

Diferentes pré-inóculos, temperaturas e tempos de incubação na produção aflatoxina B₁ em arroz

Different previous inoculum, temperature and incubation time in the production of aflatoxin B₁ in rice

Ana Carolina Ritter^{1*} Isa Beatriz Noll¹

RESUMO

Estudos indicam que um dos problemas mais sérios que afetam os manejos pré e pós-colheita do arroz é a presença de fungos das espécies *Aspergillus* ou *Penicillium*, potencialmente produtores de micotoxinas. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a capacidade produtora de aflatoxina B₁ de cepas isoladas do arroz e observar o efeito do pré-inóculo nas mesmas. Foram utilizados três isolados de *Aspergillus flavus*, conhecidamente já produtores, que foram testados nas temperaturas de 20 e 25°C, combinadas com tempos de incubação 11, 14 e 21 dias. Os pré-inóculos utilizados foram Yeast Extrat Sucrose (YES) e Czapeck Yeast Extrat (CYA). Todas as cepas retiradas do pré-inóculo em meio YES e inoculadas no arroz, em temperatura de 25°C/18 dias e 20°C/14 dias, produziram aflatoxina B₁. O meio CYA apresentou menor desempenho, uma vez que as três cepas testadas não produziram aflatoxina B₁ na combinação 20°C/14 dias. A 25°C/11 dias de incubação a aflatoxina B₁ não foi detectada.

Palavras-chave: *Aspergillus flavus*, CYA, YES, tempo de incubação, temperatura, arroz.

ABSTRACT

The production of aflatoxin in rice by three isolates of *Aspergillus flavus* was investigated for different culture conditions (temperature and incubation time) and previous inoculum (YES- Yeast Extrat Sucrose and CYA- Czapeck Yeast Extrat). All strains withdrawn from the previous inoculum medium YES and inoculated in the rice in temperature of 25°C/18 days and 20°C/14 days, produced aflatoxin B₁. The medium CYA had lower performance since the three strains tested did not produce aflatoxin B₁ in the combination 20°C/14 days. At 25°C/11 days of incubation time aflatoxin was not detectable.

Key words: *Aspergillus flavus*, CYA, YES, incubation time, temperature, rice.

INTRODUÇÃO

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de fungos filamentosos que podem ocorrer em alimentos, como resultado do crescimento fúngico (GONÇALVEZ et al., 2001; GQALENI et al., 1997 SWEENEY & DODSON, 1998).

Os fungos mais comuns encontrados em alimentos e produtos estocados pertencem ao gênero *Aspergillus* ou *Penicillium* (GARCIA et al., 2002; NGUYEN et al., 2007). Algumas espécies de fungos podem produzir micotoxinas, ocasionando significativas perdas econômicas e sérios problemas à saúde humana e animal (HUSSEIN & BRASEL, 2001; IARC, 2002). No entanto, o simples isolamento e a confirmação de fungos micotoxigênicos em alimentos não indicam a presença de micotoxinas (HUSSEIN & BRASEL, 2001; GUITAKOU et al., 2006).

Mais de 20 espécies de *Aspergillus* produzem micotoxinas, sendo as mais comuns as da divisão *flavi*, que incluem três espécies: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* (VAAMONDE et al., 2003; SALEEMULLAH et al., 2006). As quatro aflatoxinas naturalmente produzidas são B₁, B₂, G₁, G₂; sendo que a B₁ é usualmente encontrada em grandes concentrações, contaminando alimentos (D'MELLO & MACDONALD, 2002; GUITAKOU et al., 2006; MOSS, 2002).

¹Laboratório de Toxicologia, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43212, Campus do Vale, Agronomia, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: anacarolina.ritter@gmail.com. *Autor para correspondência.

A aflatoxina B₁ possui potencial hepatotóxico, carcinogênico e teratogênico tanto em homens como em animais (SWEENEY & DOBSON, 1998; MARKLINDER et al., 2005; MOSS, 2002; PILDAIN et al., 2004). Em 1993, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) (WHO-IARC, 1993) considerou as aflatoxinas como carcinogênicas para humanos (grupo I) (HUSSEIN & BRASEL, 2001; IARC, 2002).

As circunstâncias que promovem a produção de aflatoxinas são geralmente mais restritas que aquelas que promovem o crescimento fúngico (GONÇALVES et al., 2001). Composição do substrato, temperatura, teor de água, umidade relativa do ar, atividade de água, pH e linhagem do fungo contaminante são fatores que governam a produção de aflatoxinas, sendo que a temperatura, a umidade e o tipo de substrato são os fatores mais importantes (MALLOZZI & CORRÊA, 1998; GQALENI et al., 1996; TANIWAKI & SILVA, 2001; MOLINA & GIAMUZZI, 2002; GQALENI et al., 1997).

Tendo em vista os aspectos mencionados, o presente estudo teve por objetivos avaliar a capacidade produtora de aflatoxina B₁ de três cepas de *Aspergillus flavus* no substrato em que foram isolados (arroz) e observar o efeito de diferentes pré-inóculos (meios de cultura sintéticos) nestas cepas conhecidamente aflatoxigênicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados utilizados

Para realização deste trabalho, foram utilizados três isolados de *Aspergillus flavus*, produtores de aflatoxina B₁, encontrados e identificados por HOELTZ (2005) em amostras de arroz com casca. Esses isolados foram denominados A21, A43 e A46 pela fungoteca do Laboratório de Toxicologia (ICTA/UFRGS).

Delineamento experimental

Para realização deste experimento, foi realizado um teste prévio com os três isolados em meios sintéticos (dados não publicados), em que foram testadas temperaturas de 20, 25, 30, 35 e 40°C e tempos de incubação de sete, 11, 14, 18 e 21 dias. As melhores combinações desses dias e as temperaturas encontradas (25°C/11 dias, 20°C/14 dias e 25°C/18 dias) foram aplicadas nos testes com arroz.

Meios de cultivo

Meios sintéticos: YES- *Yeast Extrat Sucrose* (2g extrato de levedura, 150g de sacarose, 20g de agar,

0.5g de sulfato de magnésio e 100mL de água destilada); CYA- *Czapeck Yeast Extrat* (5,0g de extrato de levedura, 30g de sacarose, 15,0g de agar, 10,0mL⁻¹ de *Czapeck* concentrado, 1,0g de H₂HPO₄ e 100mL de água destilada); Agar Sabouraud (neopeptona 10,0g, dextrose 40,0g e ágar 20,0g (MERCK, Darmstadt, Alemanha). Meio Natural: arroz parboilizado, livre de micotoxina, com umidade inicial de 12,89%.

Análise do potencial toxigênico dos três isolados conhecidamente aflatoxigênicos

As três cepas produtoras de aflatoxina B₁ foram testadas em arroz parboilizado. A partir de cada cepa selecionada, uma suspensão de esporos foi preparada em Tween 80%. Os esporos foram contados em uma Câmara de Neubauer e o volume necessário para obter-se 10⁶ml⁻¹ esporos foi inoculado em erlenmeyers (125mL) com 15g de arroz estéril a 73% de umidade (atividade de água de 0,99), em duplicata (PARK & BULLERMAN, 1983). Estes foram tampados com algodão e incubados em estufa BOD em uma combinação de tempo e temperatura referentes à melhor produção de aflatoxina B₁ obtida a partir de experimentos em meios sintéticos (dados não publicados). Após este período, 30ml⁻¹ de metanol a 80% foram adicionados aos erlenmeyers e as toxinas foram extraídas sob forte agitação por 5 minutos. Após a filtração, os extratos obtidos foram aplicados com capilares sobre placas de sílica gel 60G (MERCK, Darmstadt, Alemanha) e eluídos com tolueno: clorofórmio: acetato de etila: ácido fórmico (35:25:25:10). Após desenvolvimento do cromatograma, as placas foram visualizadas sob luz ultravioleta de comprimento de onda longo (365nm) para detecção da fluorescência característica de aflatoxina B₁ (SMEDSGAARD, 1997; GQALENI et al., 1996; VAAMONDE et al., 2003; BELLÍ et al., 2004; ABRANSON & CLEAR, 1996; LEONTOPOULOS et al., 2003; PARK & BULLERMAN, 1983; GUITAKOU et al., 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As melhores condições de temperatura e tempo de incubação encontradas para produção de aflatoxina testada com os meios sintéticos foram aplicadas nos testes com arroz (25°C/11 dias, 25°C/18 dias e 20°C/14 dias). Inicialmente, os fungos produtores foram retirados de pré-inóculos feitos em agar sabouraud (Tabela 1). De acordo com estes testes, apenas a cepa A43 mostrou-se produtora de aflatoxina B₁, no tempo de 18 dias, em temperatura de 25°C. Em virtude destes resultados não serem satisfatórios, realizou-se um novo experimento, em que as cepas

Tabela 1 - Teste dos isolados fúngicos (A43, A46, A21) produtores de aflatoxina B₁, retirados dos pré-inóculos (Czapeck Yeast Extrat (CYA), Yeast Extrat Sucrose (YES) e Sabouraud (SAB)) inoculados no arroz.

Pré-inóculo	A43			A46			A21		
	SAB	CYA	YES	SAB	CYA	YES	SAB	CYA	YES
25°C/11 dias	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20°C/14 dias	-	-	+	-	-	+	-	-	+
25°C/18 dias	+	+	+	-	+	+	-	-	+

(-) Não houve produção de aflatoxina B₁.

(+) Houve produção de aflatoxina B₁.

produtoras foram inoculadas nos meios CYA e YES por sete dias (pré-inóculo). Neste teste, a contagem de esporos (provenientes dos pré-inóculos em CYA e YES) foi realizada para uma concentração de 10⁶ l ml⁻¹ e, em seguida, as cepas foram inoculadas nos erlenmeyers contendo as amostras de arroz (15g) a serem analisadas. A partir desse teste, verificou-se que todas as cepas retiradas do pré-inóculo em meio YES e inoculadas no arroz, em temperatura de 25°C/18 dias e 20°C/14 dias, produziram aflatoxina B₁ (Tabela 1).

Os isolados A43 e A21 retirados do pré-inóculo CYA se mostraram produtores, porém, em apenas uma condição de cultivo (25°C em 18 dias). O isolado A46 mostrou-se deficiente em relação à produção de aflatoxina quando inoculado no meio CYA. Este dado foi similar ao encontrado por PARK & BULLERMAN (1983), que concluíram que a produção de AFB₁ depende acima de tudo da linhagem isolado fúngico. após estudarem inóculo de *Aspergillus flavus* e *parasiticus* em arroz.

O meio YES utilizado como pré-inóculo apresentou maior desempenho, quando comparado com meio CYA, uma vez que houve produção de aflatoxina B₁ pelos três isolados testados (Tabela 1), além de mais de uma condição (25°C/18 dias e 20°C/14 dias). LEONTOPOULOS et al. (2003) concluíram que YES Agar é um ótimo meio para biossíntese de aflatoxina B₁ e que, além de ser de fácil preparação, é relativamente barato.

Vários substratos já foram testados para verificar o potencial toxigênico fúngico. Um exemplo foi o estudo realizado por KOKKONEN et al. (2004), que, após analisarem vários substratos para examinar a capacidade do fungo em produzir micotoxinas, verificaram que linhagens de *Penicillium* produziram várias micotoxinas diferentes, dependendo do meio e da linhagem. A partir deste dado, os autores concluíram que existe uma grande necessidade de se utilizar mais de um meio de cultura para verificar e identificar os metabólitos fúngicos.

O arroz se mostrou um meio utilizável para testes de potencial toxigênico devido ao fato de que todos os isolados conhecidamente aflatoxigênicos utilizados neste experimento produziram aflatoxina. PARK & BULLERMAN (1983) inocularam esporos de duas espécies de *Aspergillus flavus* e *parasiticus*, em arroz e queijo, e analisaram o efeito da variação de temperatura nestes substratos (25°C, 18°C, 5-25°C, 15°C e 5°C). Tais autores concluíram que o queijo não é um bom substrato para produção de aflatoxinas, ao contrário do arroz.

De acordo com RAYBAUDI et al. (2000), em um estudo de potencial toxigênico, realizado com isolado de *Aspergillus flavus* e *parasiticus*, cerca de 37% dos isolados apresentaram produção de aflatoxinas em arroz, enquanto que somente cerca de 4% dos testados produziram aflatoxinas em ágar coco. Já BRESLER et al. (1995) inocularam espécies de *Aspergillus* em arroz e constataram que quatro de 34 isolados de *A. flavus* foram produtores de aflatoxinas e seis de um total de 12 *A. parasiticus* se mostraram aflatoxigênicos neste meio. Tais autores concluíram que fungos toxigênicos podem ser facilmente encontrados, mas a produção de micotoxinas pode aparecer somente durante uma prolongada estocagem de produtos contaminados.

As temperaturas de 20°C e 25°C mostraram-se boas para produção de aflatoxina B₁ nas amostras de arroz analisadas neste trabalho. Para OSWEILER (1998), a faixa de temperatura para formação de aflatoxinas é de 25°C a 32°C, contudo, a temperatura de 13°C por dois ou mais dias ainda permite a formação de aflatoxina. SAMAPUNDO et al. (2007), ao inocularem *A. flavus* em grãos de pipoca, verificaram que os isolados testados tiveram ótimo crescimento a 30°C.

PARK & BULLERMAN (1983) demonstraram que a produção de aflatoxinas pode ser afetada por flutuação de temperatura. A exposição de *A. parasiticus* a temperaturas altas (entre 40 e 50°C), por um curto período de tempo, reduz o crescimento e a produção de aflatoxinas.

No que se refere ao crescimento fúngico no arroz analisado, pode-se perceber que a partir do 2º dia de incubação em qualquer uma das temperaturas testadas já houve um crescimento superficial destes bolores. Estes dados novamente são similares com os obtidos por PARK & BULLERMAN (1983), que também notaram um crescimento de *Aspergillus flavus* a partir do segundo dia de incubação, na temperatura de 25°C. GQALENI et al. (1997) demonstraram em seu estudo que as espécies de *Aspergillus flavus* estudadas tiveram uma ótima temperatura para colonização do substrato na faixa de 25 a 30°C. Segundo TANIWAKI & SILVA (2001), o *A. flavus* apresenta temperatura mínima de crescimento por volta de 12°C, máxima próxima de 48°C e ótima entre 30 e 42°C.

No 11º dia, o crescimento atingiu seu máximo. A esporulação dos isolados foi notada a partir do 7º dia. Para LEONTOPOULOS et al. (2003), o máximo crescimento do micélio de um isolado de *Aspergillus flavus* foi ao 6º dia após a inoculação. Depois deste período, uma moderada desaceleração do crescimento do micélio foi observada. Tais resultados indicam também a importância que o meio YES exerce sobre os isolados fúngicos em relação à esporulação fúngica. PARK & BULLERMAN (1983) constataram que o crescimento de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* em ágar BDA não foi bom, pois não houve esporulação suficiente. A partir deste resultado, antes de inocularem os esporos desses isolados em arroz, esses pesquisadores fizeram o crescimento destes isolados em meio YES, sendo que a esporulação foi notoriamente boa para contagem de esporos e inoculação no meio natural.

BU'LOCK (1965) afirma que o mecanismo de esporulação tem uma conexão com metabólitos secundários. Para PARK & BULLERMAN (1983), o tempo requerido para iniciar o crescimento e a esporulação de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* em amostras de arroz foi afetado pela temperatura, pelo substrato e pela linhagem do fungo. O início do crescimento ocorreu mais rápido a 25°C, seguido de 18°C da temperatura cíclica (5-25°C) e 15°C. Esses autores concluíam que a temperatura foi um fator determinante para o crescimento e a esporulação fúngica.

A atividade de água de 0,99 do arroz mostrou-se boa para produção de aflatoxinas, conferindo com os resultados encontrados por GQALENI et al. (1997), em que a atividade de água do substrato (CYA e YES) de 0,99 foi considerada ótima para produção de aflatoxinas. No mesmo, estudo a produção de aflatoxina foi afetada por diferentes substratos, tempos de incubação e presença de outras

micotoxinas produzidas por *A. flavus*. Samapundo et al (2007) observaram que isolados de *Aspergillus*, quando inoculados em grãos de pipoca, não cresceram em atividade de água de 0.801. Em geral, as aflatoxinas são produzidas a valores de aw de 0,95 a 0,99 com um valor mínimo de 0,82 para *A. flavus* (ICMSF, 1996; NIELSEN, et al., 2004).

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que os meios sintéticos CYA e, principalmente, YES servem como um excelentes substratos (pré-inóculo) para produção de aflatoxinas, pois demonstram que são capazes de ativar a produção das mesmas. O arroz, quando incubado em um período de 14 ou 18 dias em temperaturas de 20 e 25°C, também mostrou-se um bom substrato natural para detecção de aflatoxina B₁. Estes dados revelam também que temperatura e umidade devem ser evitadas nos silos de armazenamento de arroz. A quantificação de aflatoxina B₁ e os fatores que levam os meios CYA e YES utilizados como pré-inóculos a promoverem uma melhor produção de aflatoxinas refletem a necessidade de novos estudos.

REFERÊNCIAS

- ABRANSON, D.; CLEAR, R.M. A convenient method for assessing mycotoxin production in cultures of *Aspergilli* and *Penicillia*. **Journal of Food Protection**, Boston, v.59, p.142-144, 1996.
- BELLÍ, N. et al. Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.96, p.19-27, 2004.
- BRESLER, G. et al. Mycotoxin-production potential of fungi isolated from amaranth seeds in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.25, p. 101-108, 1995.
- BU'LOCK, J.D. **Aspects of secondary metabolism in fungi**. Slovakia: Academic, 1965. 320p.
- D'MELLO, J.P.F.; MACDONALD, A.M.C. Mycotoxins. **Animal Feed Science Technology**, London, v.69, p.155-166, 2002.
- GARCIA, M.J.M. et al. Sucessão de espécies de fungos em milho armazenado em sistema aerado. **Revista Brasileira de Armazenamento**. Viçosa, v.27, n.2, p.14-22, 2002.
- GONÇALVES, E. et al. Análises de micotoxinas no instituto biológico de 1989 a 1999. **Biológico**, São Paulo, v.63, p.15-19, 2001.
- GUITAKOU, S. et al. Study of aflatoxin B₁ and ochratoxin A production by natural microflora and *Aspergillus parasiticus* in

- black and green olives of Greek origin. **Food Microbiology**, London, v.23, p.612-621, 2006.
- GQALENI, N. et al. Co-production of aflatoxin and cyclopiazonic acid in isolates of *Aspergillus flavus*. **Food Additives and Contaminants**, Sidney, v.13, p.677-685, 1996.
- GQALENI, N. et al. Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface Agar culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Vancouver, v.63, p.1048-1053, 1997.
- HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxin on humans and animals. **Toxicology**, Amsterdam, v.167, p.101-134, 2001.
- HOELTZ, M. **Estudo da influência de manejos pós-colheita na incidência de fungos e micotoxinas no arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2005. 77f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia dos Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- IARC-International Agency for Research on Cancer. **Some naturally occurring substance: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. Lyon: OMS, 2002.
- ICMSF- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganisms in Foods**. London: Academic, 1996. p.347-381.
- KOKKONEN, M. et al. The effect of substrate on mycotoxin production of selected *Penicillium* strains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.56, p.67-74, 2004.
- LEONTOPOULOS, D. et al. Black olives as substrate for *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B1 production. **Food Microbiology**, London, v. 20, p.119-126, 2003.
- MALLOZZI, M.; CORREA, B. Fungos toxigênicos e micotoxinas. **Boletim do Instituto Técnico de Biologia**, São Paulo, v.3, p.5-26, 1998.
- MARKLINDER, I. et al. Consumer's ability to discriminate aflatoxin-contaminated Brazil nuts. **Food Additives and Contaminants**, Sidney, v.22, p.54-64, 2005.
- MOLINA, M.; GIAMUZZI, L. Modelling of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. **Food Research International**, London, v.35, p.585-594, 2002.
- MOSS, M. Mycotoxin review- *Aspergillus* e *Penicillium*. **Mycologist**, Cambridge, v16, n.3, p.116-119, 2002.
- NGUYEN, M.T. et al. Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. **Food Chemistry**, Japan, v.105, 42-47, 2007.
- NIELSEN, K.F. et al. Mould growth on building materials under low water activities. Influence of humidity and temperature on fungal growth and secondary metabolism. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v.54, p.325-336, 2004.
- OSWEILER, G.D. **Toxicologia veterinária**. São Paulo: Arte Médicas, 1998. 526p.
- PARK, K.Y.; BULLERMAN, L.B. Effect of cycling temperatures on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in rice and cheddar cheese. **Journal of Food Science**, Chicago, v.48, p.889-896, 1983.
- PILDAIN, M.B. et al. Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.93, p.31-40, 2004.
- RAYBAUDI, R. et al. Incidence of aflatoxin in corn as related to levels of *Aspergillus flavus/parasiticus* and moisture content. In: INTERNATIONAL IUPC SYMPOSIUM ON MYCOTOXIN AND PHYCOTOXINS, 10., 2000 São Paulo. **Anais de Evento no País...** Guarujá, SP. Instituto Adolfo Lutz, 2000. p.135.
- SAMAPUNDO, S. et al. Modelling of the individual and combined effects of water activity and temperature on the radial growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on corn. **Food Microbiology**, London v.24, p.517-529, 2007.
- SALEEMULLAH, A.I. et al. Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts. **Food Chemistry**, Japan, v.98, p.699-703, 2006.
- SMEDSGAARD, J. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.706, p.264-270, 1997.
- SWEENEY, J.; DOBSON, A.D.W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.43, p.141-158, 1998.
- TANIWAKI, M.H.; SILVA, N. **Fungos em alimentos: ocorrência e detecção**. Campinas: Núcleo de Microbiologia do ITAL, 2001. 82p.
- VAAMONDE, G. et al. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *flavi* from different substrates in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.88, p.79-84, 2003.