

ISOLAMENTO DE *ASPERGILLUS* SPP, AFLATOXIGÊNICOS DE  
PRODUTOS ALIMENTÍCIOS — SÃO PAULO, CAPITAL \*

Dilma Scala GELLI\*\*  
Miyoko JAKABI\*\*  
Edward PORTO\*\*\*

RIALA 6/699

GELLI, D. SA. JAKABI, M. & PORTO, E. — Isolamento de *Aspergillus* spp aflatoxigênicos de produtos alimentícios — São Paulo, Capital. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50 (1/2): 319-323, 1990.

RESUMO: Foram analisadas 264 amostras de produtos alimentícios, tais como: condimentos, mel, pós para o preparo de alimentos, produtos amiláceos e outros. Destas amostras foram isoladas 269 cepas do gênero *Aspergillus*, sendo identificados nove grupos e quatro espécies. Após cultura em caldo extrato de levedura com 20% de sacarose ("yeast extract medium-sucrose"), foi efetuada análise, por cromatografia em camada delgada em sílica gel, para detecção de aflatoxinas em 215 cepas. A pesquisa de aflatoxinas revelou-se positiva em seis amostras (2,79%), como segue: duas amostras de mel, uma de condimento, duas de produtos amiláceos e uma de pó para o preparo de bebida láctea. As cepas aflatoxigênicas foram: 3 (2,91%) de *Aspergillus* spp; 2(2,66%) do grupo *flavus* e 1 (4,35%) de *Aspergillus flavus*, Link.

DESCRITORES: produtos alimentícios; fungos aflatoxigênicos; *Aspergillus* spp aflatoxigênicos, isolamento.

## INTRODUÇÃO

Desde a sua descoberta, em 1960, as aflatoxinas são objeto de estudo, no que diz respeito à caracterização, poder toxigênico, ocorrência e identificação das cepas de microorganismos capazes de produzi-las. O estudo desta classe de substâncias está caracterizado como um problema real de saúde pública<sup>1,6,13</sup>.

As aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, e G<sub>2</sub>, são classificadas em função de apresentarem fluorescência característica azul ("blue") e verde ("green"), respectivamente, quando observadas sob luz ultravioleta. As aflatoxinas M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub>, são metabólicos tóxicos ("milk toxin"), excretados no leite de mamíferos que consomem rações contaminadas, respectivamente, com aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. Os *Aspergillus* que produzem essas micotoxinas são principalmente o *A. flavus* e *A. parasiticus*. Estas toxinas são consideradas tóxicas, teratogênicas e agentes de mutagênese e carcinogênese<sup>14</sup>.

A incidência de fungos nos alimentos é alta, em especial no nosso país. Os fungos são quantificados e mantêm relação com alteração/deterioração de produtos alimentícios. Entretanto, considerando o risco potencial de presença de aflatoxinas nestes produtos, alguns trabalhos têm sido desenvolvidos para verificar a incidência de fungos produtores de micotoxinas nos alimentos e rações<sup>4,10,13</sup>. Outros trabalhos buscam relacionar as condições intrínsecas do produto alimentício que podem favorecer a multiplicação dos fungos que, conseqüentemente, são contaminados com substâncias metabólicas desses microorganismos<sup>3,5,13,14</sup>.

Considerando a importância das aflatoxinas como risco à saúde e, considerando a incidência de fungos nos produtos alimentícios, foi realizado o presente trabalho com o objetivo de verificar a presença de fungos aflatoxigênicos nas amostras de alimentos enviadas para análise microbiológica.

\* Realizado na Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP e no Laboratório de Micologia Médica do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - Faculdade de Medicina da USP

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz

\*\*\* Da Faculdade de Medicina da USP.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Amostras** — Foram analisadas 264 amostras de produtos alimentícios, incluindo condimentos, mel, pós para o preparo de alimentos, produtos amiláceos e outros. Estas amostras foram recebidas para análise microbiológica, procedentes dos serviços de Vigilância Sanitária (fiscalização e registro), licitação de compra de alimentos e de particulares.

### Métodos

**Tratamento das amostras** — Para a pesquisa de fungos, preparou-se o homogêneo em liquidificador, utilizando-se 25 g (ou ml) da amostra em 225 ml de água peptonada a 0,1% (diluição  $10^{-1}$ ). Após o preparo da diluição seriada, usando 1 ml da solução precedente em 9 ml do mesmo diluente, realizou-se a semeadura em placas pelo método em profundidade, vertendo 15-18 ml de ágar dextrose-batata fundido e acidificado (pH 3,5), após a distribuição de 1 ml das diluições. As placas foram incubadas a 22-25°C /5 dias. Procedeu-se a seleção das colônias para isolamento, através de critérios de aspecto e formação das mesmas<sup>7</sup>.

**Isolamento e produção de toxinas** — As colônias suspeitas de *Aspergillus* foram isoladas em 5 ml de caldo extrato de levedura acrescido de 20% de sacarose ("yeast extract medium - sucrose")<sup>2</sup>, e incubadas a 22-25°C por 7-14 dias. Após esse período, os tubos contendo a cultura foram autoclavados e desprezou-se a massa do fungo. Utilizou-se o caldo para pesquisa das aflatoxinas, por cromatografia em camada delgada em sílica gel. Desenvolveu-se o cromatograma com mistura de clorofórmio-acetona-hexano 85:15:20). As manchas, fluorescentes sob luz ultravioleta (366 nm), correspondentes às aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, e G<sub>2</sub> da amostra foram comparadas com as dos padrões.

**Identificação dos fungos** — Os fungos foram identificados com base no aspecto macroscópico e microscópico.

**Aspecto macroscópico (colônia gigante)** — Cada cepa foi semeada na superfície da placa de Petri, contendo ágar-Czapeck.

As culturas foram mantidas a temperatura ambiente, por aproximadamente 14 dias. As colônias foram observadas no anverso, para verificar textura, tonalidade, presença de exsudato, tempo de crescimento e diâmetro, bem como a tonalidade do verso.

**Aspecto microscópico** — Com auxílio de microscópio estereoscópio foi feito o estudo da for-

ma e tonalidade das cabeças conidiais. A micro-morfologia foi obtida por cultivo em lâmina, não corada das cepas em ágar-Czapeck, segundo método de PORTO et alii<sup>9</sup>. (figura 1)

As cepas foram identificadas pelas características dos conidióforos, vesículas, presença ou ausência de tonalidade nos conídios, células pé, fiálides (unisseriadas ou bisseriadas ou ambas na mesma vesícula), além de mensuração das células utilizando-se as chaves de classificação de RAPER et alii<sup>11</sup>, 1965 e de MCGINNIS<sup>8</sup>, 1980.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras analisadas e as cepas de *Aspergillus* isoladas são mostradas na tabela. Foram isoladas 269 cepas das 264 amostras analisadas, sendo identificados nove grupos do gênero *Aspergillus* e quatro espécies. As espécies são: *A. flavus*, Link, 1809 (pertence ao grupo flavus); *A. fumigatus*, Fresenius, 1863 (pertencente ao grupo fumigatus); *A. terricola*, Marchal, 1893 (pertencente ao grupo wentii) e *A. parasiticus*, Speare, 1912 (pertencente ao grupo flavus).

Das cepas isoladas, procedeu-se à cromatografia de 215 e, a pesquisa de aflatoxinas foi positiva em seis (2,79%) delas, assim distribuídas: uma (4,35%) dentre 23 de *A. flavus*, Link; duas (2,55%) dentre 75 do grupo flavus e três (2,91%) dentre 103 de *Aspergillus* sp.

As cepas produtoras de aflatoxinas foram isoladas de mel (duas amostras); de condimento (uma amostra); de produtos amiláceos (duas amostras) e de pó para o preparo de bebida láctea (uma amostra). Estas cepas foram capazes de produzir aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub>, com exceção de *Aspergillus* sp isolada de produtos amiláceos, produtora só de B<sub>1</sub>.

Estes resultados indicam que a incidência de fungos do gênero *Aspergillus* é alta nos produtos alimentícios. Demonstram, também que estes fungos podem produzir e liberar aflatoxinas, na dependência de condições favoráveis que permitam o seu ciclo biológico completo, incluindo evidentemente, a fase de esporulação. A incidência de fungos aflatoxigênicos em produtos alimentícios entretanto, não mantém relação direta com a presença de aflatoxina B<sub>1</sub>, considerando dados da literatura especializada no Brasil<sup>12</sup>. Este estudo sugere a necessidade de maiores avaliações das condições de armazenamento/consevação, assim como das características intrínsecas do produto, que favorecem a produção de micotoxinas e afetam a vida dos fungos em cada tipo de produto alimentício, para verificar em quais etapas pode ocorrer a multiplicação e produção de micotoxinas.

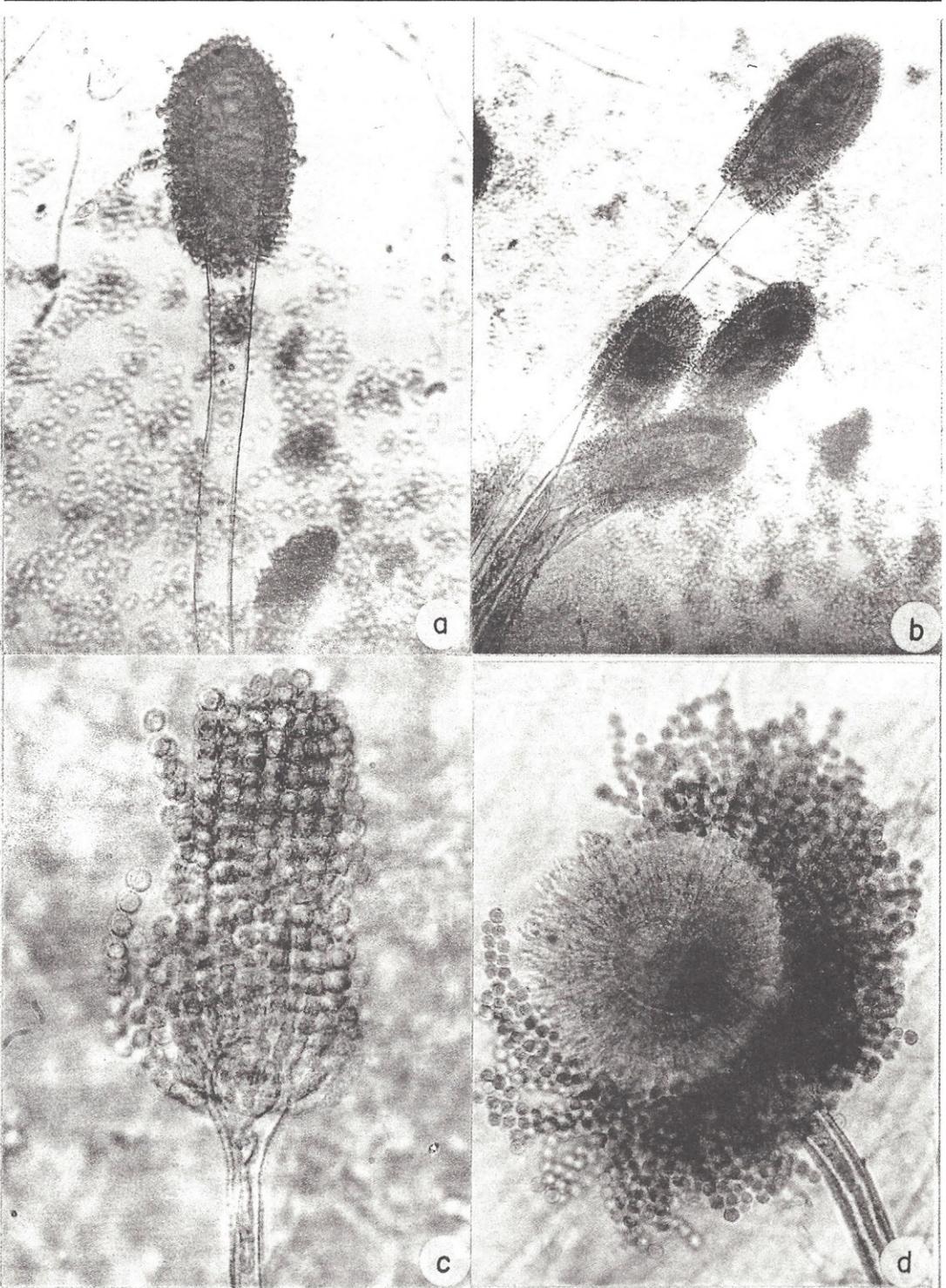


Fig. 1 — Aspectos micromorfológicos de *Aspergillus* spp. Cultivo em lâmina, não corado, em ágar-Czapek.  
a,b) *Aspergillus* do grupo *clavatus* (100 e 63 X);  
c) *Aspergillus* do grupo *flavus* (200 X);  
d) *Aspergillus* do grupo *ochraceus* (160 X). Fotomicrografias; E. Porto.

TABELA 1

Identificação em grupos, gêneros e espécies de *Aspergillus* isolados de produtos alimentícios

Alimentos	Número de amostras	Grupos, gêneros e espécies de <i>Aspergillus</i>													Total de Cepas	
		(2)	(1)	(1)	(3)	(1)	(3)	(1)	(1)	(3)	(1)	(3)	(1)	(1)	Total de cepas cromatografadas	Total de cepas não cromatografadas
		<i>Aspergillus</i> sp	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus wentii</i>	<i>Aspergillus flavus</i> , Link	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> , Fresenius	<i>Aspergillus cremens</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i> , Speare	<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Aspergillus terricola</i> , Marchal	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Aspergillus terreus</i>		
Amiláceos	138	71	35	11	5	4	3	3	1	—	3	—	—	—	122	14
Condimentos	23	6	9	4	6	3	1	—	1	—	—	—	—	—	23	7
Mel	3	2	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	—
Pós para o preparo dos alimentos	36	9	15	6	3	2	—	—	—	—	—	1	—	—	20	16
Produtos Diversos	64	15	16	3	8	10	2	1	2	3	—	2	1	1	47	17
Total	264	103	75	24	23	19	6	4	4	3	3	3	1	1	215	54
(1) grupo					(2) gênero					(3) especial						

Das espécies e grupos encontrados no presente trabalho, o produtor mais significativo de aflatoxina é o *A. flavus*, Link.

tores de outras micotoxinas e a avaliação da metodologia de isolamento dos fungos toxigênicos, para dimensionamento sanitário que existe em relação às micotoxinas nos produtos alimentícios.

### CONCLUSÃO

Dos resultados obtidos neste trabalho, sugere-se que sejam realizados outros levantamentos para melhor avaliação da incidência destes fungos nos produtos alimentícios, assim como a utilização de outros substratos, além do "Yeast extract medium - sucrose", para verificar a produção de aflatoxinas, a pesquisa de fungos produ-

### Agradecimentos

Agradecemos à Seção de Meios de Cultura pela elaboração dos respectivos meios e a Seção de Química Biológica pelas facilidades que permitiram a leitura dos cromatogramas, incluindo o fornecimento de padrão de aflatoxinas.

GELLI, D.S.; JAKABI, M. & PORTO, E. — Isolation of aflatoxigenic *Aspergillus* spp from food products - São Paulo, Capital. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50(1/2): 319-323, 1990.

ABSTRACT: There were analysed 264 samples of food products, that included: natural flavours, honeys, powdered foods, starch products and others. From these samples, 269 strains of *Aspergillus* genera were isolated. The growth of 215 strains, on yeast extract broths supplemented with 20% of sucrose (YES), was tested by thin layer chromatography in silica gel for aflatoxin. The tests were positive in six samples (2,79%) respectively: in two samples of honey, two of starch products, one of natural flavour and one of powdered product for milk beverage. The aflatoxigenic strains were three (2,91%) of *Aspergillus* sp: two (2,66%) of flavus group and one (4,35%) of *Aspergillus flavus*, Link.

DESCRIPTORS: Food products; aflatoxigenic molds; aflatoxigenic *Aspergillus* spp.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CAMPBELL, T.C. & STOLOFF, L. — Implication of mycotoxin for human health. *J. agric. Food Chem.*, 22: 1006-1015, 1974.
2. DAVIS, N.D.; DIENER, V.L. & ELDRIDGE, D.V. — Production of aflatoxin B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub> by *Aspergillus flavus* in a semisynthetic medium. *Appl. Microbiol.*, 14: 378-380, 1966.
3. FARAG, R.S.; EL-LEITHY, M.A.; BASYONY, A.E. & DAW, Z.Y. — Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a medium containing plant hormones, herbicides or insecticides. *J. Food Protect.*, 50: 1044-1047, 1987.
4. FRANK, H.K.; BETANCOURT, L. & EIROA, M.N.U. — A castanha-do-Pará II - Deterioração e condições de formação de aflatoxina. *Bol. SBCTA.*, 15: 367-378, 1981.
5. GOURAMA, H. & BULLERMAN, L.B. — Mycotoxin production by molds isolated from "greek-style" black olives. *Int. J. Food Microbiol.*, 6: 81-90, 1988.
6. HAYES, A.W. — Mycotoxins — A real or potencial problem — Introduction. *J. Food Protect.*, 41: 373-374, 1978.
7. KOBURGER, J.A. & MARTH, E.H. — Yeasts and molds. In: SPECK, M.L. (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington, APHA, 1984. c.17.
8. MCGINNIS, M.R. — *Aspergillus Micheli* ex Link, 1821. I. n: MCGINNIS, M.R. — *Laboratory Handbook of Medical Mycology*. New York, Academic Press, 1980. p. 182-190.
9. PORTO, E.; TAKASHI, N.; HEINS E.M. & LACAZ, C.S. — Nuevo metodo para microcultivo de hongos. *Rev. argent. Micologia*, 4: 24-29, 1981.
10. PURCHIO, A.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R.; BARBIERE, W.; MEIRELES, M.C.A.; SABINO, M. & LIDA, S. — Micotoxinas (aflatoxinas, patulina, ochratoxina A e esterigmatocistina) e correspondentes fungos mitoxigênicos em rações destinadas ao gado leiteiro. *Rev. Microbiol.* 19: 172-176, 1988.
11. RAPER, K.B. & FENNEL, D.L. — *The genus "Aspergillus"*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1965.
12. SABINO, M.; LAMARDO, I.C.A.; INOMATA, E.I.; ICHIKAWA, A.H. & GIANNATTASIO, C.M.P. — Ocorrência de aflatoxina B<sub>1</sub> em produtos alimentícios e rações animais, consumidos no Estado de São Paulo e em várias regiões do país, no período de 1980 a 1987. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 48: 81-85, 1988.
13. STOLOFF, L. — Toxigenic Fungi. In: SPECK, M.L. (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington, APHA, 1984. c.41.
14. ZAIKA, L.L. & BUCHANAN, R.L. — Review of compounds affecting the biosynthesis or bioregulation of aflatoxins. *J. Food Protect.* 50: 691-708, 1987.

Recebido para publicação em 19 de março de 1990.

