

Identificação de fungos produtores de micotoxinas cancerígenas em pães de sanduíches vendidos no centro comercial de Macapá-AP

Identification of cancer producing fungi Mycotoxins bread sandwiches sold in the commercial center of Macapa-AP

Rayra Gomes dos Santos¹, Mayara Cristina Dias¹, Claude Porcy², Nahon Sá Galeno³

¹ Faculdade Estácio de Macapá-AP

² Mestre em Biologia Parasitária pelo Centro Universitário do Maranhão, professor da Faculdade Estácio de Macapá-AP e Biomédico no Governo do Estado do Amapá

³ Mestre em Ciência da Motricidade Humana pela Universidade Castelo Branco UCB-RJ e professor da Faculdade Estácio de Macapá-AP

Endereço para correspondência: Rayra Gomes dos Santos - rayra-lorranne@hotmail.com

Palavras-chave

Micotoxicoses
Alimentação
Toxina fúngica

Keywords

Mycotoxicoses
Feed
Fungal Toxin

Objetivo: Identificar a presença de fungos produtores de micotoxinas cancerígenas em pães de sanduíches vendidos nas panificadoras do centro comercial de Macapá. **Método:** Foi realizado um estudo qualitativo, transversal, exploratório, por meio de análises laboratoriais em 15 amostras de pães, que passaram por procedimento microbiológico para o isolamento fúngico e posterior identificação do gênero por técnica microscópica. **Resultado:** Em 73% das amostras, houve o crescimento de colônias fúngicas com presença de fungos produtores de micotoxinas cancerígenas. Em 39,9% das amostras, foram identificados fungos do gênero *Fusarium sp*, todos das espécie *F. graminearum*; em 26,6% das amostras, foram identificados fungos do gênero *Aspergillus sp* em duas espécies, sendo 19,95% da espécie *Aspergillus flavus* e 6,65% da espécie *Aspergillus versicolor*, e em 6,4%, fungos do gênero *Penicillium sp*, mas apenas da espécie *Penicillium corylophilum*. **Conclusão:** Houve um crescimento significativo de espécies fúngicas produtoras de micotoxinas cancerígenas nos sanduíches analisados; entretanto, para maior expressão dos resultados, seria necessária a análise das amostras sob o aspecto micotoxicológico, por meio de quantificação de micotoxinas fúngicas, para saber se os fungos encontrados produzem micotoxinas acima dos valores aceitos pela legislação vigente. Os fungos encontrados representam um risco potencial à saúde pública.

Objective: To identify the presence of carcinogenic mycotoxin producing fungi bread sandwiches sold in bakeries the commercial center of Macapa. **Method:** A qualitative study, cross exploratory was carried out by means of laboratory tests on samples fifteen rolls, the samples went through microbiological procedure for fungal isolation and further identification of the genus by microscopic technique. **Results:** In samples was 73% of the growth of fungal colonies presence of mycotoxin producing fungi cancer. 39.9% of the samples were identified fungi of the genus *Fusarium sp* all species of *F. graminearum*, in 26.6% of the sample of the genus *Aspergillus sp* fungi were identified in two species being 19.95% of the species *Aspergillus flavus* and 6, 65% of the species *Aspergillus versicolor* and 6.4% fungi of the genus *Penicillium sp* only the species *Penicillium corylophilum*. **Conclusion:** There was a significant growth-producing fungal species carcinogenic mycotoxins in the analyzed sandwiches, however for increased expression result would require the analysis of samples on mycotoxicological aspect through quantification of fungal mycotoxin whether the found fungi produce mycotoxins above the levels accepted by law. Fungi found pose a potential risk to public health.

INTRODUÇÃO

Na decomposição de alimentos os fungos filamentosos produzem metabólitos secundários, chamados de micotoxinas, que produzem uma variedade de doenças e síndromes clínicas, e estão relacionadas com a formação de tumores¹.

O consumo de alimentos contaminados com micotoxinas tem sido associado a casos de intoxicação humana ou micototoxicoses, resultando até em morte². Isso ocorre por serem altamente tóxicas, apresentando propriedades imunossupressoras, alergênicas, teratogênicas, mutagênicas e/ou carcinogênicas³⁻⁴.

Para a expressão do câncer, é necessário que a micotoxina se ligue aos ácidos nucleicos principalmente ao DNA; essa ligação é do tipo covalente e ocorre entre a molécula de micotoxina e o DNA mitocondrial de células, principalmente do fígado. Depois que a micotoxina se liga ao DNA, ocorrem mutações pontuais e mutações que alteram a sequência do DNA, causando o câncer⁵.

Os alimentos contaminados por fungos filamentosos, ao serem ingeridos, permitem que os metabólitos gerados pelo fungo invadam tecidos ou fluidos do hospedeiro. As micotoxinas são produzidas em ambientes adequados, sobre substratos adequados e por linhagens fúngicas específicas⁶.

Entre os gêneros fúngicos envolvidos na produção de micotoxinas destacam-se: *aspergillus sp*, *penicillium sp* e *fusarium sp*. As espécies de *aspergillus sp* e *penicillium sp* costumam contaminar alimentos durante a secagem e o armazenamento, enquanto que as espécies de *fusarium sp* contaminam as plantas antes ou depois da colheita⁷.

As aflatoxinas são micotoxinas produzidas por linhagens de fungos do gênero *Aspergillus*, sobretudo pelas espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, as quais naturalmente podem se desenvolver em alimentos. Essas micotoxinas têm sido detectadas em sementes de culturas com importância mundial, como: milho, amendoim, feijão, arroz, trigo, algodão e frutas⁸.

As aflatoxinas possuem elevada toxicidade aguda e crônica, devido à capacidade de ligar-se a ácidos nucleicos e nucleoproteínas celulares, resultando em efeitos deletérios sobre a síntese de proteína celular. Todas as aflatoxinas produzem efeitos adversos, e a aflatoxina B1 exprime maior toxicidade, seguida pelas aflatoxinas G1, B2 e G2. A aflatoxina B1 é uma das substâncias mais tóxicas que ocorrem naturalmente, relatadas até agora. A ingestão de AFB1 por humanos e animais pode causar hepatite tóxica, hemorragia, edema, imunossupressão, carcinoma hepático e consequente morte⁹⁻¹⁰.

A ocratoxina A (OTA) é produzida pelos fungos dos gêneros *aspergillus sp* e *penicillium sp*, principalmente pela espécie *penicillium verrucosum*, sua distribuição é global, estando presente em cereais, café, vinho, sucos, uvas e cerejas¹¹.

Testes realizados na Europa verificaram que a maioria dos europeus apresenta alguma concentração de ocratoxina no sangue; também foi observado um grande número de casos de câncer no trato urinário nos indivíduos estudados; com isso, se relacionou a carcinogênese com a OTA¹².

Sua ação tóxica acontece sobre o sistema renal. A nefrotoxicidade manifesta-se desde a alteração do volume dos rins, alterações na osmolaridade e volume da urina,

alterações na função renal, até o desenvolvimento de adenomas e tumores renais¹³.

As espécies fúngicas produtoras de fumonisinas são *fusarium verticillioides* e *fusarium subglutinans*. São conhecidos 16 compostos tóxicos de fumonisinas, sendo a fumonisina B1 a que mais interfere no metabolismo do esfingolípido, causando efeitos carcinogênicos no fígado de ratos e, provavelmente, câncer de esôfago em humanos⁷⁻¹⁴.

Acredita-se que a carcinogênese gerada pelas fumonisinas não envolva a interação com o DNA, e sim uma provável intervenção na biossíntese de esfingolípídios, que gera problemas à atividade celular, visto que os esfingolípídios são substâncias essenciais para a composição da membrana, para a comunicação célula-célula e para fatores de crescimento¹⁵.

O trigo é matéria-prima para a elaboração de alimentos consumidos diariamente, como hábito alimentar, na forma de pães, biscoitos, bolos e massas, alimentos que fazem parte da base da pirâmide alimentar¹⁶.

A Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005, define pão como o produto obtido da farinha de trigo e/ou outras farinhas, adicionado de líquido, resultante do processo de fermentação ou não e cocção, podendo conter outros ingredientes, desde que não descaracterizem o produto. Pode apresentar cobertura, recheio, formato e textura diversos¹⁷.

O trigo é um cereal que compõe expressiva parte da dieta de aproximadamente um terço da população mundial. Os grãos de cereais, em função de suas características, estão sujeitos à contaminação por fungos, incluindo aqueles produtores de micotoxinas. Essa contaminação pode ocorrer no campo, durante a colheita e no armazenamento¹⁸.

As micotoxinas são quimicamente estáveis, tendendo a se manter intactas durante o armazenamento e o processamento, incluindo-se a panificação sob altas temperaturas. Por esses motivos, as micotoxinas são uma preocupação crescente, considerando que, com base em dados de monitoramento, limites máximos de tolerância de micotoxinas vêm sendo estabelecidos e regulados por legislação em princípios normativos, em níveis cada vez mais restritivos, visando a garantir a segurança dos alimentos comercializados¹⁹.

Os alimentos comercializados no Brasil, por exemplo, deverão respeitar um limite máximo para a presença de micotoxinas, substâncias tóxicas produzidas por fungos e encontradas principalmente em grãos. É o que determina a Resolução RDC 07/2011, publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). A norma da Agência estabelece esses limites em 14 categorias de alimentos, entre eles

cereais e produtos de cereais, como é o caso da farinha de trigo e do pão²⁰.

MÉTODOS

Foi realizado um estudo qualitativo, transversal, exploratório, por meio de análises laboratoriais em amostras de pães de sanduíches coletadas aleatoriamente de 15 panificadoras situadas nas avenidas de maior fluxo do centro comercial de Macapá.

As amostras foram coletadas no mês de agosto de 2014, quando de cada panificadora foram recolhidas duas amostras, individualmente, em sacos de polietileno de uso alimentar e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade Estácio Seama.

Para o isolamento das colônias fúngicas, foi realizada a contagem de fungos filamentosos em unidades formadoras de colônias por grama de alimento (UFC.g⁻¹), segundo metodologia de diluição decimal seriada em placas descrita por Pitt e Hocking (2009)²¹ e modificada por Neves (2013)¹⁸.

Foram homogeneizados 25,0g de cada amostra em 225,0ml de água peptonada a 0,1% esterilizada. A partir dessa diluição inicial de 10⁻¹, foram preparadas diluições decimais seriadas até 10⁻³. A inoculação de cada uma das diluições foi efetuada em duplicata com alíquotas de 0,1 ml por placa de Petri, na superfície do meio de cultivo dicloran rosa bengala cloranfenicol (DRBC) com auxílio de alça de Drigalski esterilizada e em tubos inclinados com o meio de cultura ágar mycosel. As placas e os tubos foram incubados a 25°C durante sete dias em estufas microbiológicas com controle de temperatura. Transcorrido tal período, todas as placas e tubos foram observados, sendo selecionadas para contagem aquelas que apresentaram de 10 a 100 UFC.g⁻¹.



Figura 1: Colônias fúngicas em tubo inclinado.



Figura 2: Colônias fúngicas em placa de Petri.

Para a identificação das diferentes espécies fúngicas, foram analisadas as características macroscópicas observando-se a morfologia da colônia, sendo cor, textura, superfície e pigmento difusível no meio de cultura, e 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, 2004)²⁴.

Em uma placa de Petri esterilizada, foram colocadas duas lâminas também estéreis, sendo uma suporte para a outra, onde foi adicionado um cubo do meio de cultura ágar Sabouraud-Dextrose para o semeio de partes da colônia. Em seguida, foram realizados quatro repiques recentes da colônia do fungo, que foi adicionada nos quatro cantos do cubo meio de cultura ágar Sabouraud-Dextrose disposto sobre a lâmina, cobrindo-se com lamínula esterilizada. A câmara úmida foi então adicionada ao fundo da placa de Petri, recoberta com algodão estéril embebido com 1 a 2ml de água destilada também estéril; a placa foi tampada e deixada a temperatura ambiente por sete dias. Após o período de incubação, realizaram-se a inativação do fungo e a fixação de suas hifas, acrescentando ao algodão 1 ml de formol e vedando a placa com fita adesiva por 24 horas. Em seguida, a lamínula foi retirada com o auxílio de pinça, pingando-se uma gota do corante Lactofenol-algodão e montando sobre outra lâmina. Foram observadas em microscópio óptico com objetiva com capacidade de aumento de quarenta vezes as características como tipo, cor e disposição das hifas (septada ou cenocítica, hialina ou demácia) e a formação de esporos para a identificação dos gêneros fúngicos.



Figura 3: Microcultivo

RESULTADOS

Das amostras coletadas para análise, em 86,5% houve o crescimento de colônias fúngicas tanto no meio dicloran rosa bengala cloranfenicol quanto no meio de cultura ágar mycosel, e em 13,4% não houve crescimento. Na identificação dos gêneros fúngicos através da técnica de microcultivo, 73% das amostras apresentaram crescimento de gêneros do interesse da pesquisa, onde em 39,9% das amostras foram identificados fungos do gênero *Fusarium sp* todos da espécie *F. graminearum*, em 26,6% foram identificados fungos do gênero *Aspergillus sp*, sendo 19,95% da espécie *aspergillus flavus* e 6,65% da espécie *aspergillus versicolor*, e em 6,4% fungos do gênero *penicillium sp*, mas apenas da espécie *penicillium corylophilum*. Em 13,6% das amostras analisadas pelo microcultivo houve o crescimento de fungos que não eram de interesse para o presente estudo.

Tabela 1: Gêneros de fungos isolados das amostras de pães comercializadas em Macapá-AP, 2014.

Gêneros Fúngicos	Nº	%
Fusarium sp.	6	39,90%
Aspergillus sp.	4	26,60%
Penicillium sp.	1	6,40%
Outros	2	13,60%
TOTAL	13	86,50%

DISCUSSÃO

A exposição humana a micotoxinas pelo consumo de alimentos contaminados é questão de saúde pública, já que cerca de 35% dos casos de câncer humano estão relacionados à dieta²⁵. O pão é um alimento consumido com muita frequência pela população, não só de Macapá, mas do mundo todo, o que torna o risco de contaminação ainda maior.

O *fusarium graminearum* foi a espécie de prevalência significativa identificada nesse estudo, sendo o principal produtor da micotoxina zearalenona.

O gênero *aspergillus* foi o segundo gênero prevalente encontrado nas amostras analisadas. Esse gênero também foi prevalente em estudos de Neves (2011)¹⁸, sendo encontrado em 10% das amostras de pão do tipo francês. A presença de fungos desse gênero em alimentos merece atenção, pois são capazes de produzir aflatoxinas, que são comumente encontradas em grãos e seus derivados.

Houve um crescimento pouco expressivo das espécies de *penicillium sp*, a espécie pertencente ao gênero *penicillium sp* encontrada nas amostras de pão são classificadas como fungos de armazenamento e estão associadas a perda da qualidade dos alimentos, além de serem potenciais produtoras da micotoxina ocratoxina.

As toxinas produzidas por espécies desses gêneros podem estar presentes em alimentos, como os derivados da farinha de trigo, que constituem a principal fonte de exposição para o homem.

Alguns dos gêneros prevalentes em amostras analisadas de farinha de trigo por Neves (2011)¹⁸ foram: *Cladosporium* 31,8%, *Aspergillus* e seus teleomorfos 29,5% e *Penicillium* 27,3%. Os gêneros *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Penicillium* também foram registrados entre os predominantes em farinhas de trigo por Gashgari et al. (2010)²², Cabañas et al. (2008)²³.

Embora não tenha sido testada a capacidade micotoxigenica destas espécies identificadas, a presença de fungos nos alimentos é indesejável, principalmente dos gêneros *Aspergillus sp*, *Penicillium sp* e *Fusarium sp*, pois compreendem espécies capazes de produzir enzimas deteriorantes, bem como micotoxinas que representam risco de contaminação ambiental, acarretando prejuízos à saúde humana.

Estes dados coletados mostram que, mesmo tendo certos cuidados com os alimentos, é preciso ter sempre uma prevenção maior com higienização do ambiente e manipulação do produto. Foi observado no momento da coleta que as amostras estavam expostas nas panificadoras à temperatura ambiente em prateleiras onde foi possível

observar o acesso de insetos como moscas e formigas aos produtos. A contaminação pode ter decorrido não só do processamento da farinha de trigo, mas também no ato de produzir a massa do pão, nas formas, sacolas, luvas os quais os trabalhadores utilizam e até devido à própria higienização temperatura e à umidade do local.

CONCLUSÃO

Houve um crescimento significativo de espécies fúngicas produtoras de micotoxinas cancerígenas nos pães analisados; entretanto, para uma maior expressão dos resultados seria necessária a análise das amostras sob o aspecto micotoxicológico por meio de quantificação de micotoxinas fúngicas para saber se os fungos encontrados produzem micotoxinas acima dos valores aceitos pela legislação vigente. Os fungos encontrados representam um risco potencial à saúde pública.

REFERÊNCIAS

- PEREIRA, K. C.; SANTOS, C. F. Mycotoxins and the ir carcinogenic potential Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde Vol. 15, Nº. 4, Ano 2011 p. 147-165, 2011.
- GARCIA, D.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. et al. Modelling the effect of temperature and water activity in the growth boundaries of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus*. Food microbiology, v. 28, n. 3, p. 406-417, 2011.
- GARCIA, D.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. et al. Predicting mycotoxins in foods: a review. Food Microbiology, v. 26, n. 8, p. 757-769, 2009.
- KHOMUTOV, R. M.; DZHAVAKHIYA, V. G.; KHURS, E. N. et al. Chemical regulation of mycotoxin biosynthesis. Doklady Biochemistry and biophysics, v. 436, n. 4, p. 25-28, 2011.
- FOOD INGREDIENTS BRASIL. As Micotoxinas. Número 7 2009. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/90.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2014.
- ICB. Instituto de Ciências Biológicas. Agentes Etiológicos das Intoxicações Fúngicas. Disponível em: <http://www.icb.ufmg.br/mic/mic/material/2agentesetiologicosdasintoxicaesfngicas.pdf>>Acesso em: 10 mar. 2014.
- HERMANN, Gislaine; PINTO, Flávia T.; KITAZAWA, Samira E; NOLL, Isa B. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.26, n.1, jan./mar. 2006.
- FACCA, M. C. L.; DALZOTO, P. R. Aflatoxinas: um perfil da situação do amendoim e derivados no cenário brasileiro. Biológico, v. 72, n. 1, p. 25-29, 2010.
- NAKAI, V. K.; OLIVEIRA ROCHA, L. DE; GONÇALEZ, E. et al. Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanut variety. Food Chemistry, v. 106, n. 1, p. 285-290, 2008.
- IDRIS, Y. M. A.; MARIOD, A. A.; ELNOUR, I. A. et al. Determination of aflatoxin levels in Sudanese edible oils. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, v. 48, n. 8-9, p. 2539-2541, 2010.
- VOGEL, Sandra Duarte; JIMENEZ, Luis C Villamil. Micotoxinas en la Salud Pública. Revista Salud Pública, Bogotá, v.8, supl. 1, maio 2006.
- FAZIO, Maria Luiza Silva. Caráter "Killer" e antagonismo de leveduras aplicadas no biocontrole de fitopatógeno smicotoxigênicos em fruta. São Paulo, ago. 2009. Disponível em:<http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/brp/33004153070P3/2009/fazio_mls_dr_sjrp.pdf>. Acesso em: 13 jan 2014.
- NOGUEIRA, S.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Prevalência de ocratoxina em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. Alimentação Humana, v.12, n.2, 2006.
- POZZI, Claudia Rodrigues; ARCARO, Juliana Rodrigues Pozzi; JUNIOR, Irineu Arcaro; FAGUNDES, Helena; CORRÊA, Benedito. Aspectos Relacionados à Ocorrência E Mecanismo de Ação de Fumonisin. Revista Ciência Rural, Santa Maria, v.32, n.5, set./out. 2002.
- FREIRE, Francisco das Chagas Oliveira; VIEIRA, Icaro Gusmão Pinto; GUEDES, Maria Isabel Florindo; MENDES, Francisca Noélia Pereira. Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza. Documentos 110, 1.ed. 2007.
- Scheuer, P, M.; Francisco, A.; Miranda, M, Z.; Limberger, V,M.; TRIGO: CARACTERÍSTICAS E UTILIZAÇÃO NA PANIFICAÇÃO Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.13, n.2, p.211-222, 2011 ISSN 1517-8595
- Ministério da Saúde. Resolução RDC nº. 263, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, set. 2005. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 15 janeiro 2014.
- NEVES, J. A. INTERFERÊNCIA DA FARINHA DE TRIGO NA QUALIDADE MICOLÓGICA E MICOTOXICOLÓGICA DO PÃO TIPO FRANCÊS Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.13, n.2, p.123-134, 2011 ISSN 1517-85952013
- TIBOLA, C. S.; FERNANDES, J. M. C.; DEL PONTE, E. M. ; SPOLTI, P.; PAVAN,W. Micotoxinas Em Trigo No Brasil: Causas, Panorama Atual E Perspectivas Para O Manejo 2012 [acesso 24 fevereiro 2014] disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/.../micotoxinas%20em%20trigo%20Ono%20brasil>.
- ANVISA Relatórios de Atividades 2011 : Limites para Micotoxinas [acesso 24 fevereiro 2014]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/.../Relatório+de+Atividades+2011.pdf>
- PITT J. I.; HOCKING A. D. Fungi and food spoilage. 3 ed., Springer, 2009.

22. GASHGARI, R. M. R. M.; SHEBANY, Y. M. Y. M.; GHERBAWY, Y. A. Y. A. Molecular characterization of mycobiota and aflatoxin contamination of retail wheat flours from Jeddah markets. *Foodborne Pathog Dis.* v. 7, n. 9, p. 1047-1054, 2010.
23. CABAÑAS, R.; BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L. et al. Occurrence of *Penicillium verrucosum* in retail wheat flours from the Spanish market. *Food microbiology*, v. 25, n. 5, p. 642-657, 2008.
24. 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.
25. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981;66:1191-308.

Submissão: 05/11/2014

Aprovado para publicação: 06/06/2016