



## OCORRÊNCIA DE FUNGOS E AFLATOXINAS NO ARROZ

Alexandre de Souza e **Silva Filho**<sup>1</sup>; Lígia Manoel **Martins**<sup>2</sup>; Aline Machado **Katsurayama**<sup>3</sup>;  
Beatriz Thie **Iamanaka**<sup>4</sup>; Marta Hiromi **Taniwaki**<sup>5</sup>

Nº 15226

**RESUMO** - O arroz é um dos cereais mais consumidos, e faz parte da dieta humana de milhões de pessoas. Um total de 28 amostras de arroz foram analisadas quanto a presença de fungos produtores de aflatoxinas e atividade de água. As amostras foram plaqueadas em meio Dicloran Glicerol 18% agar (DG18) e incubadas a 25°C por 5 dias. As espécies fúngicas mais comuns foram: *Eurotium chevalieri*, *E. amstelodami*, *E. repens*, *Eurotium spp.*, *Aspergillus section Flavi*, *Aspergillus candidus*, *A. restrictus* e *A. terreus*. Apenas um isolado de *Aspergillus flavus* foi produtor de aflatoxina B. O valor médio da atividade de água das amostras de arroz foi de 0,567 e variou de 0,464 a 0,678. Aflatoxina B<sub>1</sub> foi encontrada em apenas uma amostra de arroz numa concentração de 0,12 µg/kg.

**Palavras-chaves:** Arroz, fungos, aflatoxinas, *Aspergillus section Flavi*, micobiota.

1 Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Biomedicina, Veris Metrocamp IBTA, Campinas-SP; Alexandrefilho1994@gmail.com

2 Colaborador: Mestranda em Ciência de Alimentos, FEA/Unicamp, Campinas-SP.

3 Colaborador: Mestranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos, ITAL, Campinas-SP.

4 Colaborador: Pesquisadora do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas-SP.

5 Orientador: Pesquisadora do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas-SP; marta@ital.sp.gov.br



**ABSTRACT** – *Rice is one of the most consumed cereals in the world and is part of human diet for millions of people. A total of 28 rice samples was analyzed for the presence of aflatoxin producing fungi and water activity. The samples were plated onto Dichloran Glycerol 18% agar (DG18) and incubated at 25°C for 5 days. The most common fungal species were: Eurotium chevalieri (24%), Aspergillus section Flavi (19%) and Aspergillus candidus (13%). Only one isolate of Aspergillus flavus was aflatoxin B producer. The mean water activity value of rice samples was 0.567 and they varied from 0.464 to 0.678. Aflatoxin B<sub>1</sub> was found in only one rice sample at concentration of 0.12 µg/kg.*

**Key-words:** Rice, fungi, aflatoxins, *Aspergillus* section *Flavi*, mycobiota.

## 1 INTRODUÇÃO

O arroz é um dos cereais mais consumidos, e faz parte da dieta humana de milhões de pessoas. A garantia da qualidade e sanidade do arroz é de máxima importância porque qualquer contaminante presente poderá afetar a saúde do consumidor, principalmente nos países como o Brasil em que o arroz faz parte da dieta diária.

Dentre as micotoxinas encontradas no arroz, destacam-se com maior frequência as aflatoxinas (AFs), Ocratoxina A (OTA), Desoxinivalenol (DON), Zearalenona (ZON) e Fumonisina (FUM) (ALMEIDA et al., 2012). As condições de produção e processamento do arroz podem favorecer o desenvolvimento de fungos, que podem produzir micotoxinas, contaminando o alimento. O arroz pode ser infectado pelos fungos antes da colheita como as espécies de *Fusarium* e os fungos dematiáceos; e após a colheita durante a fase de secagem, e/ou armazenamento pelas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* (PITT & HOCKING, 2009).

As aflatoxinas são produzidas principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (PITT & HOCKING, 2009). As aflatoxinas são metabólitos extremamente tóxicos, sendo o análogo B<sub>1</sub> considerado o mais tóxico, classificado pela International Agency for Research on Cancer (IARC, 1993) como pertencente à classe 1, i.e., composto carcinogênico ao homem, sendo o fígado o principal órgão atingido. A resolução RDC 07/2011 publicada pela ANVISA (ANVISA, 2011) determina o limite máximo tolerável de aflatoxinas em cereais igual a 5µg/kg.



## 9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015 10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

No Brasil, poucas pesquisas foram realizadas sobre a presença de aflatoxinas, contudo o levantamento sobre a ocorrência de aflatoxinas em cereais feita pelo Comitê de Contaminantes de Alimentos do Codex (CCCF) em 2013 mostrou que o arroz foi um dos cereais mais contaminados com as aflatoxinas e estavam presentes em altos níveis, em várias partes do mundo, inclusive no Brasil (CODEX ALIMENTARIUS, 2013).

Nestas condições o presente projeto tem o objetivo de investigar a ocorrência de fungos aflatoxigênicos no arroz, utilizando metodologias adequadas para seu isolamento, identificação e produção de toxinas, bem como a presença de aflatoxinas no arroz.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostra de arroz

Foram analisadas 28 amostras de arroz, com aproximadamente 1kg, comercializadas em supermercados da região de Campinas. Os tipos de arroz analisados foram: tipo 1, classe longo fino e subgrupo polido (13), parboilizado polido (9), parboilizado integral (5) e integral (1)

### 2.2 Medição da atividade de água das amostras

A atividade de água foi determinada no aparelho Aqualab, modelo 3TE (Decagon, USA). As leituras foram realizadas em triplicatas a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

### 2.3 Análise Micológica e Identificação dos fungos

A análise micológica foi realizada segundo PITT & HOCKING (2009). As amostras de arroz foram desinfetadas em solução de hipoclorito 0,4% por 1 min, sob agitação. A seguir foi realizado plaqueamento direto de 50 grãos, distribuídos em 5 placas, contendo ágar Dicloran 18% glicerol (DG18). As placas foram incubadas à  $25^{\circ}\text{C}$  por 7 dias. O resultado foi expresso em porcentagem de arroz infectado.

Os fungos do gênero *Aspergillus* foram isolados em meio ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA) e identificados segundo KLICH (2002), VARGA et al. (2011). Os fungos identificados como *Aspergillus* section *Flavi* foram submetidos à incubação em meio ágar *Aspergillus flavus* - *parasiticus* (AFPA) por a  $25^{\circ}\text{C}$  por 5 dias para diferenciação.

### 2.4 Teste de produção de aflatoxinas pelas cepas de *Aspergillus* section *Flavi*



Após a identificação, os isolados de *A. section Flavi*, foram inoculados em meio ágar Extrato de Levedura e Sacarose (YESA) e encubados por a 25°C por 7 dias. Após esse período foi aplicada a técnica de ágar plug, associada à cromatografia de camada delgada (CCD), segundo FITERBORG et al. (1983) para testes de produção de aflatoxinas.

## **2.5 Determinação de aflatoxinas nas amostras de arroz**

A análise de aflatoxinas nas amostras de arroz foi realizada segundo STROKA et al. (2000), com modificações. Foi tomada uma amostra de aproximadamente 100 g de arroz e moída em triturador (IKA do Brasil, Brasil), desta amostra foi tomada uma alíquota de 25 g e adicionada 2,5 g de cloreto de sódio e 100 mL de metanol:água (8:2 v/v) e homogeneizada em shaker por 30 minutos. Em seguida, foi duplamente filtrada em papel filtro qualitativa e membrana de vidro, respectivamente, e 10 mL do filtrado final diluído em 60 mL de solução tampão fostato (PBS). O conteúdo total foi passado em coluna de imunoafinidade (VICAM, EUA), com fluxo de 1 – 2 gotas por segundo, seguido de lavagem da coluna com 30 mL de água destilada. As aflatoxinas contidas na coluna foram eluídas com 1250 µL de metanol grau HPLC e 1750 µL de água ultrapura.

Para detecção da toxina foi utilizado cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detector de fluorescência, comprimento de onda de excitação e emissão de 362 e 455nm, e sistema Kobracell (R-Biopharm, Rhône Ltd, Alemanha) para derivatização pós-coluna das aflatoxinas. A fase móvel foi água:acetonitrila:metanol (6:2:3, v/v/v), adicionada de 119mg de brometo de potássio e 350µL de ácido nítrico 4M por litro, em um fluxo de 1mL/min., com volume de injeção de 20µL.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A Tabela 1 apresenta os valores de atividade de água nas amostras analisadas. O valor médio obtido foi 0,567 e variou de 0,464 a 0,678. O plaqueamento direto do arroz (Figura 1) apresentou porcentagens de infecção que variaram de 0 – 24% (média 3%). Os fungos mais comuns foram as espécies de *Eurotium* (*E. chevalieri*, *E. amstelodami*, *E. repens* e outras espécies deste gênero), *Aspergillus* section *Flavi* e *Aspergillus candidus*. Estas espécies são xerofílicas i.e., podem crescer sob condições de baixa umidade, especialmente em alimentos armazenados. As outras espécies encontradas foram *A. restrictus*, *A. terreus*, *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Eupenicillium hirayamae*, *Syncephalastrum* sp., fungos dematiaceos e hifomicetos (Figura 2). TONON et al. (1997) encontraram *Penicillium citrinum* e *Talaromyces islandicus* nas amostras de arroz amarelado, enquanto que PITT et al. (1994) encontraram apenas poucos *P. citrinum* nas amostras de arroz polido. O arroz polido tem se mostrado isento de crescimento fúngico porque a



**9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015**  
**10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo**

alta temperatura durante o polimento do arroz pode destruir esporos fúngicos e/ou selecionar as espécies mais resistentes (PITT & HOCKING, 2009).

Foram isoladas 7 cepas de *Aspergillus section Flavi*, sendo 2 identificadas como *Aspergillus flavus* (Figura 3), considerando as características morfológicas no meio CYA a 25° e 37°C e coloração reversa laranja no AFPA, além das características microscópicas. Destas 7 cepas, apenas uma produziu aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (Tabela 2).

**Tabela 1.** Atividade de água das amostras de arroz

<b>Amostra</b>	<b>Origem Cidade/Estado</b>	<b>Tipo de arroz</b>	<b>Atividade de água</b>
16	São Borja/RS	Integral	0,591
3	Sentinela do Sul/RS	Parboilizado Integral	0,664
7	Pelotas/RS	Parboilizado Integral	0,678
9	Pelotas/RS	Parboilizado Integral	0,630
11	Itaqui/RS	Parboilizado Integral	0,521
14	São Borja/RS	Parboilizado Integral	0,636
2	Sentinela do Sul/RS	Parboilizado Polido	0,639
4	Santa Cruz do Rio Pardo	Parboilizado Polido	0,671
6	São Borja/RS	Parboilizado Polido	0,548
10	Camaquã/RS	Parboilizado Polido	0,636
12	Pelotas/RS	Parboilizado Polido	0,593
17	Camaquã/RS	Parboilizado Polido	0,636
19	Bagé/RS	Parboilizado polido	0,511
23	Itaqui/RS	Parboilizado Polido	0,559
24	Porto Ferreira/ SP	Parboilizado Polido	0,604
1	Pelotas/RS	Polido	0,504
5	São Borja/RS	Polido	0,464
8	Alegrete/RS	Polido	0,577
13	Itaqui/RS	Polido	0,574
15	Porto Ferreira/ SP	Polido	0,507
18	São Borja/RS	Polido	0,480
28	Santa Cruz do Rio Pardo/SP	Polido	0,523
27	Santa Cruz do Rio Pardo/SP	Polido	0,524
26	Santa Cruz do Rio Pardo/SP	Polido	0,500
25	Santa Cruz do Rio Pardo/SP	Polido	0,539
20	Jaraguá do Sul/SC	Polido	0,510
21	Camaquã/RS	Polido	0,579
22	Itaqui/RS	Polido	0,511

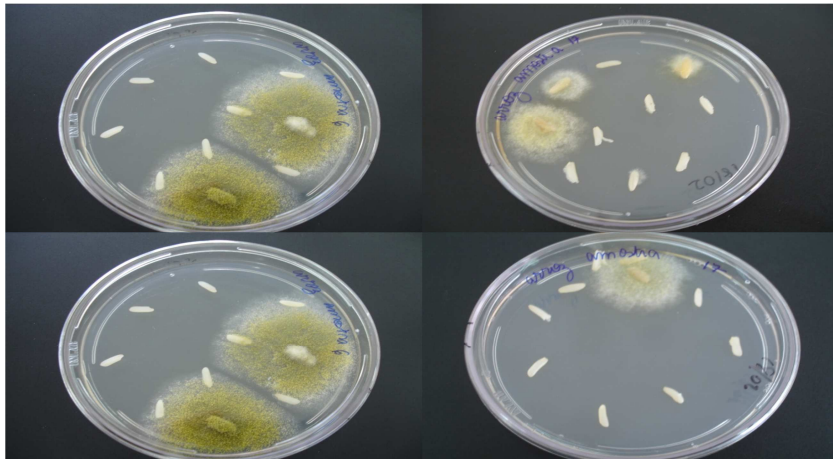


Figura 1. Plaqueamento direto do arroz

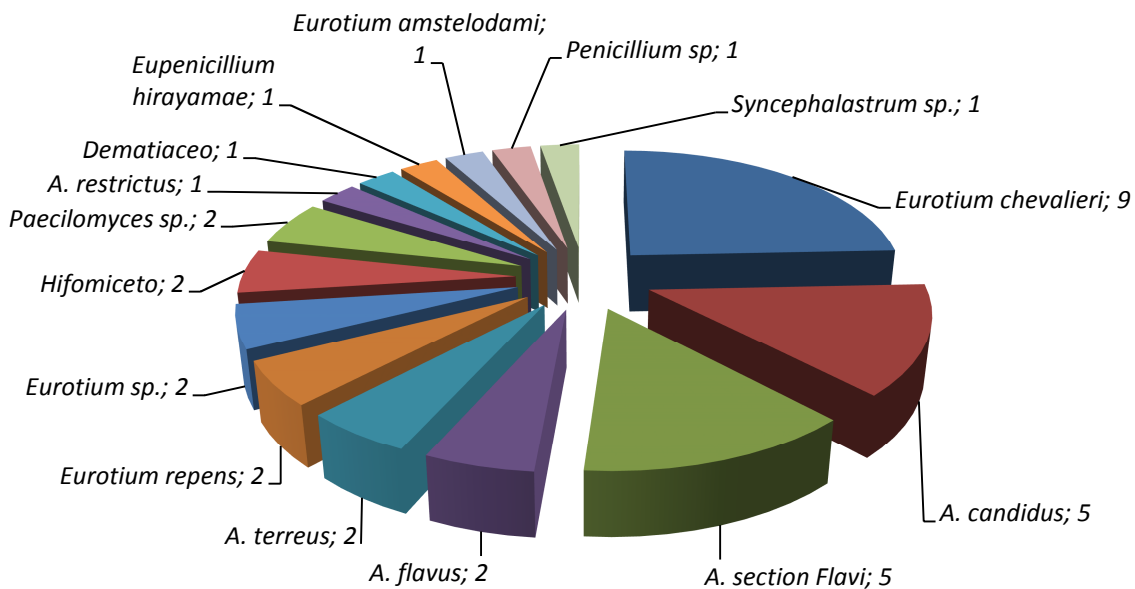


Figura 2. Fungos isolados nas amostras de arroz



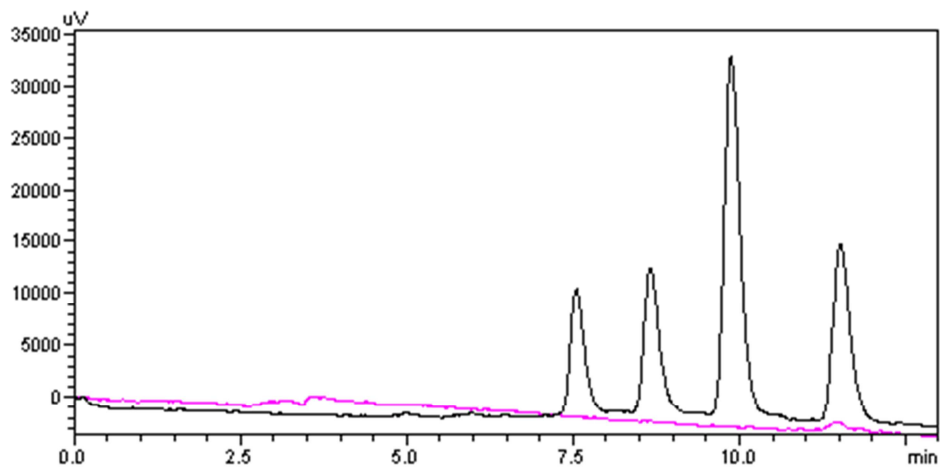
Figura 3. *Aspergillus flavus* isolado do arroz. A: CYA 25°C; B: CYA 37°C; C: AFPA 25°C (reverso); D: lâmina.



**Tabela 2.** Análise da produção de aflatoxinas pelos isolados

Nº do isolado	Produção de aflatoxinas	Identificação
2	Não produtor	<i>A. flavus</i>
3	Afla B+	<i>A. flavus</i>
4	Não produtor	<i>A. section Flavi</i>
5	Não produtor	<i>A. section Flavi</i>
6	Não produtor	<i>A. section Flavi</i>
8	Não produtor	<i>A. section Flavi</i>
9	Não produtor	<i>A. section Flavi</i>

Foi detectada a presença de aflatoxina B<sub>1</sub> em apenas uma amostra de arroz (4%) em concentração de 0,12 µg/kg (Figura 4), diferindo dos dados de ALMEIDA et al. (2012) que encontraram aflatoxinas (B<sub>1</sub>B<sub>2</sub>G<sub>1</sub>G<sub>2</sub>) em 58,7% nas amostras de arroz analisadas. A ANVISA estabeleceu um limite máximo de 5µg/kg de aflatoxinas totais, sendo que esta amostra contaminada encontra-se dentro dos limites permitidos pela legislação vigente no Brasil. A maioria das amostras analisadas não apresentaram níveis detectáveis de aflatoxinas.



**Figura 4.** Cromatograma da amostra contaminada com 0,12 µg/kg de aflatoxina

#### 4 CONCLUSÃO

A maioria das amostras de arroz analisada não apresentou aflatoxinas e o número de fungos potencialmente produtores desta toxina foi baixo.

#### 5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ/PIBIC pela bolsa concedida e a Fapesp Processo 2014/07498-7 pelo auxílio financeiro.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M.I. *et al.* Co-occurrence of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>, ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol, and citreoviridin in Rice in Brazil. *Food Add. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* v. 29, p. 694-703, 2012.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA. Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, 2011.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Discussion paper on aflatoxins in cereais. (CX/CF 14/x/x). Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Codex Committee on Contaminants in Foods, FAO, Rome, 2013.
- FILTENBORG, O. *et al.* Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Appl. Environm. Microbiol.* v. 45, p. 581-585, 1983.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Ochratoxin A. *In* IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 56. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France p. 489-521, 1993.
- KLICH, M.A. Identification of common *Aspergillus* species. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 116p, 2002.
- PITT, J. I. & HOCKING, A. D. *Fungi and Food Spoilage*, 3<sup>rd</sup> ed. Springer, New York. 519p. 2009.
- PITT, J.I.; *et al.* The normal mycoflora of commodities from Thailand. 2. Beans, rice, small grains and other commodities. *Int. J. Food Microbiol.* v. 23, p. 35-53, 1994.
- STROKA, J.; *et al.* Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography Using Post-Column Bromination for Determination of Aflatoxins in Peanuts Butter, Pistachio Paste, Fig Paste and Paprika Powder: Collaborative Study. *J.AOAC Internat.* v. 83, p. 320-340. 2000.
- TONON, S.A.; *et al.* Mycoflora of paddy and milled rice produced in the region of Northeastern Argentina and Southern Paraguay. *Int. J. Food Microbiol.* vol. 37, p.231-235. 1997.
- VARGA, J; *et al.* Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Stud. Mycol*, v.69, p. 57-80. 2011.