



Identificação de fungos filamentosos em derivados de milho comercializados em Primavera do Leste – MT

Identification of filamentous fungi in derivatives maize traded in Primavera do Leste – MT

Recebido em 04/10/2011

Aceito em 15/01/2012

José Advailton Alencar Costa^{1*} & Gisele Neumann Zanella²

Curso de Farmácia da Faculdade de Ciências Humanas Biológicas e da Saúde, Departamento de Microbiologia, CEP 78850-000, Primavera do Leste, MT, Brasil

RESUMO

O milho é um produto muito suscetível à contaminação por fungos muitas vezes, facilitada pelas condições de armazenagem dos grãos. Por estar muito presente na alimentação humana tanto *in natura* como em seus produtos manufaturados, torna-se um possível veículo de fungos e seus metabólitos aos consumidores. Este trabalho avalia a presença de fungos filamentosos em derivados de milho identificando diferentes gêneros dentre eles os micotoxigênicos. Para seu desenvolvimento, foram escolhidas amostras de dois derivados de milho, farinha e fubá, sob as mesmas condições de armazenamento em diferentes locais de comercialização na cidade de Primavera do Leste - MT. As amostras foram semeadas em diferentes diluições em meio de cultura Ágar Sabouraud-Dextrose (ASD), tendo adicionado cloranfenicol. As técnicas de semeadura e microcultivo para contagem de colônias e identificação de fungos foram realizadas de acordo com o manual de Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Os resultados demonstraram contaminação em todas as amostras de fubá e em duas das três amostras de farinha, estando dentro dos limites de contaminação estabelecidos pela ANVISA. Nos dois derivados, foram encontrados os gêneros de fungos filamentosos: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp., os mesmos potencialmente micotoxigênicos

Palavras-chave: Grãos de milho, Contaminação fúngica, Micotoxinas

ABSTRACT

The corn is a product very susceptible to contamination by fungus are often those contaminations, facilitated by storage conditions which the grains. Being a very present in the alimentation *in native* as of its manufactured products, makes is a possible vehicle fungus and their metabolic to consumers. This study search evaluates the presence of fungus existent in products derived corn identifying the different genres mycotoxigenic among them. To development of this work were chosen two different samples derived from corn, corn flour and maize flour under the same storage conditions at different places of commercialization in the city of Primavera do Leste - MT. The samples were sown in different dilutions in culture mid Agar Sabouraud - dextrose (SDA), with the addition of chloramphenicol. Where were performed sowing technic and microculture to counting of colonies and identification of fungus accordance with the Manual of Detection and Identification of Fungus Medical Importance of the Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). The results demonstrated mold contamination in all samples of maize flour and two of three samples corn flour, all being within of the limits contamination by fungus set for the ANVISA. On the two derivatives were studied found genres of filamentous fungus: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. and *Penicillium* spp., being the same with potential mycotoxigenic.

Keywords: Corn kernels, Fungal contamination, Mycotoxins

INTRODUÇÃO

No contexto agropecuário, o Milho (*Zea mays* L.) está entre os cereais de maior importância econômica. Isso

devido a sua ampla distribuição e adaptação climática, podendo ser cultivado em todos os continentes, fazendo

José Advailton Alencar Costa, Faculdade de Ciências Humanas Biológicas e da Saúde, Departamento de Microbiologia, CEP 78850-000, Primavera do Leste, MT, Brasil, jose_advailton@hotmail.com

parte de muitos alimentos da população humana e animal (Trento, 2004). No Brasil é a cultura mais amplamente difundida, por se adaptar a diferentes ecossistemas. Ocupa em todo território nacional, cerca de 12 milhões de hectares com produção anual média de 40 toneladas (Brasil, 2006). A produção de milho juntamente com a soja, contribui com aproximadamente 80% de toda produção de grãos no Brasil (EMBRAPA, 2010).

Embora a cultura do milho esteja presente em todos os estados da Federação, no ano de 2004, 90% da produção nacional esteve concentrada nos estados do Paraná (10,953 milhões de toneladas), Minas Gerais (5,952 milhões de toneladas), São Paulo (4,647 milhões de toneladas), Goiás (3,523 milhões de toneladas), Mato Grosso (3,408 milhões toneladas), Rio Grande do Sul (3,371 milhões toneladas), Santa Catarina (3,257 milhões toneladas) e Mato Grosso do Sul (2,374 milhões toneladas) somando 41,805 milhões de toneladas (IBGE, 2005).

O milho é um excelente componente alimentar podendo ser consumido *in natura* ou na forma de seus derivados como farinha, fubá, canjica, polenta, cuscuz entre outros. Atualmente cerca de 15% da produção nacional é destinado ao consumo humano de forma indireta na composição de produtos alimentícios (CIB, 2006). Seus derivados são bastante apreciados na culinária brasileira, sendo componente básico na alimentação da camada mais pobre da população (Cavalcanti et al., 2003).

As regiões tropicais e subtropicais permitem a produção agrícola do milho o ano todo devido ao clima propício. Porém, a mesma condição climática, alta umidade e temperatura, favorecem o desenvolvimento de fungos nos grãos colhidos e armazenados pelo fato do milho ser muito vulnerável a contaminação por fungos e ao ataque por pragas. Geralmente a contaminação por fungos em grãos e sementes, inicia-se ainda no campo e prossegue nas etapas posteriores à colheita, secagem, armazenamento, transporte e processamento (Cavalcanti et al., 2003).

O crescimento de fungos em grãos de milho é afetado por alguns fatores como: teor de umidade dos grãos, temperatura, condições físicas e sanitárias, nível de inoculação de fungos, teor de oxigênio e presença de insetos e ácaros. Os insetos podem iniciar ou agravar o crescimento fúngico devido sua atividade metabólica que aumenta a umidade e temperatura dos grãos (Czervinski et al. 2007; Marcia & Lazari, 1998).

Os grãos e sementes podem ser colonizados por dois tipos de fungos: os fungos do campo, que infectam o grão ainda no campo, sendo principalmente encontrados os gêneros *Cephalosporium* spp., *Fusarium* spp., *Gibberella* spp., *Nigrospora* spp., *Alternaria* spp. e *Cladosporium* spp. e os fungos de armazenamento, que infectam o produto durante seu armazenamento sendo os principais gêneros *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp. e *Mucor* spp. (Brasil, 2006; Czervinski et al. 2007; Marcia & Lazari, 1998).

Produtos derivados de milho contaminados por fungos representam um problema de saúde pública devido ao fato de vários fungos serem micotoxigênicos (Alhadas et al., 2004; Bertolin et al., 2003). As micotoxinas são metabólicos secundários sintetizados por alguns fungos no fim de sua fase de crescimento exponencial, podendo apre-

sentar atividade mutagênica, carcinogênica e teratogênica (Bertolin et al., 2003; Evangelista, 2005; Farias et al., 2000)

Durante os procedimentos industriais pode haver a inativação e/ou a retirada dos fungos dos produtos manufaturados, mas não significa que estão livres da presença das toxinas produzidas pelos fungos, devido ao fato de serem mais difíceis de degradar e ainda podem estar viáveis (Bertolin et al., 2003). A presença dos fungos filamentosos não implica necessariamente que haverá a produção de micotoxinas, as mesmas estão relacionadas à capacidade de biossíntese pelo fungo e condições ambientais como alternância de temperatura, porém o risco é implícito e deve ser afastado (Brasil, 2005; Kawashima, 2004).

Segundo Evangelista (2005), existem cerca de 250 fungos capazes de produzir micotoxinas, que pertencem a vários gêneros, sendo os mais importantes encontrados: *Aspergillus* spp., *Diplodia* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp., afetando a qualidade dos grãos, rações e dos alimentos. Estes agentes e contaminantes relacionados podem provocar danos à saúde humana. As micotoxinas podem contaminar derivados agrícolas de produtos como arroz, milho, amendoim, trigo, quirelas, farinhas, fubá entre outros alimentos, destinados à alimentação humana (Brasil, 2004a).

As micotoxinas passíveis de serem encontradas no milho são produzidas principalmente por fungos das espécies dos gêneros *Fusarium* spp. (fumonisinas e zearalenona), *Aspergillus* spp. (aflatoxinas e ocratoxina) e *Penicillium* spp. (ocratoxina). Sendo no Brasil, apontado a predominância de fungos toxigênicos dos gêneros *Fusarium* spp. seguido de *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. (Kawashima & Soares, 2006).

Sendo assim, o objetivo deste estudo é analisar o nível de contaminação por fungos filamentosos presentes em produtos alimentícios derivados de milho processados, detectando a presença das espécies fúngicas potencialmente patogênicas ao homem, produtoras de micotoxinas em produtos comercializados em Primavera do Leste, Mato Grosso.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem: para o desenvolvimento do estudo as amostras foram obtidas de dois produtos derivados do milho: farinha e fubá, sendo três diferentes marcas de cada amostra, dentro do prazo de validade e em suas embalagens originais. Sendo as embalagens de farinha de milho feitas de papel e as embalagens de fubá de milho de plástico. Os derivados de milho foram comprados em dois diferentes pontos comerciais da cidade de Primavera do Leste – MT, no mês de maio de 2010, respeitando as mesmas condições de armazenamento na qual se encontravam expostas para comercialização.

Isolamento dos Fungos: o isolamento dos fungos foi realizado pela técnica de semeadura em meio de cultura disponibilizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para a Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica (Brasil, 2004a). Em laboratório as amostras foram diluídas em água destilada

esterilizada nas proporções de 1:10 e 1:100, sendo de ambas semeadas em alíquotas de 0,1mL nas placa de Petri com o auxílio de alça de Drigalski, contendo meio de cultura Ágar Sabouraud-Dextrose (ASD) com adição de cloranfenicol, previamente autoclavada. As placas foram incubadas a temperatura de 30°C pelo período de 7 dias, sendo feita contagem padrão das unidades formadoras de colônia (UFC). Os resultados foram expressos em unidade formadora de colônias por grama (UFC/g).

Identificação dos Fungos: para a identificação das diferentes espécies fúngicas, foram analisadas as características macroscópicas observando a morfologia da colônia, sendo a cor, textura, superfície e pigmento difusível no meio de cultura e utilizando as características microscópicas analisando a morfologia da hifa fúngica da colônia pela técnica de microcultivo, realizadas de acordo com o material disponibilizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para a Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica (Brasil, 2004a). Em uma placa de Petri esterilizada, foram colocadas duas lâminas também estéreis, sendo uma suporte para a outra, na qual será adicionado um cubo do meio de cultura Ágar Sabouraud-Dextrose onde será semeado partes da colônia. Em seguida, serão realizados quatro repiques recentes da colônia do fungo que será analisada e adicionado nos quatro quantos do cubo de meio de cultura Ágar Sabouraud-Dextrose disposto sobre a lâmina, cobrindo com lamínula esterilizada. Fazer uma câmara úmida adicionando ao fundo da placa de Petri, algodão estéril embebido com 1 a 2 mL de água destilada também estéril tampando a placa e deixando em temperatura ambiente por 7 dias. Após o período de incubação, realizar a inativação do fungo e fixação de suas hifas, acrescentando ao algodão 1 mL de formol e vedando a placa com fita adesiva por 24h. Em seguida, retirar a lamínula com o auxílio de pinça, pingar uma gota do corante Lactofenol-algodão e montar sobre outra lâmina. Observando em microscópio óptico com objetiva de 40 X as características como tipo, cor e disposição das hifas septadas ou cenocítica, hialina ou demácia e formação de esporos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dois derivados de milho pesquisados, apresentaram crescimento de colônias de fungos filamentosos havendo variação no nível de crescimento entres as diferentes marcas estudadas. Dentre as amostras A, B e C, ambas de farinha de milho, houve ausência de contaminação em uma única marca, diferentemente das amostras de fubá de milho onde todas as amostras D, E e F apresentaram contaminação (Figura 1).

A contagem de unidades formadoras de colônias em meio de cultura Ágar Sabouraud-Dextrose com adição de cloranfenicol apresentou contaminação por fungos filamentosos em duas das três amostras testadas de farinha de milho (A, B e C) e em todas três amostras de fubá de milho (D, E e F) analisadas (Tabela 1).

Entre os dois diferentes derivados do milho estudado foi observado menor nível de contaminação na farinha de milho (A, B e C) sendo, a amostra C a única que não apresentou crescimento de fungos no meio de cultura. As

amostras de fubá de milho (D, E e F), assim como observado por Cavalcanti et al. (2003) e por Czervinski et al. (2007), demonstraram maior nível de contaminação, onde a amostra E, teve maior número de unidades formadoras de colônias (8×10^1 UFC/g). Todas as amostras testadas estão de acordo com o limite de contaminação por bolores, sendo de 103 UFC/g, estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 1978). A presença de fungos filamentosos e leveduras em fubá, pode ser oriunda do local de armazenamento, preparo ou da matéria-prima usada (Marcia & Lazarri, 1998). De acordo com Cavalcanti et al. (2003), contaminações por fungos em grãos e sementes, inicia-se ainda no campo prosseguindo para as etapas posteriores de colheita, secagem, armazenamento, transporte e processamento.

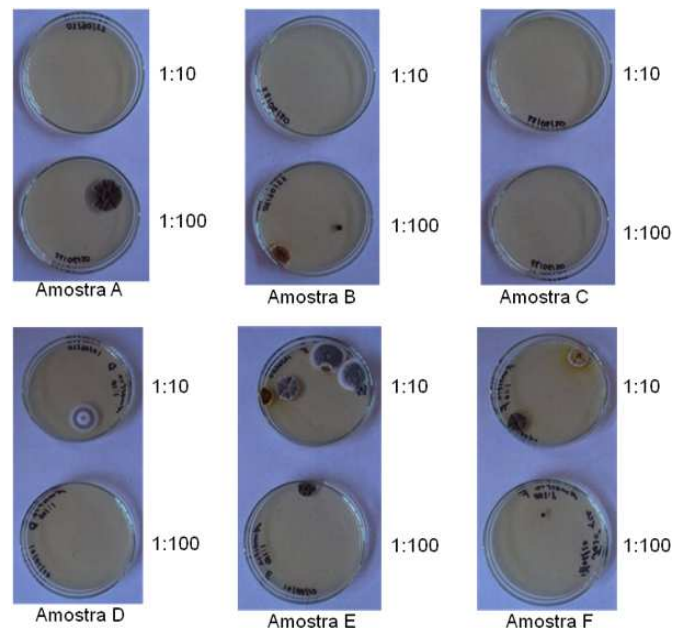


Figura 1. Crescimento de colônias fúngicas nas amostras B, D, E e F (*Aspergillus* spp.), nas amostras A e F (*Fusarium* spp.) e nas amostras B e E (*Penicillium* spp), em meio de cultura Ágar Sabouraud-Dextrose com adição de cloranfenicol em diluições (1:10 e 1:100).

Tabela 1. Número de UFC/g (unidade formadora de colônias por grama) de fungos filamentosos nas diferentes amostras testadas.

	Amostras	Fungos Filamentosos UFC/g
Farinha de Milho	A	5
	B	1×10^1
	C	0
Fubá de Milho	D	5
	E	8×10^1
	F	6×10^1

Na identificação dos fungos filamentosos, foi observada a presença dos gêneros *Aspergillus* spp. (FIGURA 2), *Fusarium* spp. (FIGURA 3) e *Penicillium* spp. (FIGURA 4).

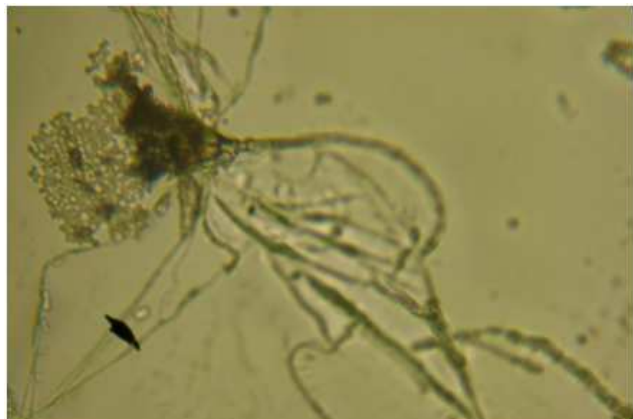


Figura 2. Imagem microscópica de hifas de *Aspergillus* spp.



Figura 3. Imagem microscópica de hifas de *Fusarium* spp.



Figura 4. Imagem microscópica de hifas de *Penicillium* spp.

A presença dos gêneros de fungos filamentosos encontrados foi diferente em cada uma das amostras estudadas (Tabela 2).

O resultado encontrado está de acordo com os resultados de vários estudos já realizados em farinha e fubá de milho (Alhadass, 2004; Cavalcanti et al. 2003; Czervinski et al.; 2007; Marcia & Lazarri, 1998), sendo observados outros

gêneros de fungos filamentosos nestes trabalhos, além dos três citados *Acremonium* spp., *Cladosporium* spp., *Cunninghamella* spp., *Mucor* spp., *Paecilomyces* spp., *Rhizopus* spp. Entre os três diferentes gêneros encontrados, o *Aspergillus* spp. destaca-se por estar presente em 4 das 6 amostras estudadas (66,66%), sendo o gênero *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. ambos presentes em 2 das 6 amostras em análise (33,33%). Segundo Márcia & Lazarri (1998) e Farias et al. (2000), os gêneros *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. são os principais gêneros fúngicos encontrados em produtos derivados do milho. Pesquisas realizadas em outros produtos destinados à alimentação, teve como resultado a identificação dos gêneros fúngicos *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., sendo os principais bolores encontrados em pesquisa de fungos filamentosos feita em erva-mate na cidade de Pelotas-RS por Bernardi, Caldeira e Nascimento (2005) e em pesquisa feita em arroz comercializado na Região Sul do país por Bertolin et al. (2003).

Tabela 2. Gênero de fungos filamentosos presentes nos produtos derivados de milho

Gênero de Fungos Filamentosos	Amostra de Derivados de Milho					
	Farinha			Fubá		
	A	B	C	D	E	F
<i>Aspergillus</i> spp.		X		X	X	X
<i>Fusarium</i> spp.	X					X
<i>Penicillium</i> spp.		X			X	

Os fungos do gênero *Aspergillus* spp., se desenvolvem durante o armazenamento dos produtos derivados do milho. O baixo nível de contaminação por *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp., pode ser explicado por serem fungos do campo, que contamina o grão antes da colheita, não se desenvolvendo durante o armazenamento, podendo este ocorrer quando o local de armazenamento dos grãos e produtos possui alto teor de umidade (Farias et al., 2000; Marcia & Lazarri, 1998).

Segundo Márcia & Lazarri (1998), os fungos dos gêneros *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. são responsáveis pela deteriorização de alimentos e produtos armazenados, além de produzir micotoxinas. São estes três gêneros fúngicos os de maior importância na produção de micotoxinas (Brasil, 2004b; Farias et al., 2000). As micotoxinas são carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas, quando ingeridas pelo homem, pode causar sérias doenças, dependendo da dose em questão e estado nutricional do homem leva a morte (Brasil, 2004b). Devido às consequências proporcionadas a saúde humana pelas micotoxinas, o presente estudo procura alertar para a importância em detectar e identificar os gêneros fúngicos potencialmente micotoxigênicos que possa estar contaminando os produtos derivados do milho, como ato profilático para a ingestão segura destes alimentos de grande consumo humano.

CONCLUSÃO

Dos dois derivados de milho, houve contaminação em todas as amostras de fubá de milho e ausência de contaminação em uma única amostra das três farinhas de milho testadas. Foram encontrados os gêneros *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. sendo encontrado

nas amostras de fubá o maior número de unidades formadoras de colônias. Apesar da presença de contaminação fúngica, o nível de contaminação encontra-se dentro dos limites estabelecidos pelo órgão regulatório. A contaminação pode ter ocorrido devido às condições favoráveis de crescimento aos fungos, como alto teor de umidade, temperatura pouco elevada dos locais de armazenamento dos grãos ou dos produtos já processados. Sendo necessário maior atenção nos cuidados a esses fatores que favorecem o desenvolvimento fúngico nos locais onde são armazenados os grãos de milho bem como em seus produtos derivados.

Todos os gêneros de fungos filamentosos isolados possuem potencial micotoxigênico, sendo capazes de produzirem micotoxinas, o que caracteriza um risco à saúde pública por ter atividade mutagênica, carcinogênica e teratogênica. É importante a realização de fiscalização sobre estes produtos para garantir segurança no consumo destes derivados feito por grande parte da população.

REFERÊNCIAS

- Alhadas RV, Beux MR, Pimentel IC, Stuart RM. Contagem de bolores e leveduras em fubá e identificação de gêneros potencialmente toxigênicos. *Visão Acadêmica*, 5(2): 79-82, 2004.
- Bernardi E, Caldeira MF, Nascimento JS. Identificação de fungos filamentosos em erva-mate (*ILEX PARAGUARIENSES* ST. HIL.). *Arq. Inst. Biol.*, 72(4): 489-493, 2005.
- Bertolin TE, Furlong EB, Magagnin G, Nunes IL. Arroz comercializado na Região Sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. *Ciênc. Técnol. Aliment.*, 23(2): 190-194, 2003.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e identificação dos fungos de importância médica. Ministério da Saúde. Salvador: Ministério da Saúde, 2004a.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Protocolo de qualidade do milho. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2004b.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Comissão nacional de normas e padrões para alimentos. Ministério da Saúde. São Paulo: Ministério da Saúde, 1978.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Controle de pragas durante o armazenamento de milho. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Grãos ardidos de milho. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2005.
- Cavalcanti MAQ, Fernandes MSJ, Lima DMM, Ribeiro SAL. Fungos filamentosos isolados de produtos derivados do milho comercializados em Recife Pernambuco. *Revista Brasil. Bot.* 26(2): 223-229, 2003.
- CIB. Conselho de Informações sobre Biotecnologia. Guia do milho: tecnologia do campo à mesa. Disponível em: <http://www.cib.org.br/form_guiia_milho.php>. Acesso em: 10 ago. 2010.
- Czervinski T, Monteiro MC, Pittiner E, Shanches HF. Isolamento de fungos em alguns produtos derivados de milho. *Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde.* 13(1/2): 21-27, 2007.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cultivo do milho. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/mercado.htm>>. Acesso em: 28 abr. 2010.
- Evangelista J. Contaminações em alimentos. In: _____ Alimentos: um estudo abrangente. São Paulo: Atheneu, 2005, cap. 7, p. 171-390.
- Farias AX, Andersen PM, Bittencourt AM, Correa TBS, ROobbs CF. Contaminação endógena por *Aspergillus spp.* em milho pós colheita no Estado de Paraná. *Pesq. Agropec. Bras.* 35(3): 617-621, 2000.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção agrícola municipal: cereais, leguminosas e oleaginosas. Disponível em: <<http://ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia>>. Acesso em: 28 abr. 2010.
- Kawashima LM. *Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil*. Campinas. 2004. 110 p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Kawashima LM, Soares LMV. Incidência de Fumonizina B1, Aflatoxina A1, B1, G1 e G2, Ocratoxina A e Zearalenona em produtos de milho. *Ciênc. Técnol. Aliment.* 26(3): 516-521, 2006.
- Marcia BA, Lazzari FA. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. *Ciênc. Técnol. Aliment.* 18(4): 223-229, 1998.
- Trento SM. *Distribuição de Diplodia maydis e Diplodia macrospora nas principais regiões produtoras de sementes de milho no Brasil*. Pelotas. 2004. 66 p. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.