



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

OCORRÊNCIA DE FUNGOS E AFLATOXINAS NO ARROZ

Tainá Luiza **Donnaruma**¹; Aline M. **Katsurayama**², Ligia M. **Martins**³, Beatriz T. **Iamanaka**⁴, Marta H. **Taniwaki**⁵

Nº 17201

RESUMO – O arroz é um dos cereais mais consumidos no mundo, e faz parte da dieta de milhões de pessoas. Um total de 126 amostras de arroz foram analisadas quanto a presença de fungos, atividade de água e aflatoxinas. As amostras foram plaqueadas em meio Dicloran Glicerol 18% agar (DG18) e incubadas a 25°C por 5 dias. A análise de aflatoxinas foi realizada utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. As espécies fúngicas mais comuns foram: *Eurotium* spp., *Aspergillus* section *Flavi* e *Aspergillus candidus*. Apenas 4 isolados de *Aspergillus* section *Flavi* foram produtores de aflatoxina B e um isolado de aflatoxinas B e G. O valor médio da atividade de água das amostras de arroz foi de 0,932, 0,672, 0,588 e 0,603 nas amostras do campo, armazenamento, processamento e comercial do Rio Grande do Sul, respectivamente e nas amostras comerciais do Estado de São Paulo a média foi 0,588. Das 126 amostras de arroz analisadas apenas duas amostras de arroz vermelho, apresentaram níveis de aflatoxinas acima do limite permitido pela legislação vigente.

Palavras-chaves: Arroz, fungos, aflatoxinas, *Aspergillus flavus*.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Biologia, PUCC, Campinas-SP; tdonnaruma@gmail.com

2 Colaborador, Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, ITAL, Campinas-SP

3 Colaborador, Doutorado em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP.

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

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



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

ABSTRACT – Rice is one of the most consumed cereals around the world and is part of diet of millions of people. A total of 126 rice samples was analyzed for fungi, water activity and the presence of aflatoxins. Samples were plated onto Dicloran Glycerol 18% agar (DG18) and incubated at 25°C for 5 days. Aflatoxin analysis was performed using high performance liquid chromatography. The most common fungal species was: *Eurotium* spp., *Aspergillus* section *Flavi* and *Aspergillus candidus*. Only four isolates of *Aspergillus* section *Flavi* was aflatoxin B producers and one aflatoxin B and G producers. The average of water activity was 0.932, 0.672, 0.588 and 0.603 in field, storage, processing and commercial samples of Rio Grande do Sul, respectively and in commercial samples of São Paulo, the average was 0.588. Out of 126 rice samples analyzed only two samples of red rices showed aflatoxin levels higher than maximum permitted level.

Keywords: Rice, fungi, aflatoxins, *Aspergillus flavus*.

1 INTRODUÇÃO

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

Dentre as micotoxinas encontradas no arroz, destacam-se com maior frequência as aflatoxinas (AFs), ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON), zearalenona (ZON) e fumonisinas (FUM) (Almeida et al. 2012). As condições de produção e processamento do arroz favorecem o desenvolvimento de fungos que podem produzir micotoxinas contaminando o alimento. O arroz pode ser infectado pelos fungos antes da colheita como *Fusarium* spp., e por fungos após a colheita durante a fase de secagem, ou armazenamento, como *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp (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 B₁ 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.

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

Nestas condições o presente projeto tem os seguintes objetivos: (i) analisar a presença de fungos produtores de aflatoxinas em amostras de arroz; (ii) determinar a atividade de água das amostras de arroz;



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

(iii) otimizar a metodologia de determinação de aflatoxinas no arroz e (iv) analisar a presença de aflatoxinas no arroz.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostra de arroz

Foram analisadas 126 amostras de arroz em diferentes etapas da cadeia de produção (campo, armazenamento, processamento e comercial), provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul (Camaquã, Itaqui, Porto Alegre e Pelotas) e São Paulo (Campinas e São Paulo). Aproximadamente de 1 a 2 kg de cada amostra foi coletada, conforme disponível.

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°C ±1°C

2.3 Análise Micológica

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 Agar Dicloran 18% glicerol (DG18). As placas foram incubadas à 25 °C por 5 dias. O resultado foi expresso em porcentagem de arroz infectado.

2.4 Identificação de fungos e análise da capacidade toxigênica

Os fungos do gênero *Aspergillus* foram isolados em meio Ágar Extrato de Levedura Czapeck (CYA) e identificados segundo KLICH (2002), VARGA et al. (2011).

Depois da identificação, os isolados potencialmente produtores de aflatoxina, foram inoculados em meio Agar Extrato de Levedura e Sacarose (YESA) e encubados por 7 dias à 25°C e em seguida aplicada a técnica de Agar plug associada a cromatografia de camada delgada (CCD), segundo FILTENBORG 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 qualitativo 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 (R-



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

Biopharm Rhône Ltd, Reino Unido), 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, Reino Unido) para derivatização pós-coluna das aflatoxinas. A fase móvel foi água:acetoneitrila: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

3.1 Micobiota e atividade de água do arroz do Rio Grande do Sul e São Paulo

Os valores de atividade de água nas amostras analisadas estão apresentados na Tabela 1. O valor médio obtido foi de 0,932, 0,672, 0,588 e 0,603 nas amostras do campo, armazenamento, processamento e comercial do Rio Grande do Sul, respectivamente e nas amostras comerciais do Estado de São Paulo a média foi 0,588. O plaqueamento direto do arroz apresentou porcentagens médias de infecção de 97,8%, 78,17%, 30,19% e 14% nas amostras do campo, armazenamento, processamento e comercial do Rio Grande do Sul, respectivamente e nas amostras comerciais do Estado de São Paulo a média foi 13,7%.

Tabela 1. Número de amostras, média de atividade de água, média de infecção (%) das amostras de arroz do Rio Grande do Sul (RS) e São Paulo (SP).

Etapa	Nº amostras	Média a_w (variação)	Média infecção
Campo			
RS	9	0,932 (0,894 - 0,973)	97,8%
Armazenamento			
RS	12	0,672 (0,516 - 0,865)	78,17%
Processamento			
RS	26	0,588 (0,465 - 0,749)	30,19%
Comercial			
RS	25	0,603 (0,503 - 0,719)	14%
SP	54	0,588 (0,474 - 0,684)	13,7%

As amostras com maior atividade de água (amostras de etapas anteriores ao processamento) apresentaram uma maior infecção de fungos. A Tabela 2 mostra a diferença da micobiota de acordo com



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

cada etapa de produção. Em geral na etapa do campo os fungos mais comuns foram: *Fusarium spp.*, e fungos do grupo dematiáceos. Esta frequência pode estar relacionada com o fator atividade de água (a_w), no qual as amostras de campo apresentaram uma média de 0,932. Dependendo de quanto tempo o arroz ficou no campo a a_w vai decrescendo, mas os esporos dos fungos que infectaram o arroz no campo podem permanecer até a fase de armazenamento. As espécies de *Fusarium* são consideradas fungos de campo, que invadem os grãos e sementes durante o amadurecimento (MARIN et al. 1998), bem como os fungos dematiáceos como as espécies de *Alternaria*, *Nigrospora*, *Phoma* entre outros. Nas etapas do armazenamento e processamento no Rio Grande do Sul foram encontrados *Eurotium spp.*, *A. section Flavi* e *A. candidus* que são considerados fungos xerofílicos i.e. crescem em atividade de água mais baixa a partir de 0,85; as espécies provenientes do campo como os fungos do grupo dematiáceos permaneceram nestas etapas. Em algumas amostras do comércio do Rio Grande do Sul e São Paulo houve uma predominância das espécies de *Eurotium* e outras espécies como *A. section Flavi*, *A. candidus* e os fungos do grupo dematiáceos também apareceram. Algumas amostras de arroz branco polido e parboilizado polido não apresentaram nenhuma infecção fúngica, provavelmente devido ao processo de beneficiamento que inclui polimento e parboilização do arroz que acaba eliminando os fungos.

Tabela 2. Espécies e gêneros de fungos mais frequentes no arroz em cada etapa do processo nos Estados do Rio Grande do Sul (RS) e São Paulo (SP)

Etapa	Gênero ou grupo predominante	Outras espécies e gêneros
Campo		
RS	Fungos dematiáceos	<i>Fusarium spp.</i>
Armazenamento		
RS	Fungos dematiáceos	<i>Eurotium sp</i> , <i>Fusarium sp</i> , <i>A. section Flavi</i>
Processamento		
RS	<i>Eurotium sp</i>	<i>A. candidus</i>
Comercial		
RS	<i>Eurotium sp</i>	Fungos dematiáceos, <i>A. candidus</i>
SP	<i>Eurotium sp</i>	<i>A. section Flavi</i> , fungos dematiáceos, <i>A. candidus</i>

A micobiota natural de grãos segue uma sucessão típica desde os estádios iniciais de desenvolvimento no campo até o final da estocagem. *Fusarium*, e fungos dematiáceos como encontrados no presente estudo são predominantes no campo e infectam o arroz antes da colheita, enquanto que as espécies de *Aspergillus* tendem a predominar durante a estocagem. Em a_w menores que 0,75 os fungos mais xerofílicos como as espécies de *Eurotium* são capazes de crescer (MARIN et al., 1998; PITT & HOCKING, 2009). O crescimento fúngico no arroz pode ser prevenido pela secagem até a_w abaixo de 0,65 e



manutenção desta a_w durante todo o período de estocagem até o consumo. Havendo um aumento da umidade durante a estocagem, existe a possibilidade do desenvolvimento de vários fungos.

3.2 Teste de produção de aflatoxinas pelas cepas de *Aspergillus section Flavi* isolados do arroz e do solo

Um total de 252 e 32 cepas de *Aspergillus section Flavi* foram isoladas das amostras do Rio Grande do Sul e São Paulo, respectivamente. Somente cinco cepas isoladas do arroz do comércio do Estado de São Paulo foram positivas para a produção de aflatoxinas, sendo 4 produtoras de aflatoxina B e 1 produtora de aflatoxinas B e G. A Tabela 3 mostra o tipo de arroz de onde as cepas produtoras de aflatoxinas foram isoladas. As cepas do Rio Grande do Sul não foram produtoras de aflatoxinas.

Tabela 3. Cepas de *Aspergillus section Flavi* produtoras de aflatoxinas do arroz.

Tipo Amostra	Origem	Afla B+	Afla BG+
Arroz Vermelho	SP	1	-
Arroz Negro	SP	-	1
Arroz Integral	SP	1	-
Arroz Integral+Vermelho	SP	2	-

3.3 Análise de aflatoxinas no arroz

Foi feita a validação das metodologias, obtendo-se a recuperação média total de 81,60%, limite de detecção (LOD) total de 0,04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e limite de quantificação (LOQ) total de 0,14 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagem de recuperação, limite de detecção e limite de quantificação

Validação	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
média % recuperação	93,94	82,99	77,71	71,74
LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,016	0,012	0,011	0,004
LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,054	0,039	0,038	0,012

Das 126 amostras de arroz analisadas apenas 14 apresentaram níveis detectáveis de aflatoxinas, sendo que a maioria estava abaixo com níveis bem baixo como mostra a Tabela 5. Apenas duas amostras de arroz vermelho, coletadas na cidade de São Paulo apresentaram altos níveis, sendo 23,37 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 70,91 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Estes níveis estão bem acima do limite permitido pela RDC 07/2011 (ANVISA) de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$.



Tabela 5. Incidência de aflatoxinas ($\mu\text{g}/\text{kg}$) em amostras de arroz do Rio Grande do Sul (RS) e São Paulo. (SP).

Etapa	Níveis de aflatoxinas ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Campo (RS)	ND* - 2,95
Armazenamento (RS)	ND – 0,60
Processamento (RS)	ND – 0,70
Comercial	
RS	ND – 0,25
SP	ND – 70,91

* Limite de detecção: 0,04 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Apesar do arroz vermelho não ser amplamente consumido pela população, esses dados são preocupantes, pois apresentam alto risco para o consumidor deste tipo de arroz, principalmente pelo alto nível de aflatoxinas detectado.

4 CONCLUSÃO

A maioria das amostras de arroz mais consumidas pela população brasileira (polido, integral e parboilizado) não apresentou aflatoxinas e o número de fungos potencialmente produtores desta toxina foi baixo. As amostras que apresentaram níveis de aflatoxinas maior que o limite máximo tolerável estabelecido pela ANVISA ($< 5 \mu\text{g}/\text{kg}$) foram as amostras comerciais de arroz vermelho de São Paulo.

5 AGRADECIMENTOS

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

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. I.; ALMEIDA, N. G.; CARVALHO, K. L.; GONÇALVES, G. A.; SILVA, C. N.; SANTOS, E. A.; GARCIA, J. C.; VARGAS, E. A. Co-occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂, ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol, and citreoviridin in rice in Brazil. **Food Additives and Contaminants Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 29, p. 694-703, 2012.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA. **Resolução nº 7**, de 18 de fevereiro de 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.; Frisvad, J. C.; Svendsen, J. A. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, p. 581-585, 1983.



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

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 pp. 489-521, 1993.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species.** The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 116p.

MARIN S.; SANCHIS, V.; SÀENZ, R.; RAMOS, A. J.; VINAS, I.; Magan N. Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from maize grain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 25-36, 1998.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**, 3rd ed. New York: Springer, 2009. 519p.

STROKA, J.; ANKLAM, E.; JORISSEN, U.; GILBERT, J. 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. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 83, p. 320-340, 2000.

VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 57-80, 2011.