

# IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS PATOGÊNICOS EM GRÃOS DE AMENDOIM E MILHO PROVENIENTES DA INDÚSTRIA E DA FEIRA LIVRE DE CARUARU/ PE

**Título resumido:** FUNGOS PATOGENICOS EM GRAOS DE AMENDOIN E MILHO

## RESUMO

**Objetivo** avaliar amostras de milho e amendoim provenientes da indústria e da feira de Caruaru-PE, quanto à presença ou ausência de fungos potencialmente produtores de micotoxinas. **Metodologia:** Estudo experimental realizado com 40 amostras de milho e de amendoim, que foram submetidos a breve desinfecção, trituração, enriquecimento, semeio e identificação de fungos que sejam potenciais patógenos humanos. **Resultados:** Diversas espécies de fungos patogênicos foram encontradas entre elas *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium sp.* A presença desses fungos corroboram com a possível presença de micotoxinas, que são metabolitos secundários dessas espécies. **Conclusão:** Por ser considerada uma cidade tipicamente junina, culturalmente em Caruaru – PE o consumo de milho e amendoim, bem como seus derivados é intenso na região. O que sugestivamente torna os caruaruenses propensos ao consumo de alimentos contaminados em algum momento pelos principais gêneros de fungos patogênicos.

**Palavras-chave:** Fungos, Neoplasias, Aflatoxinas, Ocratoxinas.

## INTRODUÇÃO

Designa-se contaminante químico de alimento toda substância que não seja um de seus constituintes naturais, podendo se tornar parte do alimento durante sua produção, processamento ou armazenamento por fatores naturais ou artificiais, e que ofereça risco de gerar danos à saúde do consumidor (MIDIO & MARTINS, 2000; ROCHA et al., 2008).

Em meio aos vários fatores que danificam a qualidade de um alimento, merece ênfase a contaminação de grãos por micotoxinas, especialmente as aflatoxinas, metabólitos secundários tóxicos de fungos, como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*, que compõem um sério problema de saúde pública em diversas regiões do mundo <sup>1</sup>, onde diversos tipos de grãos como amendoim, milho, castanhas e etc. podem ser contaminados.

O milho e o amendoim possuem grande distribuição natural no Brasil<sup>2</sup> onde a sua produção tem se dado em torno de 300.000 toneladas, sendo 85% deste total oriundo da região Sudeste e o restante, distribuído entre as regiões Sul, Centro-Oeste e Nordeste (IBGE, 2010). A região Nordeste é o segundo maior polo consumidor no Brasil, com uma demanda regional superior a 50 mil toneladas ao ano (SANTOS *et al.*, 2005).

Associando-se à cadeia produtiva de milho e amendoim, as aflatoxinas são as principais micotoxinas e representam o maior perigo a saúde do homem. São produzidas principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* em condições favoráveis de umidade e temperatura (CAST, 2003). Outros tipos de micotoxinas apresentam-se como patogênicas. É o caso das Fumonizinas, Zearalenonas e Tricotecenos, produzidas pelo gênero *Fusarium*, a Ocratoxina “A”, produzida principalmente pelo *Aspergillus alutaceus*, dentre outros.

A contaminação por estes fungos é decorrente principalmente de falhas no controle da umidade e temperatura, tanto na produção quanto no armazenamento, que favorecem o desenvolvimento destes fungos, que são toxicogênicos e conseqüentemente, mediante o consumo humano, levam ao surgimento de casos de câncer<sup>3</sup>.

O número desses casos tem aumentado de maneira considerável em todo o mundo, principalmente a partir do século passado, configurando-se, na atualidade, como um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial (GUERRA, 2005). Com base em estudos epidemiológicos, analisou-se a relação entre câncer e nutrição (GARÓFOLO, 2004), chegando à conclusão que parte dos casos de câncer no mundo inteiro estão ligados ao consumo de alimentos (GUERRA, 2005). Nesse contexto surge a ideia de um controle de qualidade mais específico em diversos ramos alimentícios, evitando assim a possível ingestão de agentes carcinogênicos.

O presente estudo baseia-se na importância da existência de estudos que possam trazer um conhecimento mais aprofundado do atual cenário do município de Caruaru, no que se diz respeito ao controle de qualidade de alimentos que possam estar contaminados, refletindo na necessidade de análises mais rigorosas no âmbito industrial e comercial. Desta forma objetiva-se avaliar amostras de milho e amendoim provenientes da indústria e da feira de Caruaru - PE, quanto à presença ou ausência de fungos potencialmente produtores de micotoxinas.

## **METODOLOGIA**

Trata-se de um estudo Experimental que foi realizado com amostras de milho e amendoim a granel, oriundos da feira livre, e industrializados obtidos em pontos comerciais, ambas as amostras foram advindas do município de Caruaru - PE. O estudo foi desenvolvido em três etapas, onde a primeira foi centrada na seleção cuidadosa e aprofundada de referências bibliográficas que abordaram de maneira específica o assunto, almejando proporcionar um maior embasamento científico para desenvolver na melhor forma possível a seleção, coleta e análise laboratorial. A segunda fase foi feita a seleção e obtenção das amostras, e a terceira fase consiste na inoculação, isolamento, identificação e quantificação de potenciais fungos patógenos.

### **Crítérios de inclusão e exclusão**

Foram consideradas amostras de milho e de amendoim comercializadas em supermercados e na feira livre de Caruaru – PE. Apenas milho e amendoim destinados ao consumo humano, fizeram parte do corpo amostral desta pesquisa. Amostras aparentemente saudáveis e que não apresentem visivelmente características de contaminação.

Foram excluídas amostras de milho ou de amendoim industrializadas que apresentaram a embalagem violada, qualquer outra característica palatável que não seja natural ao grão (exógena). Amostras que apresentaram o milho ou amendoim misturados com outros tipos grãos ou fragmentos de plantas e produtos base ou derivados de milho e/ou amendoim, foram desconsideradas.

### **Obtenção da amostra**

#### **Procedimento para coleta de milho**

Para as amostras industrializadas segundo MAPA (2013) a coleta foi realizada nas gôndolas ou estoques dos supermercados, armazenados nos depósitos ou armazéns no âmbito de atacado, 10 marcas diferentes foram analisadas sob os seguintes critérios: Para lotes menores ou iguais a 50 kg as amostras foram selecionadas conforme especificação de peso, 16 pacotes (250 g) ou 8 pacotes de (500 g) ou 4 pacotes de 1 kg, seguindo os parâmetros explicitados no Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCR). Após obtenção da amostra global, o peso de cada pacote foi dividido por 10 duas vezes até a obtenção da amostra laboratorial. Ex:  $1k = 1000g$ ,  $1000g / 10 = 100g$ ,  $100g / 10 = 10g$ . Os pacotes passaram por um

breve processo de assepsia, que consiste na limpeza com álcool a 70% na parte superior do pacote onde foi executada a abertura do mesmo, por meio de bisturi estéril. As 10g foram obtidas da parte superior, média e inferior de cada pacote reduzindo assim a possibilidade de não encontrar fungos potencialmente patogênicos, que estejam dispersos ao longo da amostra.

“Para amostras a granel, segundo MAPA (2013) o lote em movimento é a situação ideal para a coleta, devendo ser realizada antes do empacotamento, nas operações de carga e descarga do produto. Quando não for possível proceder à movimentação do lote, devem ser retirados incrementos distribuídos de forma sistemática” o que configura – se como a forma ideal para a coleta dessa amostra. Os sacos de milho a granel dispostos ao longo da feira livre geralmente são de peso menor ou igual a 60 kg. Ex:  $60 \text{ kg} / 10 = 6 \text{ kg}$ ,  $6 \text{ kg} = 6000 \text{ g}$ ,  $6000 \text{ g} / 10 = 600 \text{ g}$ ,  $600 \text{ g} / 10 = 60 \text{ g}$ . A amostra consisti na análise de 10 sacos em pontos estratégicos da feira de Caruaru – PE, nos quais foram obtidos da porção superior, média e inferior de cada saco 60 g.

### **Procedimento para coleta de amendoim**

As amostras de amendoim com e sem casca, industrializados foram coletadas nas gôndolas e estoques de supermercados, armazenados nos depósitos ou armazéns no âmbito de varejo, conforme critérios do PNCR, foram obtidas 10 amostras 5 com casca e 5 sem casca, estas passaram pelo processo semelhante ao supracitado relativo ao milho, almejando assim a assepsia, remoção e obtenção da amostra de laboratório. O processo ainda se expandiu devido ao fato das amostras com casca terem que passar por um processo que corresponde a quebra da casca para obtenção de material inoculável.

Para amostras a granel obtidas na feira de Caruaru – PE, o procedimento foi o mesmo aplicado anteriormente a coleta de milho a granel, com a quantidade de 10 amostras, 5 com casca e 5 sem casca obtidas em 10 sacos diferentes dispostos ao longo da feira livre.

### **Processamento e inoculação dos grãos de milho e amendoim**

As amostras de amendoim e milho, industrializadas ou a granel foram previamente desinfetadas superficialmente com hipoclorito de sódio 1% <sup>4</sup>, em seguida procedeu-se a retirada da casca do amendoim para aquelas amostras nas quais não há consumo humano das cascas, essas que foram removidas de forma manual e asséptica utilizando placa de Petri e pinças devidamente esterilizadas, as amostras de amendoim seguem para processo de maceração

manual por meio de grau e pistilo esterilizados, já o milho foi moído em um moinho de facas, ambas as etapas visam à homogeneidade de cada amostra.

Para análise dos fungos segundo metodologia de Silva <sup>5</sup>, as amostras foram encaminhadas para o laboratório de microbiologia da Faculdade ASCES e pesadas asepticamente com vidro relógio, 10 g de cada amostra (Sujeito a modificações, devido a quantidade em produtos industrializados) foram transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 90 mL de água peptonada (0,1%) houve homogeneização manual, e em seguida diluições seriadas, de  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  e de cada diluição foi retirado 40  $\mu$ L, esses, que foram inoculados em placa de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) acrescido de cloranfenicol na concentração de 0,05 g/L, espalhando o inóculo com alça de Drigalsky até que todo o líquido fosse absorvido pelo meio. Após 15 min as placas foram incubadas, à temperatura ambiente ( $\pm 28$  °C), por 5-7 dias, sem inverter e no escuro, objetivando assim evitar possíveis interferências da foto fase. O isolamento e identificação começou a ser executado em um prazo mínimo de 3 dias após inoculação dependendo do crescimento e especificações colônias. Para colônias macroscopicamente indiferenciadas houve uma fase extra, que consiste no isolamento realizado com ASD acrescido de cloranfenicol em tubos inclinados <sup>6</sup>.

### **Identificação das colônias fúngicas por técnica de micro cultivo (Dalmau)**

A identificação das colônias foi realizada a partir da verificação da macroscopia colonial, que avalia as características visíveis a olho nu, e microscopia colonial, na qual consiste a avaliação da presença de microestruturas somáticas e reprodutivas por meio de micro cultivos (cultivo sob lamínula) através da técnica de Dalmau de microcultivo em lâmina <sup>7</sup> onde fragmentos das colônias são inoculados em três pontos equidistantes da placa contendo o meio ASD e sobre os inóculos são colocadas lamínulas previamente esterilizadas por meio de um processo que envolve embeber as lamínulas em álcool a 70%, e posterior flambagem. Em seguida, de 3 a 7 dias a lamínula do cultivo é invertida e utilizada para a preparação da lâmina corada com azul de Amann que segue para análise em microscópio óptico.

## RESULTADOS

Das 40 amostras analisadas 20 são de origem industrial em quanto 20 foram oriundas da feira livre de Caruaru – PE. Dentre as 10 amostras de milho a granel, todas apresentaram positividade nas diluições  $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$ . Os fungos encontrados foram: *Aspergillus flavus*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium napiforme*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium sp* (Tabela 1).

**Tabela 1:** Fungos identificados em amostras de Milho a granel

Fungos	Diluição			%
	$10^1$	$10^2$	$10^3$	
<i>Aspergillus flavus</i> (Figura 1)	P	P	P	13,64
<i>Fusarium solani</i>	P	P	P	45,45
<i>Fusarium oxysporum</i>	P	P	P	13,64
<i>Fusarium napiforme</i>	P	P	P	4,55
<i>Fusarium verticillioides</i>	P	P	P	18,18
<i>Penicillium sp</i>	P	P	P	4,55

**P: Presente, A: Ausente**

Para amostras de milho industrial os fungos encontrados foram *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus amstelodami*, *Fusarium solani*, *Fusarium napiforme*, *Fusarium udum*, *Fusarium tricinctum* e *Penicillium sp* (Tabela 2).

**Tabela 2:** Fungos identificados em amostras de Milho Industrial

Fungos	Diluição			%
	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	
<i>Aspergillus flavus</i>	P	P	P	4
<i>Aspergillus oryzae</i>	P	P	A	12
<i>Aspergillus amstelodami</i>	P	A	A	4
<i>Fusarium solani</i>	P	P	P	32
<i>Fusarium napiforme</i>	P	P	A	8
<i>Fusarium udum</i>	P	A	A	4
<i>Fusarium tricinctum</i>	P	A	A	4
<i>Penicillium sp (Figura 3)</i>	P	P	A	18

**P: Presente, A: Ausente**

As amostras de amendoim a granel foram positivas para *Cladosporium carrionii*, *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger* (Tabela 3). Houveram 3 amostras que não apresentavam fungos.

**Tabela 3:** Fungos identificados em amostras de Amendoim a granel

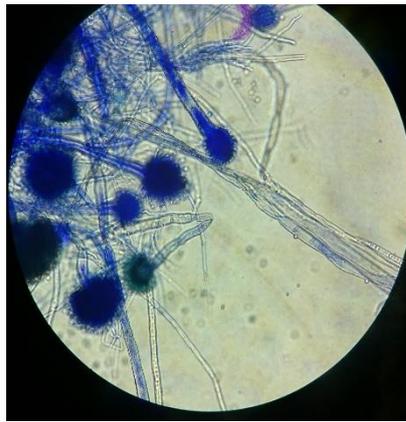
Fungos	Diluição			%
	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	
<i>Cladosporium carrionii</i>	P	A	A	15,38
<i>Fusarium solani</i>	P	P	P	30,77
<i>Fusarium niger (Figura 2)</i>	P	P	A	30,77
<i>Aspergillus fumigatus</i>	P	P	P	7,69
<i>Aspergillus flavus</i>	P	P	A	15,38

**P: Presente, A: Ausente**

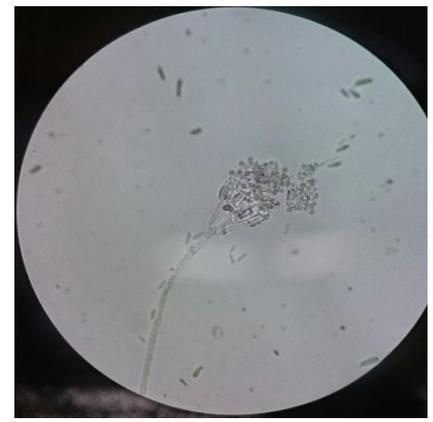
Nas amostras de amendoim industrial leveduras foram encontradas em três amostras. Já em 4 amostras houve a perda devido a contaminação, e nas amostras restantes não houve crescimento fúngico.



**Figura 1:** *Aspergillus flavus*, fonte: Acervo pessoal obtido através dessa pesquisa.



**Figura 1:** *Aspergillus niger*, fonte: Acervo pessoal obtido através dessa pesquisa.



**Figura 1:** *Penicillium sp*, fonte: Acervo pessoal obtido através dessa pesquisa.

## DISCURSSÃO

O objetivo desse estudo foi avaliar amostras de milho e amendoim provenientes da indústria e da feira de Caruaru - PE, quanto à presença ou ausência de fungos potencialmente produtores de micotoxinas. A hipótese inicial foi de que grãos de amendoim e milho comercializados no supermercado e na feira livre de Caruaru PE possam conter potenciais patógenos humanos.

Diante dos resultados obtidos fica claro o alto grau de contaminação dos alimentos, os fungos com sua capacidade de se adaptarem aos mais diversos ambientes, como exemplo, subsistirem na água, no solo e na vegetação o torna preocupante para a agricultura e indústria<sup>8</sup>. Nos procedimentos agrícolas e industriais existe vários processos que podem facilitar e/ou permitir a contaminação do alimento. A atividade da água (AW) de aproximadamente 0,70 a 0,90; A temperatura média ótima de 25° C a 30° C, porém o gênero *Aspergillus* prefere temperaturas superiores a 30° C, características da região nordeste; umidade acima de 13,5%; acidez graxa e condições sanitárias<sup>9</sup>.

Nos achados da pesquisa o *Aspergillus flavus* chama a atenção, visto que esse é o maior produtor de Aflatoxinas B1, que se apresenta como a micotoxina mais importantes, quando se diz respeito a contaminações em alimentos, devido sua capacidade citotóxica, mutagênica, carcinogênica e teratogênica<sup>10, 11</sup>. O *A. flavus* destaca-se por apresentar ampla

distribuição geográfica, por ser capaz de se adaptar a diversas origens de nutrientes, como árvores, algodão, grãos armazenados, madeira, insetos e animais em decomposição <sup>12</sup>. Assim o *A. flavus* pode ser considerado o maior responsável por contaminar com aflatoxinas alimentos de consumo humano, bem como de outros animais. O gênero *Fusarium* também foi encontrado em grande quantidade, desse gênero principalmente a espécie *verticillioides*, são produtores de Fumonisinás que possuem grande potencial carcinogênico, que parece não envolver interação com o DNA, sendo relacionadas principalmente ao câncer de esôfago. Possuem um grupo de 16 substâncias conhecidas até o momento, B1 (FB1, FB2, FB3 e FB4), A1, A2, A3, C1, C3, C4, P1, P2, P3, PH1a e PH1b <sup>13</sup>.

A presença de *Penicillium sp* nos alerta à produção de Ocratoxina ‘A’ que em testes laboratoriais todos os animais apresentaram sensibilidade a substância, é basicamente nefrotóxica, e foi relacionada ao câncer no sistema urinário na Europa Ocidental em áreas de exposição, além de ser comprovadamente carcinogênica e teratogênica em animais de laboratório <sup>8,14</sup>. É classificada no grupo 2B pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), ou seja, suspeito carcinógeno humano. O impacto das micotoxinas na saúde pública é voltado para o potencial mutagênico, carcinogênico e toxicidade específica a órgãos. Mesmo que esse potencial, em algumas micotoxinas, não tenha ainda sido comprovado em humanos seus efeitos em laboratório são notáveis, tem-se que pelo menos 14 destes compostos são carcinógenos, sendo as aflatoxinas as principais micotoxinas com potencial para desencadear o câncer <sup>15</sup>.

## CONCLUSÃO

O consumo de milho e amendoim no nordeste brasileiro é alto, sendo que estes grãos fazem parte culturalmente da alimentação desta região. Sabendo que o índice de contaminação fúngica é elevado nestas sementes, é de extrema importância a verificação e acompanhamento da presença destes micro-organismos no milho e amendoim. Por ser considerada uma cidade tipicamente junina, culturalmente em Caruaru – PE o consumo de milho e amendoim, bem como seus derivados é intenso na região. O que sugestivamente torna os caruaruenses propensos ao consumo de alimentos contaminados em algum momento pelos principais gêneros de fungos patogênicos, e conseqüentemente propensos a intoxicação por substâncias como as micotoxinas, motivo esse que grita por atenção dos setores da saúde pública acerca da problemática regional.

## REFERENCIAS

- 1- FACCA, M.; DALZOTO, P. Aflatoxinas: um perfil da situação do amendoim e derivados no cenário brasileiro. *Biológico*, São Paulo, v. 72, n. 1, p. 25-29, 2010.
- 2- MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. D. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 12, n. 1, p. 89-99, 2010.
- 3- ROCHA, M. D. D. et al. Incidência de aflatoxinas em amostras de amendoim e paçoca comercializadas na cidade de Alfenas-MG, Brasil. *Rev Bras Toxicol*, v. 21, n. 1, p. 15-9, 2008.
- 4- HERMANNNS, G. et al. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 1, p. 7-10, 2006.
- 5- SILVA, N. D.; JUNQUEIRA, V. C.; SILVEIRA, N. F. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. In: (Ed.). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*: Varela, 2001.
- 6- LACAZ, C. S. et al. *Tratado de micologia médica* Lacaz. São Paulo, p. 56-120, 2002.
- 7- DALMAU, L. M. Remarques sur la technique mycologique. Caractères macroscopiques des cultures de champignons. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*. 7: 536 - 541 p. 1929.
- 8- KAWASHIMA, L. M. Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil. 2004.
- 9- SASSI, F. Estudo sobre a presença de fungos e micotoxinas em barras de cereais e seus ingredientes. *Revista da Graduação*, v. 8, n. 2, 2015.
- 10- KLICH, M. A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular plant pathology*, v. 8, n. 6, p. 713-722, 2007.

- 11- HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.
- 12- HEDAYATI, M. et al. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, v. 153, n. 6, p. 1677-1692, 2007.
- 13- FREIRE, F. D. C. O. et al. *Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007.
- 14- PEREIRA, K. C.; DOS SANTOS, C. F. *Micotoxinas e seu potencial carcinogênico*. *Ensaio e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde*, v. 15, n. 4, p. 147-165, 2011.
- 15- JAY, J. M. *Microbiologia de alimentos*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 400-500, 2005.