos Aronovich³, Victor Moebus Farias⁴,
Felipe Braz Nielsen Köpcke⁵, Luiz Antonio Moura Keller⁶

Resumo

A ensilagem é uma prática comum para preservar forragens no Brasil, porém, condições inadequadas de armazenamento podem levar a contaminação por fungos com produção de micotoxinas. As análises deste trabalho foram realizadas nos laboratórios do Centro Estadual de Pesquisa de Alimentos (CEPQA) na PESAGRO-RJ com objetivo de avaliar os parâmetros físico-químicos das silagens, identificar sua micobiota e quantificar Aflatoxinas Totais (AFs), Ocratoxina A (OTA), Fumonisin B1 (FB1) e Zearalenona (ZEA) possivelmente presentes nas amostras, utilizando fluorímetro de imunoafinidade e cromatografia (IAC). Foram aplicados três tratamentos (1 – Resíduo in natural; 2 – Inoculante comercial; 3 – Inoculante produzido no CEPQA), não sendo observadas diferenças significativas nos padrões físico-químicos entre a fermentação natural e utilizando inoculantes microbiológicos. Quanto a carga microbiana, todas as amostras se encontram acima das regulamentações nacionais e internacionais ($\geq 10^4$ UFC/g⁻¹). Os níveis de AFs não diferiram, com intervalo de 4,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em amostras pré e pós-fermentação, respectivamente, enquanto os níveis de FB1 e ZEA encontrados em amostras de pré-fermentação foram maiores do que na pós-fermentação com intervalo de 0,3 ng kg^{-1} a 2,0 ng kg^{-1} , mas sem diferir estaticamente. Há também níveis de toxinas e índices de contaminação fúngica não preconizados pela legislação vigente. A aplicação de produtos microbiológicos oferece uma boa opção para ensilamento desde que seja realizado monitoramento contínuo para garantir inocuidade, sendo ainda necessária uma legislação atualizada e ações de treinamento dos técnicos de campo.

Palavras-chave: Aflatoxina; fumonisina; zearalenona; silagem de resíduo de cervejaria.

Introdução

Um dos principais problemas encontrados na criação de bovinos é o alto valor das rações e insumos, bem como os longos períodos de seca, quando a quantidade e qualidade das pastagens diminuem acentuadamente, reduzindo ou inviabilizando a produção de leite em escala comercial.

A produção de silagem é uma das técnicas mais viáveis e utilizadas pelos produtores na tentativa de fornecer alimento durante os períodos críticos do ano (CARDOSO, 1995). A ensilagem é um método de conservação de forragens de forma a preservar o conteúdo de matéria seca (MS) e o seu valor nutricional. Esta pode favorecer o crescimento de vários tipos de micro-organismos, sendo que a maioria pode reduzir o valor nutricional do alimento, quando produzida de maneira inadequada (DOS SANTOS et al., 2013). Apesar dos ganhos nutricionais para o rebanho, problemas relacionados no processamento, armazenamento e fornecimento aos animais, podem vir a prejudicar o desempenho dos animais.

Manter o ambiente em anaerobiose durante a fase de fermentação e armazenamento, bem como a estabilidade aeróbia durante a

fase de fornecimento no cocho, se torna imprescindível para a preservação da qualidade microbiológica e do valor nutricional do material ensilado. Os efeitos do uso de inoculantes bacterianos sobre a estabilidade aeróbia de silagens podem vir a solucionar parte destes problemas.

Inoculantes à base de bactérias produtoras de ácido láctico tem sido empregados com resultados satisfatórios, dando retorno econômico aos produtores através de uma melhor produtividade e qualidade no material ensilado. Dessa forma, entende-se que, para manter a boa qualidade de alimentos ensilados, são necessárias medidas adequadas, a fim de se evitar problemas à saúde animal, assim como perdas econômicas.

A fim de minimizar os custos, sem comprometer a produtividade do rebanho, a utilização de subprodutos agroindustriais vem se tornando uma prática constante nas ensilagens em muitas propriedades. A cevada é usada em bebidas fermentadas e, embora seus maiores atrativos sejam seus valores de proteína e amido, capazes de gerar alta energia metabólica, seu bagaço tem proporcionado aumento de 30% na produção ao ser incluído na alimentação de vacas leiteiras (Abreu et al., 2004).

*Graduando em Farmácia – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal Fluminense – Niterói, RJ. Bolsista de Iniciação Científica pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) - E-mail: leonardoap@id.uff.br

**Pós-graduação em Zootecnia – Instituto de Zootecnia – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Seropédica, RJ.

***Pesquisador da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RJ) – Niterói, RJ.

****Doutorando do curso de Higiene Veterinária e Tecnologia de Produtos de Origem Animal – Faculdade de Veterinária - Universidade Federal Fluminense – Niterói, RJ. Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*****Graduando em Farmácia – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal Fluminense – Niterói, RJ. Bolsista de Iniciação Científica pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da UFF (PIBIC-UFF).

*****Departamento de Zootecnia e Desenvolvimento Agrossocioambiental Sustentável - Faculdade de veterinária - Universidade Federal Fluminense – Niterói, RJ.

Tendo em vista esses fatores, objetiva-se avaliar os padrões e parâmetros físico-químicos das silagens de cevada preparadas, bem como analisar a micobiota, isolando e identificando espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, potencialmente produtoras de micotoxinas, e quantificar Aflatoxinas Totais (AFs), Ocratoxina A (OTA), Fumonisin B1 (FB1) e Zearalenona (ZEA) que possam estar presentes nas amostras, através de técnicas cromatográficas.

Material e Métodos

A confecção dos silos ocorreu nos laboratórios da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO) e Universidade Federal Fluminense. Como micro-organismos inoculantes foram utilizadas duas cepas isoladas de silagens de milho. Estas cepas foram trabalhadas para desenvolvimento de potencial de biofermentação e probiótico (*L. rhamnosus* - RC007 e *L. plantarum* - RC009). As cepas referência encontram-se depositadas na coleção National University of Rio Cuarto, Cordoba, Argentina. Além disso, foram utilizados três inoculantes utilizados pelo mercado, testando sua viabilidade em comparação a micro-organismos selecionados a campo.

O material para confecção da silagem foi coletado pós-processamento em cervejarias parceiras. O material foi espalhado sobre uma lona plástica e o inoculante aplicado conforme indicações do produto comercial, por meio de borrifador manual, utilizando água não clorada e retirando amostras para análise da concentração inicial do inoculante. Após a aplicação do inoculante e sua homogeneização, o material foi ensilado em silos confeccionados com tubos de PVC de 0,5 metros de comprimento e 100 mm de diâmetro sendo fechados com tampas providas de válvula para eliminação dos gases. Os silos experimentais foram armazenados em temperatura ambiente e abertos com 2, 7, 30, 60 e 90 dias para as análises de cor e retirada de material danificado por presença de fungos. O restante do material foi quantificado e homogeneizado para retirada de amostras para as análises pertinentes.

O experimento foi elaborado com cinco produtos usando dosagens comerciais recomendadas para atingir a concentração de 1×10^8 UFC/g de produto e avaliadas em todo o processo com relação a UFC/g e células viáveis. Os produtos foram codificados e identificados como Produto A: RC 007; Produto B: RC 009; Produto C: Inoculante comercial A; Produto D: Inoculante comercial B; Produto E: Inoculante comercial C. Usando esses produtos foram feitos 6 tratamentos incluindo o grupo controle, assim, Tratamento 1: controle (sem uso de inoculante); Tratamento 2: Produto A; Tratamento 3: Produto B; Tratamento 4: Produto C; Tratamento 5: Produto D; Tratamento 6: Produto E.

O estudo foi feito com cinco tempos de fermentação e quatro repetições para cada um dos produtos, totalizando 100 silos.

Após homogeneização e descarte do material das extremidades dos silos, foram retiradas amostras de 500 gramas. Parte destas amostras foi processada para as análises físicas e de micobiota enquanto outra parte foi mantida a -5°C até o momento das análises micotoxológicas.

As análises de controle de qualidade físico-químico incluíam: Matéria seca em estufa de circulação forçada de ar à $105^\circ\text{C}/24$ h; proteína Bruta por método de Micro Kjeldahl; pH em potenciômetro; temperatura utilizando termômetro de penetração; atividade Aquosa (Aw); fibra em detergente neutro e em detergente ácido, ambos em determinador (Velp); lignina pelo método de permanganato; nitrogênio amoniacal como percentual do nitrogênio total; Digestibilidade "in vitro" pelo método de Tille Terry (AOAC, 1990).

Em sequência, eram quantificados os fungos em unidades formadoras de colônias por grama (ufc g⁻¹) segundo a metodologia de diluição decimal seriada em placas (PITT; HOCKING, 1997) usando como meios de cultivo: Ágar Dicloran Glicerol (DG18) para fungos xerófilos (PITT; HOCKING 1997); meio Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol Ágar (DRBC) para número total de fungos e Nash-Snyder Ágar (NSA) para fungos do gênero *Fusarium* (NELSON et al., 1983).

A identificação de gênero de todas as colônias fúngicas foi realizada seguindo características macro e microscópicas (Samson et al., 2000). As colônias de *Aspergillus* e *Penicillium* sofreram subcultivo em meio CYA e em tubos inclinados MEA, além de CY20S para *Aspergillus* spp. e G25N para *Penicillium* spp. As colônias de *Fusarium* utilizaram Ágar Folha de Bananeira (BLA) e, em tubo inclinado, Ágar Batata Dextrose (BDA), para uma posterior diferenciação de espécies.

A identificação de espécies foi segundo as chaves taxonômicas de cada grupo: Klich (2002) para o gênero *Aspergillus*, Pitt; Hocking (1997) para o gênero *Penicillium* e Nelson; Toussoun; Marasas (1983) para espécies pertencentes ao gênero *Fusarium*.

A descoberta e quantificação de Aflatoxinas Totais (AFs), Ocratoxina A (OTA), Fumonisin B1 (FB1) e Zearalenona (ZEA) foi usando purificação em colunas de imunoafinidade específicas, com triagem em fluorímetro modelo VICAM® série 4ex segundo metodologia do manual de métodos oficiais de análises da AOAC (1990). O extrato obtido foi evaporado até secar e, para purificação, se utilizou colunas de imunoafinidade para purificação e posterior detecção em HPLC, sistema JASCO® modelo LC 2000, munido com detector de fluorescência e coluna de sílica C18, modelo SUPELCO®.

A análise estatística dos dados foi feita por análise de variância (ANOVA) na transformação dos dados em escala logarítmica e foi aplicado o teste de Tukey para comparar as médias de cada tratamento avaliado, além de comparar os níveis microbiológicos e de micotoxinas nos diferentes tratamentos ensilados (Statistica for Windows 5.0 SAS System for Windows®).

Resultados e Discussão

Os valores observados na tabela 1 indicam heterogeneidade do material ressaltando a necessidade de avaliação contínua para atender os padrões. Em análise preliminar podemos estimar a possível ocorrência de contaminação fúngica prejudicial ao uso e processamento de grãos e ao uso da ração (KELLER et al., 2012), mesmo que a média indique uma qualidade nutritiva satisfatória para os produtos analisados.

Tabela 1: Parâmetros das análises físico-químicas das amostras de silagem

Amostras Silagem	Matéria seca ¹	Proteína ²	Cinzas ³	Lipídeos ⁴	Fibras ⁵
Valores de Média Mínimos	39,44% ± 0,73%	13,48% ± 0,26%	0,78% ± 0,09%	8,1% ± 0,6%	18,48% ± 0,26%
Valores Máximos	27,60% ± 0,53%	2,81% ± 0,26%	0,58% ± 0,09%	2,2% ± 0,6%	8,81% ± 0,26%
Valores	50,45% ± 0,72%	17,85% ± 0,26%	0,9% ± 0,09%	11,0% ± 0,6%	27,85% ± 0,26%

1. Matéria Seca; 2. Protéina Bruta Total; 3. Sais minerais residuais; 4. Teor de Lipídeos Totais; 5. Teor de Fibras Digeríveis em Detergente Neutro

Considerando todas as amostras analisadas, foram isoladas e identificadas 35 cepas na micobiota (tabela 2) com predominância de fungos filamentosos. Foram identificados *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, e *Curvularia*, sendo espécies potencialmente produtoras de micotoxinas, as do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

Tabela 2: Frequência (%) de gêneros de fungos nas amostras de silagem analisadas

Gênero fúngico	Quantidade em UFC. g ⁻¹	Frequência (%)
<i>Aspergillus sp.</i>	16	45,7
<i>Penicillium sp.</i>	3	8,6
<i>Cladosporium sp.</i>	3	8,6
<i>Mucor sp.</i>	2	5,7
<i>Fusarium sp.</i>	6	17,1
<i>Curvularia sp.</i>	2	5,7
<i>Alternaria sp.</i>	3	8,6
Total	35	100,0

É extremamente importante ressaltar que a carga fúngica de todas as amostras estava acima de recomendações e regulamentações nacionais e internacionais (≥10⁴ UFC/g⁻¹) (BRASIL, 1988; GMP, 2008), podendo causar danos aos animais. Os efeitos geralmente se apresentam como infecções crônicas e não tem sintomas clínicos específicos.

O meio DG18 é um meio de cultura recomendado para amostras com baixa aw permitindo o crescimento de fungos xerófilos, aqueles que suportam baixa aw, sem reduzir ou limitar seu crescimento. Todas as amostras analisadas apresentaram contagens média a altas neste meio, demonstrando a possibilidade de risco a saúde, já que entre os xerófilos estão incluídos dois dos principais gêneros toxígenos, *Aspergillus* e *Penicillium*.

Do gênero *Aspergillus* foram identificadas as respectivas espécies: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. oryzae*, *A. fumigatus*, *A. niger* agregado. Do gênero *Penicillium*, *P. citrinum*. Do gênero *Fusarium*, *F. verticillioides* e *F. chlamydosporum*. Não foi constatada diferença estatística significativa (P≥0,005) entre as amostras em relação os produtos testados.

As micotoxinas foram extraídas das amostras e a triagem das micotoxinas com o uso do fluorímetro revelou uma boa relação na avaliação dos dados com os níveis quantificados por HPLC. Os dados obtidos em HPLC considerando apenas a quantificação média entre todas as amostras antes e depois da fermentação estão dispostos na tabela 3 considerando as legislações internacionais, já que, para silagem utilizada na alimentação de bovinos, não existe legislação brasileira específica.

Após a fermentação ocorre um aumento perceptível das AFB1 enquanto as concentrações de ZEA e FB1 sofrem redução. O aumento de aflatoxinas está em acordo com o esperado, vide que, quase metade das colônias encontradas pós-fermentação pertencem a esse gênero. Já a redução das demais micotoxinas pode estar ligado a uma competição entre as diferentes espécies de fungo ou simplesmente a ensilagem feita de forma eficiente reduzindo o crescimento desse gênero e, consequentemente a produção destas micotoxinas.

Tabela 3: Níveis de micotoxinas encontrados nas amostras de silagens pré e pós-fermentação

Amostra	Micotoxina	Frequência de Contaminação (%)	(µg g ⁻¹)	Amostras acima do limite internacional (%) [*]
Pré-fermentação	AFB1	31	0.2 – 4.5	0
	FB1	20	30.0 – 200.00	23
	ZEA	26	25.0 – 185.00	12
Pós-fermentação	AFB1	40	2.00 – 100.00	84
	FB1	30	15.0 – 132.00	13
	ZEA	20	30.0 – 151.00	8

^{*} Limite: 0.02 µg g⁻¹ AFB₁ (GMP, 2008), 50 ng g⁻¹ FB₁, 12 ng g⁻¹ ZEA (CE, 2006).

Conclusões

Dos padrões e parâmetros físico-químicos avaliados nas preparações de silagem, não se observa diferenças enquanto todas as amostras se encontram acima das regulamentações nacionais e internacionais de carga microbiana ($\geq 10^4$ UFC/g⁻¹) (BRASIL, 1988; GMP, 2008).

Os níveis de aflatoxinas totais se encontram dentro dos limites da legislação brasileira, porém algumas amostras estão em desacordo com legislações internacionais (BRASIL, 1988; GMP, 2008). Além

disso, há níveis de toxinas quantificados e índices de contaminação fúngica que não são preconizados pela legislação brasileira vigente (BRASIL, 1988), reforçando a necessidade de uma legislação atualizada e ações de para treinamento dos técnicos de campo.

A aplicação de produtos microbiológicos oferece uma boa opção para o processo de ensilamento, auxiliando na manutenção dos valores físico-químicos e sem alterar significativamente a microbiota, porém, é imprescindível que seja realizado monitoramento contínuo para garantir inocuidade e aprimorar esta importante atividade da pecuária brasileira.

Referências

- ABREU, M.B.; VIEIRA, A.A.; GOMES, M.P.; LIMA, T.S.; MATOS, E.S.; BEZERRA, E.S. *Alimentação de suínos nas fases de crescimento e terminação com dietas contendo níveis crescentes de bagaço de cevada*. Anais de Zootec, Brasília, DF, 2004.
- OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS, AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Gaithersburg, Agresti, 1990.
- BRASIL. Portaria n. 7 de 09 de novembro de 1988. *Padrões mínimos de matéria prima empregada na alimentação animal*. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 14 de novembro de 1988.
- CARDOSO, E. G.; SILVA, J. M. Silos, silagem e ensilagem. *Embrapa Gado de Corte*, Campo Grande, MS, 1995.
- CE. COMUNIDADE EUROPÉIA. Regulamento N° 401/2006 de 23 de Fevereiro de 2006, relativo aos métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios. *Journal Oficial da União Européia*, 2006.
- DOS SANTOS, S. F. *et al.* Principais tipos de silos e microrganismos envolvidos no processo de ensilagem. *Veterinária Notícias*, v. 19, n. 2, 2013.
- GMP + Certification Scheme Animal Feed Sector. 2006. Appendix 1: Product standards (including residue standards). *The Hague, the Netherlands: Products chap Diervoeder*. p. 1 – 39. 2008.
- KELLER L.A.M., KELLER, K.M.; MONGE, M.P.; PEREYRA, C.M.; ALONSO, V.A.; CAVAGLIERI, L.R. ; CHIACCHIERA, S.M.; Rosa, C.A.R. . Gliotoxin contamination in and pre- and post-fermented corn, sorghum and wet brewer's grains silage in São Paulo and Rio de Janeiro State, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, v. 112, p. 865-873, 2012.
- KLICH, M.A. *Identification of common Aspergillus species*. Netherlands: Central bureau voor Schimmelcultures, 2002. 116p.
- NELSON, P.T.; TOUSSOIN, T.A.A.; MARASAS, W.E.O. *Fusarium species: An illustrated manual for identification*. London: The Pennsylvania State University Press, 1983.
- PITT, J.L.; HOCKING, A.D. *Fungi and food*. London: Black Academia & Professional Chapman & Hall, 1997. 593p.
- SAMSON, R. A.; VAN REENEN-HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. *Introduction to Food and Airborne Fungi*. 6 ed. Netherlands: Centraal bureau Voor Schimmelcultures, 2000. 388 p.