



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

FUNGOS TOXIGÊNICOS E AFLATOXINAS EM LEVEDURA SECA

Beatriz K. dos **Santos**^{1a}; Beatriz T. **Iamanaka**^{1b}; Marta H. **Taniwaki**^{1c}; Gabriela C. **Moita**^{1c}; Ligia M. **Martins**^{1c}

¹ Instituto de Tecnologia de Alimentos, Microbiologia/CCQA, Campinas/SP

Nº 13235

RESUMO

*No processo de obtenção do etanol, alguns subprodutos são gerados, e dentre estes se destaca a levedura seca. Grande parte da levedura é recuperada e volta para uma nova etapa de fermentação e cerca de 10% é retirada do processo e submetida à secagem. Esta fração tem sido destinada à alimentação animal e recomendada para ser utilizada como suplemento protéico já que contém alto teor de proteínas, cerca de 30 a 60%. Análises realizadas previamente no Instituto de Tecnologia de Alimentos do Estado de São Paulo (ITAL) detectaram em levedura seca, baixas concentrações de aflatoxina B₁, uma toxina produzida por algumas espécies de fungos filamentosos e que está relacionada com a incidência de câncer hepático em animais e humanos. O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a fonte de contaminação da levedura seca por aflatoxinas, através da avaliação das espécies de *Aspergillus section Flavi* em amostras coletadas durante o processo de obtenção do álcool e açúcar. Foram avaliadas 177 amostras de três usinas do estado de São Paulo, quanto à presença de *Aspergillus section Flavi* e aflatoxinas. Estas espécies estiveram presentes apenas em caldo cana, com média de infecção de $6,1 \times 10^3$ UFC/mL. Os níveis de aflatoxinas encontrados foram de $0,43 \mu\text{g/Kg}$ para caldo de cana, $1,72 \mu\text{g/Kg}$ para mel, menor que o limite de detecção para açúcar, $0,56 \mu\text{g/Kg}$ para creme de levedura e $2,55 \mu\text{g/Kg}$ para levedura seca.*

Palavras-chaves: levedura seca, aflatoxinas, *Aspergillus section Flavi*, cana-de-açúcar

^a Bolsista CNPq; Graduação em Química/Unicamp, biakrasilchik@gmail.com, ^bOrientador, ^cColaborador



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

ABSTRACT

*In the process of obtaining ethanol, some byproducts are generated, among these is the dried yeast. Much of the yeast is recovered and return to a new fermentation step and about 10% is removed from the process and subjected to drying. This fraction has been destined for animal feed and recommended to be used as a protein supplement as it contains high protein level, about 30-60%. Analyses conducted at the Institute of Food Technology of the State of São Paulo (ITAL) detected in the dried yeast, low concentrations of aflatoxin B1, a toxin produced by some species of filamentous fungi and which is related to the incidence of liver cancer in animals and humans. The main objective of this study was to evaluate the source of dried yeast contamination by aflatoxins, through the evaluation of *Aspergillus* section *Flavi* species in the samples collected during the process of obtaining alcohol and sugar. A total of 177 samples was evaluated from three plants in the state of São Paulo, for the presence of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins. These species were present only in sugarcane juice, with average infection of 6.1×10^3 UFC/mL. Aflatoxins were found at $0.43 \mu\text{g}/\text{kg}$ in sugar cane, $1.72 \mu\text{g}/\text{kg}$ in honey, lower than the limit of detection in sugar, $0.56 \mu\text{g}/\text{kg}$ in cream yeast and $2.55 \mu\text{g}/\text{kg}$ in dried yeast.*

Key-words: Dried yeast, aflatoxins, *Aspergillus* section *Flavi*, sugarcane

1. INTRODUÇÃO

O Brasil hoje é o maior produtor mundial de cana de açúcar, responsável por cerca de 30% da produção mundial, seguido da Índia e China. Em 2010 chegou a produzir 625 milhões de toneladas, correspondendo a um aumento de 3,4% em relação ao período anterior, de acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2010).

O Brasil não é apenas o maior produtor de cana, como também o primeiro do mundo na produção de açúcar e etanol. Em 2011, do total de cana esmagada, 45% foram destinadas à produção do açúcar e 54,9% destinadas à produção do álcool, gerando um volume total de 25.866,00 bilhões de litros de álcool. Este crescimento tem sido impulsionado pela tecnologia dos automóveis bicombustíveis, aliada à busca de fontes energéticas menos poluentes.

No processo de obtenção do álcool, alguns subprodutos são gerados. Dentre estes se destaca a levedura seca. Grande parte da levedura é recuperada e volta para a uma nova etapa de fermentação e cerca de 10% é retirada do processo e submetida à secagem. Esta fração tem sido destinada à alimentação animal e humana, e é recomendada para ser utilizada como



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

suplemento proteico já que contém alto teor de proteínas, cerca de 30 a 60% (GLAYTON *et al.*, 2001).

Devido à expansão da produção da cana de açúcar e do álcool, há uma tendência para o aumento da produção da levedura seca como fonte de proteína. Contudo o aumento da produção em alguns casos acarreta em falta de controle dos padrões de higiene e em uma possível contaminação microbiológica. Análises realizadas previamente no Instituto de Tecnologia de Alimentos do Estado de São Paulo (ITAL) detectaram em levedura seca, baixas concentrações de aflatoxina B₁, uma toxina produzida por algumas espécies de fungos filamentosos e que está relacionada com a incidência de câncer hepático em animais e humanos (IARC, 1993).

Por ser um subproduto utilizado como ingrediente na alimentação animal e humana, e por haver uma tendência no aumento de seu consumo, torna-se importante um estudo mais detalhado para determinar a origem da contaminação fúngica e da presença de aflatoxinas no processo de obtenção da levedura seca na cadeia produtiva do álcool.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Foram coletadas no total 177 amostras de matéria prima e produtos derivados da cadeia produtiva do etanol e levedura seca, em três usinas do Estado de São Paulo, dentre elas: caldo de cana (73), mel obtido após a concentração do caldo (22), açúcar (23), creme de levedura (22) e levedura seca (37). O caldo foi obtido através da moagem da cana proveniente da amostragem realizada pelo equipamento da empresa, que retirava a cana diretamente do caminhão.

2.2 Análise de fungos

As amostras foram analisadas por meio da técnica de diluição em superfície, utilizando diluições decimais seriadas e plaqueamento em meio Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) e Dicloran 18% Glicerol (DG18) para amostras com alta e baixa atividade de água respectivamente. As placas foram incubadas a 25°C por 5 dias (DOWNES & ITO, 2001).

2.3 Identificação das espécies de *Aspergillus section Flavi*

Todos os isolados pertencentes ao grupo dos *Aspergillus section Flavi* foram isolados em ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA) e incubados a 25°C por 7 dias. Após esta etapa, foram inoculados no mesmo meio e incubados a 25°C, 37°C e 42°C por 7 dias e em ágar *Aspergillus Flavus* e *Parasiticus* (AFPA) e incubados a 30°C por 2 dias (PITT & HOCKING, 2009) para identificação dos isolados (KLICH & PITT, 1988).



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

2.4 Capacidade para produção de aflatoxinas pelos *Aspergillus section Flavi*

Os fungos foram inoculados em ágar Extrato de Levedura Sacarose (YESA) e incubados a 25°C por 7 dias. Um pequeno pedaço do fungo foi cortado e pressionado sob a placa de sílica gel, extraindo a toxina com duas gotas da solução metanol:clorofórmio (1:1). A placa seguiu para a realização da cromatografia de camada delgada, utilizando como fase móvel a solução tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 90%:clorofórmio (7:5:2:5) e comprimento de onda de 365nm. O padrão de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 foi aplicado na placa para comparação com a amostra (FILTENBORG et al., 1983).

2.5 Análise de aflatoxinas

A metodologia utilizada para a análise de aflatoxinas nas amostras de caldo cana e levedura seca foi baseada em STROKA *et al.*, 2000, realizando-se algumas alterações.

2.5.1 Limpeza da amostra

Vinte e cinco gramas de amostra moída foram adicionadas de 2,5g de NaCl e extraídas com 100mL de uma solução de metanol:água (8:2, v/v) em homogeneizador Ultra-Turrax a 10.000 rpm por 3 minutos. Esta solução homogeneizada foi duplamente filtrada através em filtro nº 2 (Whatman) e de microfibras de vidro (Whatman A-H). Em seguida, dez mililitros do filtrado foram diluídos em 60mL de PBS e aplicados em colunas de imunoafinidade específicas para aflatoxinas (Aflatest WB-Vicam) com fluxo de 2-3 mL/ min e seguindo-se à lavagem da coluna com 30mL de água destilada. As aflatoxinas (AF) foram eluídas com 1.250µL de metanol em frasco âmbar e em seguida diluída com água Milli Q até completar 3mL.

2.5.2 Condições cromatográficas

Foi utilizado um sistema Shimadzu LC-10VP HPLC system com detector de fluorescência à 362nm de excitação e 455nm de emissão. Uma coluna guarda C18 Shimadzu CLC G-ODS (5µm,4x10mm) e uma coluna C18 Shimadzu Shimpack ODS (5µm, 4,6x250mm) foram empregadas para separação dos produtos. O sistema estava associado com um reator eletroquímico Kobracell (R-Biopharm) para derivatização pós-coluna das aflatoxinas B1 e G1, ligado a uma corrente de 100µA. A fase móvel utilizada foi água:acetonitrila:metanol (6:2:3, v/v/v), contendo 119mg de KBr e 350µL de ácido nítrico 4M por litro, em um fluxo de 1mL/min.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

2.5.3 Otimização da metodologia

Para a otimização da metodologia em caldo de cana, levedura seca e açúcar, foram realizados testes de recuperação para cada matriz, fortificando a amostra com aflatoxinas. Os testes foram realizados em triplicata. A cada dia de análise foi realizado um controle analítico e calculado o valor da recuperação para nível de contaminação de aflatoxinas menor que 1µg/Kg.

3. RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta a ocorrência das espécies de *Aspergillus section Flavi* em UFC/ml ou g, nas amostras.

Houve alta contagem *Aspergillus section Flavi*, principalmente no caldo da cana de açúcar confirmando a presença destes microrganismos já na matéria prima.

Tabela 1. Ocorrência de *Aspergillus section Flavi* (em UFC/mL ou g) nas amostras analisadas.

Amostras (n)	<i>Aspergillus section flavi</i> (UFC/g ou mL)		
	Média	Mediana	Faixa
Caldo cana (73)	6,1x10 ³	1,1x10 ³	<10 – 1x10 ⁵
Mel (22)	<10	<10	<10
Açúcar (23)	<100	<100	<100
Creme de levedura (22)	<10	<10	<10
Levedura seca (37)	2,70	<100	<100

Aspergillus section Flavi estiveram presentes nas amostras de caldo, como mostram os resultados de média, mediana e intervalos de contagem, em UFC/ml ou g, confirmando a presença destes microrganismos desde a matéria prima utilizada para produção do etanol. As amostras de mel (caldo concentrado), creme de levedura e açúcar, não apresentaram contaminação por estas espécies. Apenas um isolado de *Aspergillus section Flavi* esteve presente em uma amostra de levedura seca. A concentração do caldo, na qual é utilizado o emprego de calor, a centrifugação do mesmo para a obtenção do açúcar, a produção do álcool e a secagem da levedura, são etapas que podem causar a morte dos fungos em geral e destas espécies toxigênicas.

Considerando o total de 177 amostras avaliadas, foram isoladas 226 espécies de *Aspergillus section Flavi* e 88% foram produtores de aflatoxinas, sendo 98,5% produtores de aflatoxinas do grupo B e G e 1,5% produtores de aflatoxinas do grupo B.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Tabela 2. Resultados de aflatoxinas (em µg/Kg) nas amostras analisadas.

Amostras (n)		Aflatoxinas (µg/Kg)				
		B1	B2	G1	G2	Total
Caldo (73)	Média	0,26	<LD ²	0,08	<LD	0,43
	Mediana	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Faixa	ND ¹ - 2,25	ND - 1,40	ND - 0,85	ND - 1,26	ND - 4,09
Mel (22)	Média	1,61	<LD	ND	ND	1,72
	Mediana	1,63	<LD	ND	ND	1,74
	Faixa	0,86 - 1,88	0,09 - 0,14	ND	ND	0,92 - 2,24
Açúcar (23)	Média	<LD	<LD	<LD	ND	<LD
	Mediana	<LD	<LD	<LD	ND	<LD
	Faixa	ND - <LD	ND - <LD	ND - <LD	ND	ND - 0,20
Creme de levedura (22)	Média	0,47	<LD	ND	ND	0,56
	Mediana	0,54	<LD	ND	ND	0,55
	Faixa	0,48 - 0,62	ND - <LD	ND	ND	0,50 - 0,65
Levedura seca (37)	Média	2,00	0,36	0,25	0,18	2,55
	Mediana	1,80	<LD	<LD	<LD	2,01
	Faixa	ND - 7,50	ND - 4,44	ND - 2,56	ND - 3,54	ND - 10,19

¹ ND = Não detectado

² LD = Limite de detecção (Limite de detecção de aflatoxinas B1 = 0,17µg/Kg; B2= 0,07 µg/Kg; G1=0,07 µg/Kg e G2=0,06 µg/Kg, aflatoxinas totais = 0,37 µg/Kg)

Os valores obtidos de recuperação para as amostras de caldo e levedura seca, fortificadas com aflatoxinas, mostraram que o método utilizado (STROKA *et al.*, 2000) foi satisfatório e apresentou boa performance. Todos os valores obtidos estiveram de acordo com a diretiva CE 401/2006 da Comunidade Européia, que estabelece os valores de recuperação para a aflatoxinas de 50 a 120% para níveis de contaminação menor que 1µg/Kg.

Para o caldo de cana os valores de recuperação obtidos foram de 81,6; 79,6; 90,9 e 89,7%, para a levedura seca de 84,2; 74,7; 97,9 e 65,4%, para o creme de levedura de 83,5; 89,5; 71,4 e 68,1%, para o mel de 75,8; 85,6; 70,4 e 71,8% e para o açúcar de 93,2; 82,9; 66,0 e 77,1%, para aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ respectivamente. Os limites de detecção para aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ e totais foram de 0,17; 0,07; 0,07; 0,06 e 0,37 µg/Kg respectivamente.

Foi detectada a presença de aflatoxinas no caldo de cana (0,43µg/Kg) e no mel (1,72µg/Kg). Quando são avaliados os resultados de média e mediana é possível observar que a contaminação total por aflatoxinas nas amostras de caldo em geral foi baixa. O nível máximo encontrado em uma amostra foi de 4,09µg/Kg. Já para o mel, a contaminação foi mais homogênea, com valor de



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

mediana próximo à média. Os valores de aflatoxinas nas amostras de levedura seca foram maiores, com média de aflatoxinas totais de 2,55µg/Kg e valor máximo de 10,19µg/Kg. Não foi detectada a presença de aflatoxinas em amostras de açúcar.

É possível que a contaminação da levedura seca por aflatoxinas seja ocasionada pela presença de *Aspergillus section Flavi* nas amostras de caldo, indicando que esta contaminação seja proveniente da matéria prima. Ao longo do processo, o caldo é concentrado, e, ao entrar em contato com a levedura, utilizada na fermentação, as aflatoxinas podem estar sendo adsorvidas na parede celular da levedura, sendo concentradas após o processo de secagem da levedura.

4. CONCLUSÃO

A presença de *Aspergillus section Flavi*, somente nas amostras de caldo, indica que a possível fonte de contaminação das aflatoxinas na levedura seca seja proveniente da matéria prima.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ/Pibic pela bolsa concedida e à Fapesp pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto. Beneficiário de auxílio financeiro da CAPES – Brasil.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento, Acompanhamento da Safra Brasileira - Cana-de-Açúcar**, 2010. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/bc48c2601447e03580b9e6bf62877e2a.pdf>>. Último acesso: 03/01/2011.

Comunidade Européia, Diretiva nº 401 de 23 de fevereiro de 2006. Estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controle oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios, **Jornal Oficial das Comunidades Européias** L.70, p.12 a 34, 2006.

Downes, F. P.; Ito, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. American Public Health Association, Washington, D.C, 2001.

Filtborg, O.; Frisva, J.C.; Svendsen, J.A. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, p.581-585, 1983.

Gayton, M.; Grangeiro, A.; Fuentes, M.F.F.; Freitas, E.R.; Espíndola, G.B.; Souza, F.M. Inclusão da Levedura de Cana-de-Açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) em Dietas para Frangos de Corte, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.3, Viçosa, 2001.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

IARC, Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans: Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, v. 56. Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**. 571 p., 1993.

Klich, M.A.; Pitt, J.I. **A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* Species and their teleomorphs**. Division of Food Science and Technology, North Ryde, Austrália, 134 p., 1988.

Pitt, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 3 ed. New York, Springer. 540 p., 2009.

Stroka, J.; Anklam, E.; Jorissen, U.; Gilbert, J. Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography Using Post-Column Bromination for Determination of Aflatoxins in Peanuts Butter, Pistachio Paste, Fig Paste and Paprika Powder: Collaborative Study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, Baltimore, v.83, n.2, p.320-340, 2000.