

## COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

OCORRÊNCIA DE *ASPERGILLUS* SPP., *PENICILLIUM* SPP. E AFLATOXINAS EM AMOSTRAS DE FARINHA DE MILHO UTILIZADAS NO CONSUMO HUMANO, PIAUÍ, BRASIL

F.C. Cardoso Filho<sup>1\*</sup>, R.M. Calvet<sup>1\*</sup>, C.M. Pereyra<sup>3</sup>,  
M.M.G. Pereira<sup>2</sup>, C.A.R. Rosa<sup>4</sup>, A.M. Torres<sup>3</sup>, M.C.S. Muratori<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento de Alimentos, Campu de Socopo, CEP 64049-350, Teresina, PI, Brasil. E-mail: veterinário\_filho@hotmail.com

## RESUMO

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a presença de fungos e de aflatoxinas em um produto à base de milho, destinado ao consumo humano na Cidade de Teresina, Piauí, Brasil. Foram utilizadas 30 amostras (500 g) de farinha de milho a partir de seis diferentes marcas vendidas em supermercados dessa cidade. A coleta foi realizada entre janeiro e março de 2009. A avaliação micológica foi realizada imediatamente e, em seguida, foram armazenadas a -4° C, alíquotas para, posteriormente, ser realizada a análise de aflatoxinas. As contagens fúngicas variaram entre 2,42 e 4,10 UFC/g. Não houve diferença significativa a  $p < 0,05$  entre as marcas utilizadas. As principais espécies de *Aspergillus* isoladas foram: *A. flavus* (32,73 %), *A. oryzae* (14,54%), *A. niger* agregado (10,91%), *A. parasiticus* (5,45%), *A. fumigatus* (5,45%) e *A. carbonarius* (1,81%), já as de *Penicillium* foram *P. citrinum* (28,88%), *P. funiculosum* (25,67%) e *P. verrucosum* (16,22%). Não foi detectada a presença de aflatoxina. Conclui-se que espécies fúngicas potencialmente capazes de produzir micotoxinas como *Aspergillus* e *Penicillium* são encontradas em farinha de milho, porém, não foi detectada a presença de aflatoxinas nesse produto utilizado para alimentação humana.

PALAVRAS-CHAVE: Micotoxinas, fungos, massa de milho.

## ABSTRACT

OCCURRENCE OF *ASPERGILLUS* SPP., *PENICILLIUM* SPP. AND AFLATOXINS IN CORN FLOUR SAMPLES USED IN HUMAN CONSUMPTION, PIAUÍ, BRAZIL. This study aimed to evaluate the presence of fungi and aflatoxin in a corn product intended for human consumption in the city of Teresina, Piauí, Brazil. Thirty corn flour samples (500 g) from six different trademarks were purchased from local supermarkets in the city of Piauí, Brazil, from January to March 2009. The mycological evaluation was performed immediately, and then aliquots were stored at -4° C, until the aflatoxins analysis. Fungal counts ranged between 2.42 and 4.10 CFU/g. There was no significant difference at  $p < 0.05$  between the brands used. The main *Aspergillus* species isolated were *A. flavus* (32.73%), *A. oryzae* (14.54%), *A. niger* aggregate (10.91%), *A. parasiticus* (5.45%), *A. fumigatus* (5.45%) and *A. carbonarius* (1.81%), while the *Penicillium* were *P. citrinum* (28.88%), *P. funiculosum* (25.67%) and *P. verrucosum* (16.22%). No aflatoxins were detected by thin-layer chromatography in corn flour samples. The fungal species potentially capable of producing mycotoxins such as *Aspergillus* and *Penicillium* are found in corn flour, but no aflatoxin was found in this kind of product.

KEY WORDS: Mycotoxin, fungi, corn flour.

Brasil, o milho (*Zea mays*) é o segundo grão mais produzido (COMPANHIA..., 2010). Destaca-se por ser utilizado tanto na alimentação humana como na

alimentação animal. Seus derivados tem efetiva participação na dieta alimentar das camadas mais pobres da população (MELO FILHO; RICHETTI, 1997).

<sup>2</sup>Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Teresina, PI, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Seropédica, RJ, Brasil.

<sup>4</sup>Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Departamento de Microbiología e Inmunología, Córdoba, Argentina.

\*Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí.

Os fungos encontram-se amplamente distribuídos no meio ambiente, sendo contaminantes frequentes dos alimentos, especialmente os de origem vegetal. Algumas espécies podem invadir e colonizar os tecidos vegetais durante as etapas da produção: no cultivo, na colheita, na secagem, no transporte, no processamento e no armazenamento (RODRIGUEZ-AMAYA; SABINO, 2002).

Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são considerados fungos de armazenamento. Contaminam cereais como: milho, trigo, sorgo, nozes, sementes de algodão e trigo usados na formulação de alimentos (RODRIGUEZ-AMAYA; SABINO, 2002). Sua capacidade de crescer em altas temperaturas e baixa atividade de água os faz colonizadores de vários cultivos (MOSS, 1991). Algumas espécies do gênero *Aspergillus* são importantes produtores de micotoxinas, como: aflatoxinas (AFs), ocratoxinas (OTA), dentre outras (KLICH; PITT, 1994). Dentro do gênero *Penicillium* há espécies que produzem uma grande variedade de micotoxinas, sendo algumas delas o ácido ciclopiazônico e penicílico, citreoviridina, citrinina, ocratoxina A, patulina, roquefortina e outras (PITT; HOCKING, 1997). Estas micotoxinas consumidas regularmente, em quantidades mínimas, causam lesões irreversíveis no rim, fígado, cérebro e também podem apresentar atividade teratogênica (COUNSIL..., 2003).

As Aflatoxinas são micotoxinas produzidas, principalmente por *A. flavus* e *A. parasiticus*, estas espécies são habitantes de solo, sendo essa a principal fonte de inóculo. São capazes de crescer em vários tipos de cereais, principalmente em milho e amendoim (RODRIGUEZ-AMAYA; SABINO, 2002). Dentro das aflatoxinas a aflatoxina B<sub>1</sub> é a mais importante e classifica-se como potencial carcinogênico humano (IARC, 2006).

Visando o abordado, este trabalho teve como objetivo avaliar a presença de fungos e de aflatoxinas em um produto à base de milho, destinados ao consumo humano na Cidade de Teresina, Piauí, Brasil.

Foram utilizadas 30 amostras (500 g) de farinha de milho de seis diferentes marcas vendidas em supermercados da Cidade de Teresina, Brasil. O período de coleta foi entre janeiro e março de 2009. Após a coleta as amostras foram homogeneizadas, mescladas e quarteladas para se obter amostras de 100 g para o laboratório. A avaliação micológica foi realizada imediatamente, e alíquotas foram armazenadas para a análise de aflatoxinas.

Foram adicionados 25 g de cada amostra a 225 mL de água peptonada 0,1%, assim formando a diluição de 10<sup>-1</sup>; esta mistura foi homogeneizada e diluída para concentrações finais de 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup>. Foram espalhados 0,1 mL de cada diluição (por duplicado) na superfície do meio sólido, ágar dicloran-rosa bengala-cloranfenicol (DRBC) (ABARCA *et al.*, 1994).

As placas foram incubadas durante 7 dias a 25° C. Todas as placas contendo 10 -100 UFC foram contadas, e os resultados expressos em unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de amostra. No último dia de incubação, as colônias de *Aspergillus* e *Penicillium*, após identificação microscópica, de acordo com critérios propostos por PITT; HOCKING (1997), foram transferidas para ágar extrato de malte (MEA) e incubadas a 25° C por 7 dias para posterior identificação da espécie.

Para a identificação de *Penicillium*, as colônias foram cultivadas em ágar Czapek yeast (CYA) em 5, 25 e 37° C, MEA a 25° C e 25% de ágar nitrato de glicerol (G25N) a 25° C. Para a identificação de *Aspergillus*, as culturas são cultivadas em CYA (25 e 37 °C), MEA (25° C) e extrato de levedura Czapek ágar, com 20% de sacarose (CY20S) a 25 °C. Todas as placas foram incubadas por 7 dias. Cada cepa foi identificada de acordo com os métodos fornecidos por PITT (1988) e KLICH; PITT (1994).

As análises de aflatoxinas foram realizadas por cromatografia em camada delgada (CCD), seguindo a metodologia descrita nos métodos oficiais de análise (ASSOCIATION..., 1995). Para cada amostra (25 g) foi utilizado para extração 125 mL de metanol: água (60: 40 v/v), 80 mL de hexano, 2 g de NaCl e homogeneizado por 30 min em um agitador orbital. A mistura foi filtrada através de filtro de papel Whatman fase aquosa N° 4 (Whatman, Inc., Clifton, New Jersey, E.U.A.) e 25 mL de metanol filtrado: foi extraída duas vezes com 25 e 15 mL de clorofórmio, respectivamente. A fase clorofórmica foi seca a vácuo usando um evaporador rotativo e o extrato foi redissolvido em 200 µL de clorofórmio: acetona (9:1 v/v). Foram aplicados volumes de 2, 5 e 10 µL de cada extrato, juntamente com a solução padrão de toxina em uma cromatoplaça de sílica gel G60 (20 x 20 cm, Merck, Alemanha). O sistema foi desenvolvido com clorofórmio: acetona (90: 10 v/v). Os cromatogramas foram secos e observados em 365 nm de luz UV. As aflatoxinas foram quantificadas por comparação visual com luz ultravioleta.

Os resultados das contagens foram transformados em log<sub>10</sub>, correlacionados e realizada a análise de variância seguida de teste para a comparação de média, SNK, com significância (p < 0,05), utilizando o Pacote Estatístico SIGMA STAT (1994).

A contagem fúngica foi feita por meio de enumeração de propágulos fúngicos e expressa por unidades formadoras de colônia por grama de amostra analisada (UFC/g) (Tabela 1). As contagens fúngicas variaram entre 2,42 e 4,10 UFC/g. Não houve diferença significativa a p < 0,05 entre as diferentes marcas de farinha de milho analisadas.

Em trabalho realizado por PITTNER *et al.* (2007), com amostras de farinha de milho do Estado do Paraná, todas as amostras apresentaram valores

inferiores a 1,70 UFC/g de fungos, valores bem inferiores quando comparados com os obtidos nesse trabalho, e com o de ALHADAS *et al.* (2004) trabalhando com fubá. A presença de fungos nos alimentos leva a modificações nas características organolépticas, levando a uma significativa diminuição da qualidade (CAST, 2003).

A Tabela 2 mostra a ocorrência de fungos filamentosos isolados de farinha de milho adquiridas em estabelecimentos comerciais de Teresina, PI. Todas as marcas analisadas apresentaram contaminação por diferentes gêneros fúngicos, alguns potencialmente capazes de produzir micotoxinas, o que pode representar um risco potencial para a saúde humana. Foram isoladas 211 colônias fúngicas, no qual ficaram distribuídas em 8 gêneros fúngicos. O gênero mais frequente foi *Aspergillus* spp. e seus teleomorfos (36,48%), seguido do gênero *Penicillium* spp. (35,04%) e *Fusarium* spp. (15,64%). Resultados semelhantes foram encontrados por RIBEIRO *et al.* (2003) e SANTOS *et al.* (2008). Em outro trabalho com a mesma matriz encontraram *Penicillium* spp. como gênero prevalente (PITNER *et al.*, 2007).

O gênero *Aspergillus* e *Penicillium* são indicadores de deterioração em sementes e grãos causando danos ao gérmen, descoloração, alterações nutricionais, perda da matéria seca e os primeiros estágios da deterioração microbiológica (SINHA; SINHA, 1992).

Acredita-se que a grande incidência de contaminação por fungos em alimentos a base de milho seja decorrente das condições de manejo, processamento e armazenamento da matéria prima.

Das 77 cepas de *Aspergillus* spp. isoladas, 22 pertencem ao gênero *Eurotium*. A espécie mais isolada foi a de *A. flavus* correspondendo a 32,73 %, seguido por *A. oryzae* (14,54%). As frequências relativas das espécies *A. niger* agregado (10,91%), *A. parasiticus* (5,45%), *A. fumigatus* (5,45%) e *A. carbonarius* (1,81%) foram baixas, porém, a presença de tais espécies é significativa, pois são potencialmente produtores de micotoxinas (ABARCA *et al.*, 2001). Outras espécies de *Aspergillus* foram identificadas com uma menor frequência como: *A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. ostianus*, *A. clavatus*, *A. candidus*, *A. albicans*, *A. versicolor* e *A. penicilloides*.

Foram constatadas 13 espécies de *Penicillium* dentro de um total de 74 cepas, onde a de maior frequência foi *P. citrinum* (28,88%) seguida por *P. funiculosum* (25,67%) e *P. verrucosum* (16,22%). Outras espécies também foram identificadas numa menor frequência como: *P. niaksomani*, *P. citrionigrum*, *P. miniluteum*, *P. oxalicum*, *P. implicatum*, *P. restrictum*, *P. purpurogenum*, *P. raistriki*, *P. canascens* e *P. fellutanum*. RIBEIRO *et al.* (2003) também evidenciaram a predominância da espécie *Penicillium funiculosum*. *Penicillium citrinum* é uma das espécies mais frequentemente encontrada nos alimentos brasileiros, sendo potencialmente produtora de citrinina, uma toxina nefrotóxica (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Tabela 1 - Contagem total de fungos filamentosos isolados de diferentes marcas farinhas de milho utilizadas no consumo humano.

Marcas	Contagens fúngicas (médias) em log <sub>10</sub> UFC/g	Varição em log <sub>10</sub> UFC/g
A	3,25	2,73 - 3,88
B	3,15	2,87 - 3,37
C	3,37	2,88 - 4,10
D	2,90	2,42 - 3,52
E	3,14	2,57 - 3,73
F	3,17	2,61 - 3,58

(P = 0.30), UFC/g= unidade formadora de colônias por grama em log<sub>10</sub>.

Tabela 2 - Ocorrência (%) de fungos filamentosos isolados de farinha de milho adquiridas em estabelecimentos comerciais de Teresina, PI.

Gênero Fúngico	Nº de isolados	Ocorrência (%)
<i>Aspergillus</i> spp. e teleomorfos	77	36,48
<i>Penicillium</i> spp.	74	35,04
<i>Fusarium</i> spp.	33	15,64
<i>Cladosporium</i> spp.	14	6,63
Mucorales	09	4,26
Absdia	02	0,95
<i>Rhizopus</i>	01	0,47
<i>Curvularia</i>	01	0,47
Total	211,0	100,0

Já foram relatadas altas incidências de toxinas em alimentos em produtos à base de arroz, trigo e derivados de milho, no qual foi constatado presença de aflatoxinas, zearalenona, ocratoxina e zearalenona (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Apesar de encontrar uma alta incidência de fungos na farinha de milho, não foram detectadas aflatoxinas; estes resultados concordam com os obtidos por CALDAS; SILVA (2007), que analisaram 101 amostras de produtos à base de milho e com outros estudos conduzidos no Brasil (KAWASHIMA; SOARES, 2006; BITTENCOURT *et al.*, 2005).

Reduzir a infecção fúngica nos alimentos destinados ao consumo humano é de essencial importância para evitar as perdas na produção de farinha de milho e também ao risco sanitário para o homem. Essas condições podem ser conseguidas melhorando as condições de armazenamento da matéria-prima, até a comercialização do produto final.

Gêneros fúngicos potencialmente produtores de micotoxinas como *Aspergillus* e *Penicillium* são encontrados em farinha de milho, porém não foi detectada a presença de aflatoxina nesse alimento utilizado na alimentação humana.

#### REFERÊNCIAS

- ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLA, G.; CABAÑES, F.J. Mycoflora and aflatoxin-producing strains in animal mixed feeds. *Journal of Food Protection*, v.57, n.3, p.256-258, 1994.
- ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLA, G.; CABAÑES, F.J. Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. *Journal of Food Protection*, v.64, p.903-906, 2001
- ALHADAS, R.V; STUART, R.M.; BEUX, M.R; PIMENTEL, I.C. Contagem de Bolores e leveduras em fubá e identificação de gêneros potencialmente toxigênicos. *Visão Acadêmica*, v.5, n.2, p.79-82, 2004.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Gaithersburg, in Sec. 972-26, 976-22. Off. Methods Anal. 1995.
- BITTENCOURT, A.B.F.; OLIVEIRA, C.A.V.; DILKIN, P.; CORRÊA, B. Mycotoxin occurrence in cornmeal and flour traded in São Paulo, Brazil. *Food Control*, v.16, p.117-120, 2005.
- CALDAS, E.D.; SILVA, A.C.S. Mycotoxins in corn-based products consumed in Brazil: an exposure assessment for fumonisins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p.7974-7980, 2007.
- COPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. (Brasil). A Safra de grãos supera anterior em 8,7%. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=73&NSN=1309>> Acesso em: 12 dez. 2010.
- CONCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY - CAST. *Micotoxins: risk in plant, animal and humans systems*. Ames: CAST, 2003. 109p.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON-CANCER. IARC monographs. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ListagentsCASnos.pdf>>. Acesso em: 2006.
- KAWASHIMA, L.M.; SOARES, L.M.V. Occurrence of fumonisin B1, aflatoxins B1, B2, G1, and G2, ochratoxin A and zearalenone in corn products. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, p.516-521, 2006.
- KLICH, M.A.; PITT, J.I. (Ed.). A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Clayton South: Commonwealth Scientific and Industrial Research, 1994.
- MELO-FILHO, G.A.; RICHETTI, A. Aspectos socioeconômicos da cultura de milho. Embrapa, 1997. p.12-21. (Circular Técnica, n.5).
- MOSS, M.O. Mycology of cereal grain and cereal products. In: CHELKOWSKI, J. (Ed.). *Cereal grain. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. Amsterdam: Elsevier, 1991.
- OLIVEIRA, M.S.; PRADO, G.; ABRANTES, F.M.; SANTOS, L.G.; RIALA, T.V. Incidence of aflatoxins, Deoxynivalenol and Zearalenone in products commercialized in the cities of Minas Gerais state in 1998-2000. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.61, n.1, p.1-6, 2002.
- OLIVEIRA, G.R.; RIBEIRO, J.M.M.; FRAGA, M.E.; CAVAGLIERI, L.R.; DIREITO, G.M.; KELLER, K.M.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R. Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia*. v.162, p.355-362, 2007.
- PITT, J.I. A Laboratory guide to common *Penicillium* species. 2.ed. North Ride: CSIRO Division of Food Processing, 1988. 186p.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. *Fungi an food spoilage*. London: Blackie Academic & Professional, 1997. 920 p.
- PITNER, E.; CZERVINSKI, T.; SANCHES, H.F.; MONTEIRO, M.C. Isolamento de fungos em alguns produtos a derivados de milho. Publicação. UEPG. *Ciências Biológicas e da Saúde*, v.13, n.1/2, p.21-27, 2007.
- RIBEIRO, S.A.A.L.; CAVALCANTI, M.A.Q.; FERNANDES, M.J.S.; LIMA, D.M.M. Fungos filamentosos isolados de produtos derivados do milho comercializados em Recife, Pernambuco. *Revisista Brasileira de Botânica*, v.26, n.2, p.223-229, 2003.
- RODRÍGUEZ-AMAYA, D.B.; SABINO, M. Mycotoxins research in Brazil: the last decade in review. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.33, n.1, p.1-11, 2002.

SANTOS, G.C.; ROCHA, N.S.C.; MIRANDA, M.S.; BARROS, T.F. Ocorrência de fungos toxigênicos em farinhas de milho comercializadas no estado da Bahia-2007/2008. Dados preliminares. *Revista Ciências da Vida*, v.28, 2008. Suplemento.

SINHA, K.K.; SINHA, A.K. Impact of stored grain pests on seed deterioration and aflatoxin contamination in maize. *Journal of Stored Products Research*, v.28, n.3, p.211-219, 1992.

SIGMA STAT for windows version 1.0. Jandel Corporation, 1994.

Recebido em 11/8/10  
Aceito em 14/5/11