

Contaminação fúngica em granola comercial

Fungal contamination in commercial granola

Andréia Dalla VECCHIA^{1*}, Raquel de CASTILHOS-FORTES¹

Resumo

O presente trabalho objetivou verificar a ocorrência de fungos produtores de micotoxinas, especialmente dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, em granola comercializada em Porto Alegre, uma vez que este alimento vem apresentando crescente consumo. Estes fungos filamentosos são evidenciados freqüentemente em cereais, os quais apresentam grande incidência em produtos à base de granola. Amostras de granola foram adquiridas no Mercado Público de Porto Alegre, no período de agosto de 2004 a abril de 2005, nas quatro estações do ano. A coleta baseou-se em quatro amostras de diferentes procedências, duas das quais são comercializadas embaladas e lacradas e duas comercializadas a granel. As análises seguiram os procedimentos descritos pelo Compendium of Methods for Examination of Foods. A identificação dos fungos baseou-se na morfologia macroscópica e microscópica, com auxílio de chaves de identificação. Os resultados evidenciaram a presença dos três gêneros fúngicos, com predominância de *Aspergillus* em três estações. No verão houve maior desenvolvimento micelial e no outono, menor crescimento de fungos. Os resultados sugerem maior controle e fiscalização, visando eliminar qualquer ocorrência de microrganismos produtores de toxinas em granola.

Palavras-chave: micotoxinas; alimentos; patogenicidade; segurança alimentar.

Abstract

The following work, had the purpose to verify the occurrence of fungi which produce mycotoxin, specially the *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* genus in the granola commercialized in Porto Alegre, once that this food is having an increasing consumption. These fibred fungi are certified frequently in cereals, which are found in the granola (a mix of grains, nuts and dried fruits, sometimes coated with oil and honey, eaten for breakfast or as a snack). Granola samples were acquired in the Public Market of Porto Alegre since August 2004 until April 2005, during the four seasons of the year. The collection was based on four samples of different origins, two of which are commercialized packed and sealed up, and the other two commercialized in bulk. The analyses had followed the described procedures for Compendium of Methods for Examination of Foods. The fungi identification was based on the macroscopic and microscopic morphology, with the assistance of identification keys. The results certified the presence of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* fungi, with the predominance of the *Aspergillus* genus in three seasons. In summer it had a bigger mycelium development and in autumn the lowest fungi growth. The results suggest a bigger control and inspection, seeking for eliminate any occurrence of microorganism producer of toxins in the granola.

Keywords: mycotoxins; food; pathogenicity; food security.

1 Introdução

Fungos filamentosos, também conhecidos como bolores ou mofos, são microrganismos eucariotos, heterotróficos e multicelulares. Estes microrganismos estão presentes em todos os ambientes e são economicamente importantes no campo da medicina, da fitopatologia e da indústria, além de serem ecologicamente importantes como decompositores. No entanto, também podem contaminar os alimentos, causando sua deterioração, reduzindo seu valor nutricional, alterando suas qualidades organolépticas e tornando-se, em alguns casos, problema de saúde pública²⁰.

Alguns gêneros deste grupo de microrganismos são responsáveis pela produção de toxinas, as micotoxinas, entre as quais, destacam-se: a aflatoxina, ocratoxina A, zearalenona, patulina, fumonisina, tricoteceno e citrinina²².

O processo de invasão por fungos e a contaminação por micotoxinas em grãos podem ocorrer no campo e durante os processos de colheita, secagem, transporte e armazenamento do produto^{4,24}. O crescimento de fungos é determinado por vários fatores, entre os quais, destacam-se: o teor de umidade,

aeração, dano provocado por insetos e ácaros, temperatura e tempo de armazenamento¹². Os maiores problemas do desenvolvimento de fungos em grãos e sementes estão relacionados à produção de micotoxinas e à perda do poder germinativo e de matéria seca, alterando o valor nutricional¹¹.

Os fungos como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são considerados importantes produtores de micotoxinas¹⁵, que são metabólitos tóxicos naturais e freqüentemente encontradas em alimentos. Aproximadamente duzentas espécies de fungos são consideradas toxigenicas, sendo que o tipo de substrato e as condições do ambiente são fatores determinantes para a produção de micotoxinas³. Entre os tóxicos contaminantes de alimentos podemos destacar as aflatoxinas produzidas por espécies do gênero *Aspergillus*, as quais são altamente tóxicas e carcinogênicas para homens e animais, tornando-se assim, um fator preocupante para a indústria alimentícia^{1,8}.

Intoxicações e problemas passageiros ou crônicos, que afetam várias funções do organismo, tais como: alterações hepáticas, renais, circulatórias, no sistema nervoso e no trato digestivo podem ocorrer em homens e animais devido à ingestão destas substâncias³.

Diets ricas em fibras auxiliam o aumento do bolo fecal e diminuem o desconforto causado pelo sintoma de constipação intestinal. Alimentos fibrosos também têm auxiliado na redução de doenças cardiovasculares sendo inclusive, indicados a

Recebido para publicação em 21/6/2006

Aceito para publicação em 23/4/2007 (001769)

¹ Laboratório de Microbiologia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos – Unisinos, CP 275, CEP 93001-970, São Leopoldo - RS, Brasil,

E-mail: andreiavechia@gmail.com

*A quem a correspondência deve ser enviada

pacientes portadores de diabetes insulino-dependente, por seu potencial de redução de níveis de insulina no sangue e da concentração de lipídios. Entre os alimentos indicados para tratar destas patologias, destaca-se a granola, que é um produto alimentar 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, a granola é um alimento de excelente sabor, elevado valor energético e vem apresentando crescente consumo⁸.

As fumonisinas são toxinas produzidas principalmente pelo fungo *Fusarium moniliforme*²⁵, detectadas naturalmente em vários alimentos, inclusive em milho e derivados, causam edema pulmonar e hidrotórax em suínos, leucoencefalo-malácia em eqüinos, e provável câncer de esôfago em humanos. Além desta toxina, o *Fusarium* também pode produzir as micotoxinas zearalenona e tricotecenos¹⁸.

A micotoxina patulina pode ser produzida por várias espécies do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*, sendo freqüentemente encontrada em frutas, verduras e cereais. Em animais, esta toxina causa distúrbios gastrointestinais, efeitos neurotóxicos e imunológicos. A verruculogeno também é uma importante toxina produzida por *Penicillium* e *Aspergillus* causando fortes tremores em animais afetados⁹.

Envenenamentos por aflatoxinas podem ocorrer quando a ração está contaminada por *A. flavus*, ocorrendo sérias lesões em animais, e embora os riscos para os humanos sejam ainda pouco conhecidos, há fortes evidências que a aflatoxina contribui para a cirrose hepática e o câncer de fígado, verificados em algumas regiões da Índia e da África e associados à dieta por alimentos contaminados²⁷.

Estudos revelam que em animais, os efeitos tóxicos agudos, mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos têm se mostrado bastante sensíveis em espécies domésticas e de experimentação, sendo o fígado o órgão mais atingido. De maneira semelhante, na saúde pública, as aflatoxinas são as principais responsáveis pela origem de câncer hepático no homem, consequência da ingestão contínua de alimentos contaminados¹⁶.

Muitas granolas contêm açúcar em sua composição, o qual, quando contaminado pode contribuir com o aumento da população de microrganismos⁸. Além disso, espécies do gênero *Aspergillus* crescem em altas concentrações de açúcar, nutrin-do-se de água extraída de substâncias relativamente secas¹⁷.

Em virtude da grande preocupação com os alimentos consumidos, e visando contribuir com a qualidade da granola comercializada no mercado público de Porto Alegre, este trabalho tem por objetivo verificar a incidência de fungos produtores de micotoxinas, especialmente dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, devido à alta toxicidade dos metabólitos produzidos por eles.

2 Material e métodos

Amostras de granola foram adquiridas no Mercado Público de Porto Alegre em duas bancas diferentes, denominadas neste trabalho de "Banca A" e "Banca B", sendo que em cada uma delas foram coletadas duas amostras, uma embalada, lacrada

e industrializada, acondicionada em prateleira, e outra comercializada a granel, ambas armazenadas em caixas de madeira com tampa, à temperatura ambiente. No total foram coletadas 16 amostras de quatro marcas diferentes (10 g.amostra⁻¹). As coletas foram realizadas no período de agosto de 2004 a abril de 2005, nas quatro estações do ano. Para cada estação coletaram-se quatro amostras, todas dentro do prazo de validade.

As análises realizadas em duplicata seguiram os procedimentos descritos pelo *Compendium of Methods for Examination of Foods*²⁸. A partir da solução obtida, retirou-se 5 mL de amostra e verteu-se 1 mL por placa, resultando em 5 placas por amostra, 20 placas por estação e 80 placas no total.

As suspensões foram plaqueadas em meio de cultura PDA (Potato Dextrose Agar) e permaneceram em estufa a 28 ± 1 °C em torno de 8 a 10 dias. Posteriormente, os fungos desenvolvidos foram analisados e identificados. A identificação baseou-se na morfologia macroscópica, características das colônias, características do verso e reverso do crescimento na placa, formação de pigmentos e morfologia microscópica, com auxílio de chaves de identificação^{10,9,26}.

3 Resultados e discussão

Nas amostras analisadas verificou-se o desenvolvimento de vários fungos, entre os quais *Mucor circinelloides*, *Rhizopus* sp., *Alternaria* sp. e *Micelia sterilia*. O desenvolvimento dos fungos *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* e suas características macroscópicas e microscópicas podem ser observadas nas Figuras 1 e 2.



Figura 1. Visualização macroscópica: placas de cultura axênica dos fungos a) *Aspergillus flavus*; b) *Fusarium solani*; e c) *Penicillium* sp.

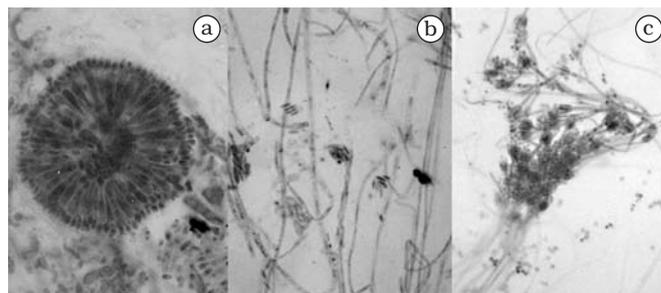


Figura 2. Visualização microscópica dos fungos a) *Aspergillus niger*; b) *Fusarium solani*; e c) *Penicillium griseofulvum*.

Os resultados obtidos indicam uma baixa incidência do gênero *Fusarium* em todas as estações, sendo o menos representativo entre os grupos analisados. A única espécie encontrada, *Fusarium solani*, (Figura 1 e 2) esteve presente somente na

estação primavera e em amostra lacrada. *Fusarium* é um fungo encontrado no campo, invade as sementes e grãos durante o amadurecimento e o dano é causado antes da colheita¹². Pesquisas alertam que dependendo das condições de temperatura e umidade, este fungo pode também ser encontrado durante o armazenamento dos produtos. As fumonisinas, toxinas produzidas por este grupo de fungos foram detectadas naturalmente em vários alimentos, principalmente em milho e derivados produzidos em vários países, inclusive no Brasil, indicando a exposição do homem às micotoxinas¹⁸. Embora estudos não evidenciem o *F. solani* como produtor de micotoxinas em grãos, este fungo pode provocar a morte de animais, causada por infecção respiratória a partir da ingestão de batatas-doces mofadas e contaminadas. Várias toxinas produzidas por *F. solani* estão associadas à causa de lesão pulmonar e pneumonia intersticial que ocorrem freqüentemente em bovinos, ratos, coelhos e cobaias⁶. Este gênero é um importante causador de infecções profundas em pacientes transplantados, neutropênicos e que fazem diálise. Sendo assim, *F. solani*, entre outras espécies, é freqüentemente isolado em casos com humanos¹⁴.

A estação de outono apresentou o menor desenvolvimento de fungos, embora tenha sido a mais representativa no grupo dos *Aspergillus*, quando evidenciou-se a presença de *A. niger* (Figura 2), representando 11 UFC.g⁻¹ na amostra a granel da banca B, este fungo não tem sido identificado como produtor de micotoxinas. Estudos indicam o *A. niger* como causador de infecção micótica e de aborto em bovinos, sendo o primeiro caso evidenciado no Brasil⁵. Amostras de granola a granel coletadas nesta banca não apresentaram desenvolvimento de fungos nas estações de inverno e primavera (Figura 3).

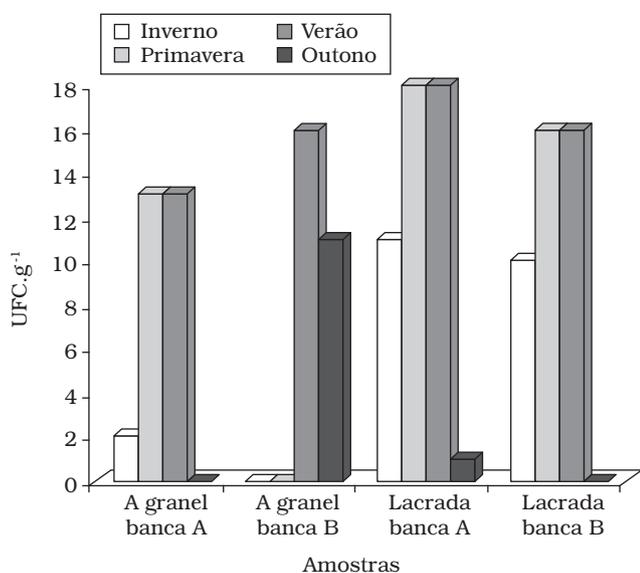


Figura 3. Total de Unidades Formadoras de Colônias (UFC.g⁻¹) de fungos observados nas amostras de diferentes marcas e nas quatro estações.

O grupo de maior contaminação em grãos armazenados e subprodutos alimentícios constituem-se de espécies de *Aspergillus*¹², indicando uma concordância com os resultados obtidos neste trabalho, onde foi constatada a presença deste

grupo em três estações do ano. O fungo *Aspergillus* (Figura 1 e 2) foi constatado no inverno, nas amostras lacradas das bancas A e B e na amostra a granel da banca A. Nas estações de verão e outono sua presença foi constatada nas amostras a granel da banca B. Considerando as quatro estações foram evidenciadas 15 UFC de *Aspergillus*.

O *Aspergillus flavus* (Figura 1), o qual foi constatado nas amostras a granel e lacradas da estação inverno, é um importante produtor de toxinas, denominadas aflatoxinas B1, B2, G1 e G2^{23,24}, sendo sua descoberta descrita em 1960, por provocar um surto com alta letalidade em perus na Inglaterra^{3,25} e que pequenas quantidades são suficientes para causar atividade tóxica e aguda em vários animais, inclusive provocando danos hepáticos e hemorragias no trato gastrointestinal humano⁷. Aproximadamente 35% dos casos de câncer em humanos estão relacionados diretamente a dietas contaminadas por aflatoxinas, ocorrendo principalmente em países tropicais e causando principalmente câncer hepático. A redução da exposição da população a aflatoxinas e a diminuição dos riscos à saúde serão possíveis com um constante trabalho da vigilância sanitária, com os produtores de alimentos⁴.

Conforme a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) que gerencia o Programa Nacional de Monitoramento da Qualidade Sanitária de Alimentos (PNMQSA), a presença de aflatoxina é um dos parâmetros analisados na verificação da qualidade dos produtos, a fim de prevenir e garantir a melhoria da qualidade sanitária dos alimentos comercializados no país. Porém a resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 não faz referência à contagem de fungos e leveduras em granolas².

O fungo *Penicillium* sp. (Figura 1) foi identificado nas quatro amostras da estação verão e também em uma amostra lacrada do inverno. É um gênero muito numeroso, sendo que várias espécies estão envolvidas no processo de deterioração em cereais e produção de micotoxinas, estão presentes também em milho e derivados, crescendo em condições nas quais a umidade apresenta-se mais elevada do que a exigida pelos *Aspergillus*²¹.

Penicillium spp. é considerado um fungo presente geralmente em produtos armazenados²⁴, é também um importante produtor de micotoxinas, como a toxina patulina, encontrada freqüentemente em frutas e cereais. Estes produtos encontrados na granola podem estar sujeitos à contaminação por esta proteína tóxica, pois estudos apontam esta toxina como causa de efeitos neurotóxicos, imunológicos e alterações gastrointestinais em animais⁹, estando presente também em outros ambientes como o ar¹³. 1 UFC de *Penicillium griseofulvum* (Figura 2) foi identificado em amostra a granel, banca A, no verão.

Estudos com fungos anemófilos, presentes no ar, têm evidenciado a estação de verão com predominância no desenvolvimento de fungos, enquanto o outono apresentou o menor número de esporos¹³. Isso também pode ser observado em relação à granola, quando verificou-se que as amostras coletadas no verão apresentaram maior desenvolvimento de fungos, enquanto a estação de outono foi a menos representativa em relação às demais (Figura 3).

Embora a presença do conjunto micelial não seja constatada em determinados alimentos, não significa que os mesmos estejam isentos de toxinas, pois muitas micotoxinas podem permanecer viáveis mesmo na ausência do fungo, sendo assim, não são facilmente degradáveis¹⁵.

Embora o trabalho não tenha objetivado o estudo de bactérias na granola, cabe salientar que em 100% das amostras, observou-se crescimento bacteriano. Este aspecto pode ser preocupante, pois algumas bactérias podem causar intoxicações e infecções alimentares, representando riscos à saúde⁷.

Além da presença de vários outros fungos, *Mucor circinelloides* e *Rhizopus* sp. foram identificados, sendo normalmente encontrados em solos, vegetais, frutas e grãos armazenados, e são considerados contaminantes comuns dos locais onde os produtos armazenados são processados¹², explicando assim a presença também destes fungos na granola.

4 Conclusões

Os resultados sugerem a necessidade da realização de um monitoramento mais específico de tolerância de micotoxinas na granola, visto que no Brasil somente as aflatoxinas possuem limites máximos em alimentos previstos em legislação⁴, e também uma legislação específica para contagem de fungos em granolas, já que a RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 não faz referência². A granola, por ser um alimento composto por uma grande variedade de produtos, requer mais controle e fiscalização, visando eliminar toda e qualquer possibilidade de ocorrência de fungos produtores de toxinas, pois estes podem comprometer a qualidade dos alimentos, causando sérios problemas à saúde e também podem inviabilizar os produtos.

Referências bibliográficas

- AMADO, M. A. In: **Métodos Imunológicos na Detecção e Determinação de Aflatoxinas em Alimentos**. Disponível em: <http://www.ipv.pt/millennium/Millennium26/26_21.htm>. Acesso em: nov. 2004.
- ANVISA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. On line. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/programa/index.htm>>. Acesso em mai. 2005.
- BOURGOIS, C. M.; MESCLE, J. F.; ZUCCA, J. **Microbiología Alimentaria: Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria**. 1. ed. Zaragoza: Editorial ACRIBIA, S.A, 1994.
- CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.
- CORBELLINI, L. G. et al. Aborto por *Aspergillus fumigatus* e *A. niger* em bovinos no sul do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 2, p. 82-86, 2003.
- FIGHERA, R. A. et al. Pneumonia intersticial em bovinos associada à ingestão de batata-doce (*Ipomoea batatas*) mofada. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 4, p.161-166, 2003.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 1. ed. São Paulo: ATHENEU, 2002.
- GRANADA, G. et al. Caracterização de granolas comerciais. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 87-91, 2003.
- KAWASHIMA, L. M.; SOARES, L. M. V.; MASSAGUER, P. R. de. The development of an analytical method for two mycotoxins, patulin and verruculogen, and survey of their presence in commercial tomato pulp. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 269-273, 2002.
- LACAZ, C. S. et al. **Guia para identificação - fungos Actinomicetos - Algas de interesse médico**. 1. ed. São Paulo: SARVIER, 1998.
- LIMA, I. P. M.; PORTELLA, J. A.; ARIAS, G. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. In: **Comunicado Técnico Embrapa Trigo** nº 56, Passo Fundo, 2000. Disponível em <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co56.htm>. Acesso em: 15 dez. 2004.
- MARCIA, B. A.; LAZZARI, F. A. Monitoramento de Fungos em milho em grão, grits e fubá. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 363-367, 1998.
- MEZZARI, A. et al. Fungos anemófilos na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 5, p. 269-272, 2002.
- NEGRONI, R. et al. Ulcera cutanea provocada por hongos del genero Fusarium. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 30, n. 4, p. 323-328, 1997.
- NUNES, I. L. et al. Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 190-194, 2003.
- OLIVEIRA, C. A. F.; e GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 417-424, 1997.
- PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. 1. ed. São Paulo: MCGRAW-HILL, 1980.
- POZZI, C. R. et al. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p.901-907, 2002.
- PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Glossário Ilustrado de Micologia**. 1. ed. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2004.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN S.A., 2001.
- RIBEIRO, S. A. L. et al. Fungos filamentosos isolados de produtos derivados do milho comercializados em Recife, Pernambuco. **Rev. Bras. Bot.**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 223-229, 2003.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SABINO, M. Pesquisa em micotoxinas no Brasil: a última década em foco. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 33, n. 1, p.1-11, 2002.
- ROSSETTO, C. A. V.; SILVA, O. F.; ARAUJO, A. E. da S. Influência da colheita, da época de colheita e da secagem na incidência de fungos e aflatoxinas em grãos de amendoim armazenados. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 309-315, 2005.
- RUPOLLO, G. et al. Sistemas de armazenamentos hermético e convencional na conservabilidade de grãos de aveia. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1715-1722, 2004.
- SANTURIO, J.M. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. **Rev. Bras. Ciênc. Avic.**, Campinas, v. 2, n. 1, p. 01-12, 2000.
- SILVEIRA, V. D. **Micologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: ÂMBITO CULTURAL, 1995.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: ARTES MÉDICAS, 2000.
- VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium for the Microbiological Examination of Foods**. 3. ed. Washigton: Public Health Association, 1992.