

# Pesquisa de fungos produtores de ocratoxina A em granola comercializada

## Ochratoxin A-producing fungi in commercial granola

RIALA6/1565

Marta Rejane Ribeiro dos SANTOS<sup>1\*</sup>, Francisco das Chagas CARDOSO FILHO<sup>2</sup>, Vânia Batista de Sousa LIMA<sup>2</sup>, Antônio William Barbosa de SOUSA<sup>3</sup>, Mikaela Lopes de CALDAS<sup>4</sup>, Maria Christina Sanches MURATORI<sup>5</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus da Socopo, Centro de Ciências Agrárias, Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento de Alimentos, CEP: 64049-550 Teresina, PI, Brasil, E-mail: marta.estrela@ig.com.br

<sup>2</sup>Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

<sup>3</sup>Médico veterinário autônomo.

<sup>4</sup>Universidade Estadual do Piauí, Teresina, PI, Brasil.

<sup>5</sup>Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.

Recebido: 08.04.2013 - Aceito para publicação: 26.08.2013

### RESUMO

Este trabalho efetuou a identificação das espécies fúngicas presentes na granola e analisou a capacidade das cepas produzirem ocratoxina A. As amostras foram adquiridas no comércio do município de Teresina-Piauí, no total de 60 amostras de quatro diferentes marcas. Foram realizadas as metodologias de contagem, isolamento e identificação das espécies fúngicas; e as cepas da seção *Nigri* foram testadas quanto à capacidade de produção de ocratoxina A. Em 11 das amostras analisadas não houve o crescimento fúngico, e nas amostras em que houve os valores chegaram a 5,17 log<sub>10</sub> UFC/g. Houve diferença significativa (p < 0,05) entre as diferentes marcas de granola analisadas. Os gêneros fúngicos mais frequentemente isolados foram *Cladosporium* (46,9 %), seguido de *Aspergillus* spp. e seus teleomorfos (37,4 %), e do gênero *Penicillium* spp. (5,4 %). A amostra de granola da marca A apresentou contagens bem mais elevadas do que as demais, o que indica que possivelmente tenha ocorrido falhas em alguma(s) etapa(s) do processo de industrialização. Todas as cepas isoladas de *Aspergillus* seção *Nigri* não apresentaram capacidade de produção de ocratoxina A.

**Palavras-chave.** *Aspergillus*, aveia, cereal, micotoxinas, milho.

### ABSTRACT

The present study aimed at identifying the fungal species occurring in granola, and to verify the ability of the strains in producing ochratoxin A. Sixty granola samples of four different brands were purchased in commercial establishments located in the city of Teresina – Piauí state. The fungi were counted, isolated and the species were identified, and the section *Nigri* strains were tested for detecting their ability in producing ochratoxin A. No fungal growth was found in 11 of the analyzed samples. In samples showing fungal growth, it was as high as 5.17 log<sub>10</sub> CFU/g. A significant difference (p<0.05) among the analyzed granola brands was found. The most frequently isolated fungus genus was *Cladosporium* (46.9 %), followed by *Aspergillus* spp and its teleomorphs (37.4 %), and *Penicillium* spp. (5.4 %). The granola brand A showed the highest counting among the analyzed brands, which demonstrated that a possible failure at some stages of the industrialization process might be occurred. None of the isolated *Aspergillus* section *Nigri* strains showed the ability in producing ochratoxin A.

**Keywords:** *Aspergillus*, oatmeal, cereal, mycotoxins, corn.

## INTRODUÇÃO

Alimentos com propriedades funcionais, como a granola, vêm a cada dia ganhando espaço nos supermercados. A granola é um composto alimentar rico em fibras, formado pela mistura de grãos de cereais, frutas secas, linhaça, trigo, flocos de milho e de arroz, sementes oleaginosas, como o amendoim e a castanha-do-pará. Além das propriedades nutricionais, é um alimento de excelente sabor, elevado valor energético e vem apresentando crescente consumo<sup>1,2</sup>.

Micro-organismos são indesejáveis nos alimentos, principalmente fungos, porque são capazes de produzir uma grande variedade de enzimas que, agindo sobre os mesmos, provocam sua deterioração. Os fungos têm sido evidenciados como micro-organismos de grande importância para os alimentos. Estes têm sido responsáveis por perdas econômicas de relevância, o que representa uma série de prejuízos em todo o mundo<sup>3,4</sup>, devido a deterioração dos alimentos e a capacidade de produzir micotoxinas, que são metabólitos secundários com potencial tóxico para o homem e os animais, depois de ingeridos<sup>5</sup>.

Existem mais de 100 espécies fúngicas produtoras de micotoxinas, que podem produzir mais de 400 diferentes tipos de micotoxinas, sendo que dessas mais de 250 já tiveram sua estrutura química definida. Os principais fungos produtores de micotoxinas pertencem aos gêneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia* e *Stachybotrys*, dentre eles destacam-se os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, que são considerados os de maior importância para alimentos, por produzirem uma maior variedade e quantidade de micotoxinas<sup>4,6</sup>.

As ocratoxinas são uma das principais micotoxinas encontradas em alimentos, naturalmente produzidas por fungos das espécies *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* e *Penicillium verrucosum*. Existem sete tipos de ocratoxinas, sendo a ocratoxina A (OTA) o metabólito primário mais abundante e tóxico dentre as ocratoxinas encontradas na natureza<sup>7,8</sup>. É classificada pelo IARC (International Agency for Research on Cancer) como um agente possivelmente carcinogênico para humanos<sup>9</sup>. As ocratoxinas têm sido encontradas em diferentes tipos de alimentos, incluindo o trigo, milho, café, cacau, cevada, cerveja, figos secos, centeio, queijo, pão, uvas, feijão seco, grãos de soja, frutas cítricas, castanhas do Brasil, tabaco mofado, presunto curado, amendoins e demais produtos similares<sup>8,10</sup>.

Atualmente trabalhos envolvendo a qualidade de produtos naturais são escassos, tendo em vista isso, esse trabalho objetivou identificar as espécies fúngicas presentes na granola comercializada em Teresina, Piauí, Brasil e verificar a capacidade das cepas de produzirem OTA.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta das amostras

As amostras de granola foram adquiridas no comércio do município de Teresina-Piauí, coletadas de forma aleatória, totalizando sessenta (60) amostras de quatro (4) diferentes marcas, correspondendo a um total de 15 amostras por marca (designadas pelas letras A, B, C e D). As mesmas estavam lacradas e dentro do prazo de validade, acondicionadas em prateleiras, à temperatura ambiente do local. O período da coleta foi de novembro de 2010 a março de 2011. Após a coleta elas foram encaminhadas ao Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento de Alimentos (NUEPPA), do Centro de Ciências Agrárias, pertencente à Universidade Federal do Piauí, para a realização das análises.

### Contagem de fungos filamentosos e leveduras

As amostras foram trituradas em liquidificador e de cada uma foram retirados e pesados asepticamente 25 gramas de granola e posteriormente adicionado a 225 mL de água peptonada a 0,1 %, obtendo-se assim uma diluição inicial de  $10^{-1}$ . A partir dessa diluição foram preparadas diluições decimais até  $10^{-3}$ , as quais foram utilizadas para a contagem e o isolamento de fungos.

Para contagem de fungos e leveduras, realizou-se a técnica de semeadura em superfície, em que foi inoculado 0,1 mL das diluições em placas de Petri contendo o Ágar Dichloran Rose Bengal Clorafenicol (DRBC) em duplicata. Com o auxílio de alça de Drigalski, foi espalhado o inóculo por toda a superfície do meio, até sua completa absorção, e incubou-se por sete dias à temperatura de 25 °C. Após esse período, foram selecionadas as placas que apresentarem contagem entre 10 a 100 unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g), conforme Dalcerro et al<sup>11</sup>.

### Isolamento e identificação da microbiota fúngica

Após as contagens das colônias, foi realizada a visualização microscópica para a identificação dos gêneros fúngicos. As colônias fúngicas pertencentes

ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium* foram identificadas utilizando as chaves de identificação descritas por Klich e Pitt<sup>12</sup>, baseadas na semeadura em quatro meios básicos: Czapek yeast extract agar (CYA); malt extract agar (MEA); Czapek yeast extract agar 20 % sucrose (CY20S) e Agar 25 % Glicerol Nitrate (G25N). Foi preparada uma suspensão de conídios a partir de cada cepa em 0,5 mL de meio constituído de 0,2 % de agar-agar e 0,05 % de Tween 80TM, distribuído em microtubos tipo *ependorf* previamente esterilizados a 121 °C por 15 minutos<sup>13</sup>. A seguir, foi introduzida a agulha de platina na suspensão de conídios, e foram inoculadas em três pontos equidistantes nas placas contendo CYA, MEA, CY20S e G25N. Estas placas foram incubadas por sete dias a 25 °C.

### Produção de Ocratoxina A (OTA) por *Aspergillus* da seção *Nigri*

Todas as cepas de *Aspergillus* seção *Nigri* isoladas das amostras foram testadas para produção de OTA. Utilizou-se a metodologia descrita por Bragulat et al<sup>14</sup>. As cepas foram cultivadas em agar Czapeck extrato de levedura (CYA) a 28 °C por 7 dias. Três pedaços do agar foram retirados da área central da colônia, pesados e introduzidos em um pequeno frasco. Um volume de metanol (1000 µL) foi adicionado a cada frasco, a mistura de amostras de solvente foi centrifugada por 10 min a 10000 rpm, e o sobrenadante foi filtrado e evaporado até à secura sob N<sub>2</sub>. O resíduo foi redissolvido em metanol e os extratos analisados por cromatografia em camada delgada (CCD). O eluente foi tolueno: acetato de etila: clorofórmio: ácido fórmico (70:50:50:10).

Duas soluções de trabalho foram utilizadas, conforme as necessidades dos procedimentos, nas concentrações de 4,0 µg/mL e 0,4 µg/mL. Para fins de cálculo e verificação de linearidade do método empregado uma curva padrão de 7 pontos foi feita contendo concentrações de 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 µg/L.

Após a eluição dos solventes a placa foi retirada e seca para observação sob luz UV, com comprimento de onda 333 nm.

### Análise estatística

Os resultados das contagens foram transformados em log<sub>10</sub>, correlacionados e realizada a análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de média de acordo com os procedimentos do pacote estatístico Sigma Stat<sup>15</sup> ao nível de significância de 5,0 %.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os trabalhos existentes na literatura a respeito da microbiota toxígena da granola são escassos.

Na Tabela 1, encontram-se os resultados das contagens de fungos filamentosos e leveduras isolados de quatro marcas de granolas comercializadas em Teresina, Piauí.

**Tabela 1.** Média das contagens de fungos filamentosos e leveduras, isolados das granolas comercializadas em Teresina, Piauí

Marcas	Médias das contagens fúngicas (log <sub>10</sub> UFC/g)	Desvio padrão	Variação
A (n=15)	4,87 <sup>a</sup>	0,79	2,91 – 5,37
B (n=15)	2,45 <sup>b</sup>	0,49	1,69 – 3,47
C (n=15)	0,88 <sup>c</sup>	1,04	0 – 2,70
D (n=15)	1,86 <sup>c</sup>	1,09	0 – 3,17

UFC/g= unidade formadora de colônias por grama; (P=<0,001); n= amostras; letras iguais não diferem estatisticamente

A contagem fúngica foi feita por meio de enumeração de propágulos fúngicos e as médias foram expressas por unidades formadoras de colônia por grama de amostra analisada em log<sub>10</sub> UFC/g (Tabela 1). Das 60 amostras pesquisadas, em 11 (18,3 %) delas não houve o crescimento fúngico, sendo que essas eram oriundas das marcas C (8 amostras, 13,3 %) e D (3 amostras, 5 %). Já nas amostras em que houve crescimento fúngico, esses valores chegaram a 5,17 em log<sub>10</sub> UFC/g. Houve diferença significativa a (p < 0,05) entre as diferentes marcas de granola analisadas. Sendo que a amostra do grupo A apresentou o maior número de colônias fúngicas (4,87 log<sub>10</sub>), tendo sido considerada a mais contaminada, seguida pelo grupo B. As que apresentaram a menor média de contaminação foram as dos grupos C e D, que não diferiram significativamente.

A resolução RDC nº 12/2001 não faz referência à contagem de fungos e leveduras em granola<sup>16</sup>. A comparação dos resultados obtidos nesta pesquisa foi feita com base nos limites máximos de bolores e leveduras estabelecidos pela legislação brasileira para produtos considerados semelhantes, como é o caso do grupo das farinhas, massas alimentícias, produtos de panificação (industrializados e embalados) e similares, também não possuem referência quanto à contagem de fungos e leveduras. Embora esse tipo de produto não seja contemplado na legislação, sabe-se que a presença de fungos nos alimentos leva a modificações nas

características organolépticas, levando a uma significativa diminuição da qualidade. Além disso, os fungos podem produzir micotoxinas e causar diversos problemas à saúde dos homens e animais<sup>17</sup>.

A Tabela 2 mostra a ocorrência de fungos filamentosos isolados da granola adquiridas em estabelecimentos comerciais de Teresina, Piauí. Todas as marcas analisadas apresentaram contaminação por diferentes gêneros fúngicos, sendo que nem todas as amostras apresentaram desenvolvimento de bolores e leveduras; a literatura cita que algumas dessas cepas podem ser potencialmente capazes de produzir micotoxinas, o que pode representar um risco potencial para a saúde humana<sup>13</sup>. Foram isoladas 147 colônias fúngicas, pertencentes a 9 gêneros fúngicos. Os gêneros mais frequentemente isolados foram: *Cladosporium* spp. (46,9 %), *Aspergillus* spp. e seus teleomorfos (37,4 %), e *Penicillium* spp. (5,4 %). Outros gêneros foram encontrados, porém com uma frequência de isolamento menor.

**Tabela 2.** Frequência Absoluta e Frequência Relativa (%) dos gêneros fúngicos isolados das amostras de granolas comercializadas em Teresina-Piauí, no período de novembro de 2010 a março de 2011

Gêneros Fúngicos	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
<i>Cladosporium</i>	69	46,9
<i>Aspergillus</i> e seus teleomorfos	55	37,4
<i>Penicillium</i>	08	5,4
<i>Absidia</i>	04	2,7
<i>Botrytis</i>	03	2,0
<i>Fusarium</i>	03	2,0
<i>Curvularia</i>	02	1,4
<i>Mucor</i>	02	1,4
<i>Stachybotrys</i>	01	0,7
Total	147	100,0

Em trabalho realizado por Vecchia e Castilhos-Fortes<sup>2</sup>, foram analisadas amostras de granola comercializadas a granel, e verificado o crescimento de vários gêneros fúngicos como: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Alternaria*. Tais resultados são semelhantes aos encontrados neste trabalho, uma vez que confirmam os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* como uns dos mais frequentemente isolados em amostras de granola (Tabela 2).

A presença de fungos do gênero *Aspergillus* merece atenção cautelosa, pois é sabido que algumas espécies desse gênero são capazes de produzir aflatoxinas e são comumente encontradas em amendoim, sementes e grãos<sup>12</sup>. Como a granola é composta por cereais, pode-se

dizer que os resultados encontrados quanto à presença de *Aspergillus* estão de acordo com a citação acima.

De acordo com Ribeiro et al<sup>18</sup>, o gênero *Aspergillus* é considerado como o principal deteriorador de sementes e grãos, causando danos, descoloração e alterações nutricionais, bem como a produção de micotoxinas, que são produtos tóxicos do metabolismo secundário, e atualmente representam um risco de contaminação ambiental, acarretando sérios prejuízos à saúde humana.

Embora o gênero *Cladosporium* tenha sido o mais isolado dentre os fungos nesse trabalho, é sabido que ele até hoje não é considerado um problema em saúde pública, pelo fato de não produzir micotoxinas e não ser o principal deteriorador de alimentos, quando comparado a outros gêneros. Atualmente, a presença de *Cladosporium* spp. está relacionada com a deterioração de tomates.

Outro gênero fúngico de importância, quando se trata de alimentos, é o *Fusarium*. Os resultados encontrados no presente trabalho foram semelhantes aos obtidos por Vecchia e Castilho-Fortes<sup>2</sup>, com uma baixa incidência do gênero *Fusarium* nas amostras de granola pesquisadas.

Em pesquisas realizadas com produtos que fazem parte da composição da granola foi possível verificar resultados interessantes, Roigé et al<sup>19</sup> analisando trigo, encontrou os gêneros como os mais frequentes: *Penicillium* (42 %), *Fusarium* (27 %) e *Alternaria* (25 %), resultados diferentes dos encontrados nas amostras de granola, demonstrando que a microbiota presente no trigo, não reflete no produto final granola. Em relação à contaminação natural por fungos na aveia, Rupollo et al<sup>20</sup> observou uma maior população de fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, resultados esses semelhantes aos encontrados no presente trabalho.

Os gêneros *Aspergillus* e o *Penicillium*, são fungos de extrema importância uma vez que são considerados os principais produtores de micotoxinas em alimentos. A Tabela 3 mostra a identificação das espécies isoladas desses dois gêneros por marca de granola comercializadas em Teresina, Piauí.

Verificou-se que, dentre as marcas estudadas, a que apresentou a maior diversidade de espécies fúngicas foi a marca A, e que houve a menor variedade foi a marca C. Dentre as marcas, a que apresentou maior crescimento de *Aspergillus* foi a marca A, totalizando 44 cepas.

A redução da contaminação fúngica nos alimentos destinados ao consumo é de essencial importância para

**Tabela 3.** Identificação das espécies fúngicas de granola comercializadas por marcas em Teresina-Piauí, no período de novembro de 2010 a março de 2011

Espécies fúngicas	Marca			
	A	B	C	D
<i>Aspergillus</i>	FA	FA	FA	FA
<i>A. niger agregados</i>	5	2	-	-
<i>A. carbonarium</i>	2	-	-	-
<i>A. japonicus</i>	10	1	-	-
<i>A. flavus</i>	27	1	1	2
<i>A. tamari</i>	-	1	1	-
<i>A. terreus</i>	-	-	-	1
<i>A. penicillioides</i>	-	-	-	1
Total	44	5	2	4
<i>Penicillium</i>	-	-	-	-
<i>P. citrinum</i>	2	-	-	1
<i>P. simplicissimum</i>	2	-	-	-
<i>P. funiculosum</i>	-	1	-	-
<i>P. eslandium</i>	-	1	-	-
<i>P. variable</i>	-	-	-	1
Total	4	2	0	2
Total geral por marcas	48	7	2	6

FA = Frequência Absoluta

evitar as perdas na produção de alimentos e também ao risco sanitário para o homem. Essas condições podem ser conseguidas melhorando o transporte, as condições de armazenamento da matéria-prima, produção e comercialização do produto final.

Todas as cepas identificadas de *Aspergillus* da seção *Nigri* foram testadas quanto à capacidade de produção de ocratoxina A, porém nenhuma das cepas pesquisadas demonstrou essa capacidade.

## CONCLUSÃO

Conclui-se que a marca A de granola apresentou contagens bem mais elevadas que as demais, demonstrando que possivelmente em alguma(s) etapa(s) do processo de industrialização tenha ocorrido falhas. Foi possível isolar uma variedade de cepas de fungos, porém, nenhuma demonstrou capacidade para produzir ocratoxina A.

## REFERÊNCIAS

- Granada G, Rosa V, Zambiasi R, Koetz P. Caracterização de granolas comerciais. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2003;23(1):87-91.
- Vecchia AD, Castilhos-Fortes R. Contaminação fúngica em granola comercial. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007;27(2):324-7.
- Dantigny P, Guilmar A, Bensoussan M. Basis of predictive mycology. *Int J Food Microbiol*. 2005; 100:187-96.
- Pereira MMG, Carvalho EP, Prado G, Rosa CAR, Veloso T, Souza LAF, et al. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil. *Ciênc Agrotec*. 2005;29(1):106-12.
- Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16(3):497-516.
- Paterson RRM, Venâncio A, Lima N. Solutions to *Penicillium* taxonomy crucial to mycotoxin research and health. *Res Microbiol* 2004; 155(7): 507-13.
- Magnoli C, Astoreca A, Ponsone L, Combina M, Palácio G, Rosa CAR, et al. Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. *Lett App Microbiol* 2004;39: 326-34.
- Welke JE, Hoeltz M, Noll IB. Aspectos relacionados à presença de fungos toxigênicos em uvas e aocratoxina A em vinhos. *Ciênc Rural*. 2009;39(8):2567-75.
- International Agency of Reserch on Cancer-IARC. Evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances: aromatic amines and mycotoxins. 2006; 245-395.
- Jay JM. *Microbiologia de alimentos*. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
- Dalcerro A, Magnoli C, Chiacchera S, Palacios G, Reynoso M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*. 1997;137(3):179-84.
- Klich MA, Pitt JI. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. CDIRO, Division of food research Sydney, academic Press; Austrália. 1998
- Pitt JI, Hocking AD. *Fungi and spoilage*. 3 ed. London: Blackie academic and Professional; 2009
- Bragulat MR, Abarca ML, Cabañes FJ. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *Int J Food Microbiol*. 2001;71:139-44.
- Sigma Stat for windows version 1.0. Jandel Corporation. 1994.
- Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n.12 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan 2001. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa/rdc\_12]. [Acesso: 2010 ago. 30].
- Council for Agricultural Science and Technology – CAST. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems, Task Force Report N°139. 2003.
- Ribeiro SAAL, Cavalcanti MAQ, Fernandes MJS, Lima DMM. Fungos filamentosos isolados de produtos derivados do milho comercializados em Recife, Pernambuco. *Rev Bras Bot*. 2003; 26(2):223-9.
- Roigé MB, Aranguren SM, Riccio MB, Pereyra S, Soraci AL, Tapia MO. Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. *Iberoam Micol*. 2009;26(4):233-7
- Rupollo G, Gutkoski LC, Martins IR, Elias MC. Efeito da umidade e do período de armazenamento hermético na contaminação natural por fungos e a produção de microtoxinas em grãos de aveia. *Ciênc Agrotec*. 2006;30(1):118-25.