



**INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CENTRO DE CIÊNCIA E QUALIDADE DE ALIMENTOS**

LAÍS TIEMI ONO

**MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz): AVALIAÇÃO DA MICOBIOTA E
DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS**

CAMPINAS

2020

LAÍS TIEMI ONO

**MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz): AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA E
DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia de Alimentos para obtenção do
título de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.*

Aluna: Laís Tiemi Ono

Orientadora: Profa. Dra. Marta Hiromi
Taniwaki

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna
Laís Tiemi Ono e orientada pela Profa. Dra. Marta Hiromi Taniwaki

CAMPINAS

2020

Agência(s): Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa do Agronegócio (FUNDEPAG)

Nº do proc.:

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Bibliotecária Lucilene Paulina da Silva CRB/8 - 8507
Biblioteca Central do ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos

O58m Ono, Laís Tiemi.

Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz): avaliação da micobiota e determinação de aflatoxinas. Laís Tiemi Ono / Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. - Campinas, SP: ITAL, 2020.

61 f.

Orientadora: Dra. Marta Hiromi Taniwaki.

1.Mandioca. 2. Micobiota. 3. Fungo. 4. Aflatoxinas. I. Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA). II. Ono, Laís Tiemi. III. Título.

Título em inglês: Cassava (*Manihot esculenta* Crantz): Evaluation of Mycobiota and Determination of Aflatoxins

Key-words: Cassava, mycobiota, fungi, aflatoxins

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora: Dra. Marta Hiromi Taniwaki (Orientadora), Dra. Beatriz Thie Iamanaka (membro titular), Dra. Elizabeth Nabeshima (membro titular), Dr. Marcelo Morgano (membro suplente).

Data da Defesa: 30/03/2020

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Laís Tiemi Ono aprovada pela Comissão Julgadora em 30/03/2020.

Profa. Dra. Marta Hiromi Taniwaki
ITAL/CCQA - (Presidente)

Dra. Beatriz Thie Iamanaka
ITAL/CCQA (titular)

Dra. Elizabeth Nabeshima
ITAL/Cereal Chocotec (titular)

Dr. Marcelo Morgano
CCQA/ITAL (suplente)

A ata de defesa de dissertação de mestrado com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se arquivada junto à documentação do aluno.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Pietro Nunes Monteiro (*In Memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo esforço e suporte ao longo da minha vida, sou grata todos os dias;

À minha orientadora, Dra. Marta Hiromi Taniwaki, que me presenteou com tantos ensinamentos, mas acima de tudo, me mostrou a beleza de amar seu trabalho e realizar tudo que se propõe com tanto amor;

Ao Dr. Sérgio Doná, pesquisador da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), pela colaboração na obtenção das amostras de mandioca e produtos derivados;

A todos do laboratório de Microbiologia do Itai, em especial, Lígia M. Martins, Josiane Bueno e Tamara Oliveira, por tanta paciência e pela amizade desde o início;

Ao André Mendes, pelo suporte e incentivo;

À secretária da pós-graduação, Elenice Ferreira, pela gentileza e eficiência;

Ao programa de pós-graduação do Itai;

À banca examinadora, pela cooperação;

A todos que de alguma maneira contribuíram para este trabalho;

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos principais estudar a micobiota da mandioca, produtos derivados da mandioca, bem como analisar o solo onde são plantadas as raízes; identificar fungos potencialmente produtores de aflatoxinas e testá-los quanto à produção; e quantificar as aflatoxinas presentes nas amostras. Um total de 101 amostras foram coletadas no interior do estado de São Paulo, sendo 27 raízes de mandioca, 23 farinhas de mandioca, 11 polvilhos doces, 9 polvilhos azedos, 9 gomas de mandioca e 22 amostras provenientes do solo. Foram isolados 493 fungos de 23 gêneros ou grupos de classificação diferentes. Nas análises referentes ao solo, prevaleceram os gêneros *Penicillium* spp. em 91% das amostras e *Cladosporium* spp. em 82%. Para as amostras de mandioca, os fungos predominantes foram *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. com frequência de ocorrência de 55% e 52% respectivamente. *Paecilomyces* spp. e *Penicillium* spp. foram os fungos com maior frequência de ocorrência nas farinhas de mandioca, com valor de 9%. O polvilho doce apresentou maior frequência de ocorrência para *Byssosclamyces* spp. e *Penicillium* spp. (36%). As amostras de polvilho azedo e goma de mandioca, apresentaram apenas o gênero *Paecilomyces*, com frequência de ocorrência de 33% e 22% respectivamente. 77 cepas do gênero *Aspergillus* foram isoladas, sendo 51 da seção *Flavi*. Das espécies identificadas, *A. flavus*, *A. aff. arachidicola*, *A. oryzae* e *A. aff. novoparasiticus* foram as mais frequentes. Todas as cepas de *A. section Flavi* foram testadas quanto à produção de aflatoxina, utilizando método de ágar plug, e a maioria (74%) se mostrou positiva quando à produção de aflatoxinas do grupo B e G ou só do grupo B. Na extração e quantificação de aflatoxinas foram analisadas as amostras de mandioca e derivados. Somente uma das amostras (farinha de mandioca) apresentou níveis detectáveis desta micotoxina, com valores de $AFB_1 = 0,06 \mu\text{g}/\text{kg}$ e $AFB_2 = 0,04 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Palavras-chave: Mandioca; fungo; micobiota; aflatoxinas.

ABSTRACT

This study's main objectives was to analyze the cassava mycobiota, its byproducts, such as flour and starch, as well as the soil where the roots were planted; to identify fungi potentially producing aflatoxins and test them for the production; and to quantify the aflatoxins present in the samples. A total of 101 samples were collected in the state of São Paulo, 27 from cassava roots, 52 from byproducts and 22 samples from soil. In total, 493 fungi from 23 genera or different classification groups were isolated. In the soil samples, predominated the genera *Penicillium* (91%) and *Cladosporium* (82%). For cassava samples, the predominant fungi were *Fusarium* spp. and *Trichoderma* spp. with a frequency of occurrence of 55% and 52% respectively. *Paecilomyces* spp. and *Penicillium* spp. were the fungi with highest frequency of occurrence in cassava flour, with value of 9%. 'Polvilho doce' showed a higher frequency of occurrence for *Byssochlamys* spp. and *Penicillium* spp. (36%). The samples of 'polvilho azedo' and 'goma de mandioca', presented only the genera *Paecilomyces*, with frequency of occurrence of 33% and 22% respectively. 77 strains of *Aspergillus* were isolated, 51 from the *Flavi* section. Of the identified species, *A. flavus*, *A. aff. arachidicola*, *A. oryzae* and *A. aff. novoparasiticus* were the most frequent. All *A.* section *Flavi* were tested for aflatoxin production, using the agar plug method, and the majority (74%) were positive for the production of group B and G or only group B. Cassava and byproducts samples were analyzed for aflatoxins. Only one of the samples (cassava flour) showed detectable levels of this mycotoxin, with values of AFB1 = 0.06 µg/kg and AFB2 = 0.04 µg/kg

Key words: Cassava; fungi; mycobiota; aflatoxins.

SUMÁRIO

Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Sumário.....	viii
1. Introdução geral	1
2. Objetivo	2
3. Revisão bibliográfica	2
3.1. Mandioca.....	2
3.1.1. Aspectos gerais.....	2
3.1.2. Produção	3
3.1.3. Podridão de raízes	5
3.1.4. Plantio e colheita	5
3.1.5. Armazenamento	6
3.1.6. Comercialização.....	6
3.2. Produtos derivados	7
3.2.1. Farinha de mandioca: Aspectos gerais	7
3.2.2. Fécula de mandioca: Aspectos gerais.....	8
3.2.3. Polvilho: Aspectos gerais	9
3.2.4. Farinha de mandioca: produção.....	10
3.2.5. Fécula de mandioca: produção	10
3.2.6. Polvilho: produção.....	11
3.2.7. Armazenamento	11
3.2.8. Comercialização.....	12
3.3. Fungos e micotoxinas	12
3.4. <i>Aspergillus</i>	13

3.5.	Aflatoxinas.....	13
3.6.	Legislação.....	14
3.7.	Ocorrência de fungos e micotoxinas em mandioca e produtos derivados	15
	Resumo	18
1.	Introdução	19
1.1.	Mandioca.....	19
1.2.	Produtos derivados da mandioca.....	20
2.	Objetivos	21
3.	Material e métodos.....	21
3.1.	Material	21
3.2.	Atividade de água	21
3.3.	Método de plaqueamento direto para raízes de mandioca	22
3.4.	Método de diluição em placas para produtos derivados da mandioca e solo	22
3.5.	Isolamento e identificação.....	22
3.6.	Chave de classificação	23
4.	Resultados	24
4.1.	Solo.....	24
4.2.	Mandioca (raiz)	26
4.3.	Produtos derivados da mandioca.....	27
4.3.1.	Farinha de mandioca.....	27
4.3.2.	Polvilho Doce	27
4.3.3.	Polvilho azedo	28
4.3.4.	Goma de mandioca	29
5.	Discussão.....	29
6.	Conclusão	32

7. Referências	33
Resumo	45
1. Introdução	46
2. Objetivo	47
3. Materias e Métodos.....	48
3.1. Incidência e identificação de <i>Aspergillus section Flavi</i>	48
3.2. Análise molecular	48
3.2.1. Extração de DNA genômico	48
3.2.2. PCR e sequenciamento	49
3.2.3. Identificação molecular.....	50
3.3. Teste de produção de aflatoxinas	50
3.4. Extração de aflatoxinas	51
3.5. Limites de Detecção e Quantificação.....	52
4. Resultados	52
4.1. Ocorrência de <i>Aspergillus section Flavi</i>	52
4.2. Potencial de produção de Aflatoxinas	53
4.3. Ocorrência de Aflatoxinas	54
5. Discussão.....	55
6. Conclusão	56
7. Referências	57
Conclusão Geral.....	61
Trabalhos Apresentados em Congresso	61

1. INTRODUÇÃO GERAL

Mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) é um dos alimentos mais cultivados e consumidos, principalmente nos países em desenvolvimento, como em grande parte do continente africano (KOUAKOU, et al., 2016). O consumo médio de mandioca e seus produtos por pessoa, segundo dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2020), no ano de 2017, foi de 13,81 kg/ano, os valores para o continente africano alcançam 59,45 kg/ano e para América do Sul, 27,87 kg/ano.

No ano de 2019, segundo dados do IBGE (2020) houve uma produção de mais de 20 milhões de toneladas de mandioca no Brasil, em uma área aproximada de 1 milhão e 500 mil hectares. De acordo com último levantamento, de 2017, o Brasil é o quarto maior produtor de mandioca no mundo, sendo a Nigéria o primeiro, seguido por Tailândia e Indonésia (FAO, 2020).

O modo como a mandioca pode ser preparada varia de acordo com o país em que este alimento é consumido, cada região possui particularidades, resultando em muitos produtos diferentes. Além de consumida *in natura*, segundo Falade e Akingbala (2010), esta raiz pode se converter em alimentos fermentados como por exemplo: cervejas, mingau, *beiju* (produzido por países orientais e usada para produção de bebidas) e *banu* (licor destilado, popular na Uganda); Também em alimentos não fermentados, tais como: tapioca, chips, pellets (pequenos cilindros secos extrusados), farinhas e *fufu* (pasta úmida, geralmente consumida com sopa).

Estima-se que cerca de 23% da produção seja perdida durante o armazenamento, por condições inadequadas e por ser uma raiz altamente perecível quando não há algum tipo de processamento, podendo ser facilmente contaminada por fungos (ALVES et al., 2005; WAREING et al., 2001).

Alguns fungos filamentosos são capazes de produzir metabólitos secundários chamados micotoxinas, e sua toxicidade pode causar doenças e morte em humanos e animais. A severidade de sua toxicidade depende do tipo de micotoxina, o tempo de exposição, idade e estado nutricional do indivíduo, e

ainda, de possíveis efeitos sinérgicos de outros componentes ingeridos (BENNETT; KLICH, 2003; PERAICA et al., 1999).

Apesar de altamente consumido no Brasil e no mundo, este alimento apresenta escassez de pesquisas neste âmbito, sendo de grande importância realizar estudos para avaliar os parâmetros de qualidade e segurança em relação aos fungos e micotoxinas.

2. OBJETIVO

Os objetivos deste trabalho foram:

- Determinar a atividade de água das amostras de mandioca e produtos derivados;
- Identificar a micobiota das amostras;
- Isolar e quantificar os fungos encontrados;
- Identificar as espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi*;
- Testar a produção de aflatoxinas dos isolados potencialmente produtores;
- Validar a metodologia para análise de aflatoxinas nas amostras de mandioca e seus produtos e verificar o nível de aflatoxinas nestas amostras.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. MANDIOCA

3.1.1. ASPECTOS GERAIS

A mandioca é uma raiz originária da América do Sul e já era cultivada antes da descoberta do Brasil. Os portugueses foram responsáveis por sua disseminação em outros continentes (OTSUBO; MERCANTE; MARTINS, 2002).

Cultivada em todo território nacional, bastante explorada por pequenos agricultores, a mandioca, pertence à família Euphorbiaceae, possui aproximadamente 100 espécies, porém apenas uma é comercialmente cultivada, a *Manihot esculenta* Crantz. É uma planta que possui raízes, caule ou haste e

folhas. As raízes podem ser fibrosas, que tem a função de absorver água e nutrientes para a planta ou tuberosas, capazes de armazenar carboidratos na forma de amido (ALVES, 2002; TOMICH et al., 2008). O caule possui formato cilíndrico e pode apresentar ou não ramificações, parte dele é utilizado como maniva-semente para o plantio de mandioca, utilizando-se geralmente, frações do terço médio da planta, de cerca de 20 cm, com 5 a 7 gemas (GUIMARÃES et al. 2017; JUNIOR; ALVES, 2014). As folhas desta planta são simples, formadas por lâmina e pecíolo, sua cor varia de verde à roxo (ALVES, 2002; TOMICH et al., 2008).

A cultura da mandioca é capaz de ser produzida em condições adversas, como solos inférteis, variações de temperatura, precipitação, acidez e altitude. Alguns estudos afirmam que existem diferenças na produtividade em melhores condições, como aplicação de calagem (aplicação de calcário) e/ou adubação, com utilização de fertilizantes (JUNIOR; ALVES, 2014). Além disso, uma mesma cultivar se adapta de maneira diferente dependendo do ecossistema em que foi inserida, e dificilmente se comporta de maneira semelhante em regiões diferentes (MATTOS; CARDOSO, 2003).

Existe no Brasil um grande número de cultivares, e dependendo da finalidade ou região a ser plantada, diferentes variedades podem ser utilizadas (ENCK et al., 2017). Em catálogo disponibilizado pelo Instituto Agrônômico (IAC, 2018), estão presentes as variedades Vassourinha, Branca de Santa Catarina, Guaxupé, Carapé, Verdinha (IAC 14-18), Ouro do Vale, Jaçanã, Jacira, Mantiqueira, IAC 352, IAC 12, Iracema, Preta, Taquari, Caipora, Mico, IAC 576-70, IAC 13, IAC 14 e IAC 15. Para as regiões Norte, Nordeste e Centro-Sul do Brasil, a EMBRAPA (2018c) recomenda a utilização das variedades: Poti Branca, 396, 399, Japonesa, Moura, Caipira, Tapioqueira, Aciolina, Saracura, Purus, Joana, Aimpim Manteiga, Ribeirinha, Colonial, Caipora, Mari, Poti, Formosa, Gema de ovo, Mulatinha, CS01 e Verdinha.

3.1.2. PRODUÇÃO

A produção de mandioca na África representa mais de 50% da produção mundial e dentre os países em destaque, a Nigéria ocupa a posição de maior

produtor do mundo (SEAB, 2015, 2017). Segundo mesmo autor, 70 a 80% da produção do continente é proveniente da agricultura familiar, representando grande importância sócio-econômica e ambiental. Neste continente, a mandioca é a principal fonte de alimentação para cerca de 60% da população, consumida geralmente 'in natura', sem processamento.

Dentre os continentes, a Ásia representa o segundo maior produtor mundial, seguido pela América do Sul, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Produção de mandioca no ano de 2017 nas principais regiões produtoras.

	Produção (milhões de toneladas)	Participação (%)
África	144,7	55,9
Ásia	85,7	33,1
América do Sul	26,2	10,1

Fonte: FAO, 2020

As regiões do Brasil, em 2019, que apresentaram maior área plantada de mandioca são Nordeste e Norte, somando cerca de 72% do total de hectares plantados no país, estando o Centro-oeste na última posição, com apenas 4,5%. Porém, as regiões que apresentam maior área plantada, possuem mais baixa produtividade, assim, a região Nordeste apresenta o pior rendimento do país, aproximadamente 10 mil kg/ha, enquanto a região Sul conta com mais de 22 mil kg/ha, sendo a região com mais alto rendimento. Centro-oeste e sudeste, apresentaram em 2019 rendimento de 18 mil kg/ha, na segunda e terceira colocação respectivamente (IBGE, 2020).

No Brasil, 83% da produção de mandioca é proveniente da agricultura familiar, que se produz em pequena escala, com reduzida área de lavoura. A mandioca que é destinada ao comércio local, não emprega tecnologia, pesquisa ou estudos, resultando numa produtividade mais baixa e mais heterogeneidade do produto. O maior nível de produtividade é alcançado, geralmente, em produções de larga escala, que visam a venda para grandes indústrias de fécula ou de farinha, havendo um investimento não apenas na mecanização, mas na correção de acidez, adubação, seleção de manivas, espaçamento adequado e controle de plantas daninhas (JUNIOR; ALVES, 2016; SEAB, 2017).

3.1.3. PODRIDÃO DE RAÍZES

A cultura da mandioca pode ser afetada por diversos problemas, como bacterioses, super-alongamento, super-brotamento, viroses ou ainda antracnose. Porém a doença da podridão radicular, ou podridão de raízes, é o que mais pode comprometer sua produção, acarretando em perdas econômicas relevantes (GOMES; LEAL, 2003). Quando as raízes são contaminadas, estas mudam sua coloração, se desintegram rapidamente e produzem um odor fétido. Na parte aérea da planta, ocorre o amarelamento e queda de folhas. Entretanto, estes sintomas podem variar em função dos agentes causadores (CARDOSO; POLTRONIERI; TRINDADE, 2000).

No Brasil, a podridão de raízes é causada principalmente por *Phytophthora* spp., *Phythium scleroteichum*, *Fusarium* spp., e menos frequentemente por *Diplodia* spp., *Syrialidium* spp. e *Botriodiplodia* spp. (GOMES; LEAL, 2003; CARDOSO; POLTRONIERI; TRINDADE, 2000; MUNIZ et al., 2006).

Para controlar esta doença, recomenda-se utilizar cultivares mais resistentes, tratamento químico nas manivas, seleção de ramas saudáveis, práticas de plantio que evitem acúmulo de água nas plantas, adubação, manejo físico e químico do solo e rotação de cultura (CARDOSO; POLTRONIERI; TRINDADE, 2000; GOMES; LEAL, 2003; SOUZA, 2016).

3.1.4. PLANTIO E COLHEITA

O início do plantio pode ocorrer em duas épocas, no início de período chuvoso, entre os meses de dezembro e janeiro, ou no início do período de estiagem, entre maio e junho (JUNIOR; ALVES, 2014). Normalmente, o plantio é feito no início da estação chuvosa, quando há umidade e calor, para melhor enraizamento. Como o Brasil possui grande extensão, este período pode variar de acordo com a região (MATTOS; CARDOSO, 2003; SILVA; SANTOS, 2018).

Convencionalmente, as ramas de mandioca são plantadas à profundidade de 10 cm, com espaçamento de 1 m x 1 m ou em fileiras duplas de 2 m x 1 m x 0,60 m (MATTOS; CARDOSO, 2003; FILHO; STROHHAECKER; FEY, 2003).

O período de colheita varia, por ser uma raiz que pode ser deixada no solo, sem ser colhida por um longo período, sendo considerada inclusive, um cultivo de segurança em casos de fome. Algumas variedades já podem ser colhidas após 6 a 8 meses do plantio, outras variam entre 12 a 19 meses, e as mais tardias podem chegar de 20 a 24 meses após o plantio (ALVES, 2006; MATTOS; CARDOSO, 2003; KOUAKOU et al., 2016).

3.1.5. ARMAZENAMENTO

Após a mandioca ser colhida, esta deve permanecer armazenada pelo menor tempo possível, pois em 2 a 3 dias já pode ocorrer o início do processo de apodrecimento. A mandioca é geralmente armazenada a céu aberto, de fácil acesso à roedores e insetos. Alguns cuidados podem prolongar e garantir a qualidade deste alimento por mais dias, como acondicionar em lugar fresco, à sombra, se possível coberto, com refrigeração, utilização de fungicidas e é importante o transporte rápido para o local em que será comercializada ou processada (FIALHO; VIEIRA, 2013; JUNIOR; ALVES, 2014; KOUAKOU et al., 2016).

3.1.6. COMERCIALIZAÇÃO

No Brasil, a maior parte das mandiocas colhidas é destinada às indústrias, para produção de farinhas, fécula e outros derivados. Existe uma demanda crescente por produtos processados, por possuir maior praticidade e tempo de conservação, como mandiocas já descascadas, embaladas à vácuo ou congeladas (JUNIOR; ALVES, 2014; FILHO; ALVES, 2004).

O consumo de mandioca *in natura* é menor, mas ocorre durante todo ano, geralmente são comercializadas em feiras livres e supermercados. Raízes uniformes e de tamanho comercial, sem danos mecânicos, facilitam sua venda (FIALHO; VIEIRA, 2013).

3.2. PRODUTOS DERIVADOS

3.2.1. FARINHA DE MANDIOCA: ASPECTOS GERAIS

A farinha de mandioca é o derivado mais popular no país, que já está presente no hábito alimentar dos brasileiros. Cerca de 80% da produção de mandioca no Brasil é destinada à produção de farinhas (DIAS; LEONEL, 2006; JUNIOR; ALVES, 2014).

Segundo a Instrução Normativa nº 52 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), é considerado farinha de mandioca o “produto obtido de raízes de mandioca, do gênero *Manihot*, submetidas a processo tecnológico adequado de fabricação e beneficiamento”.

A classificação das farinhas de mandioca é dividida basicamente em 3 grupos principais: farinha seca, farinha d’água e farinha bijusada. As farinhas do grupo seca são as mais consumidas no país, são obtidas após as raízes serem descascadas, trituradas, raladas, moídas, prensadas, peneiradas e secas à temperatura adequada (podendo ainda ser peneirada e beneficiada). A farinha bijusada possui baixa densidade, é leve, segue inicialmente o mesmo processamento da farinha seca, entretanto, após a prensagem, são desmembradas, peneiradas e laminadas à uma temperatura adequada, resultando em flocos bastante irregulares. Para produção da farinha d’água, as raízes devidamente limpas, sofrem processo de maceração (fermentação) geralmente por 4 dias, o qual provoca o amolecimento da mandioca. O processo fermentativo pode ocorrer em tanques (água parada) ou igarapés (água corrente). Após maceração, ocorre o descascamento, trituração, prensagem, peneiramento e secagem. (BRASIL, 2011; CHISTÉ; COHEN, 2011; EMBRAPA, 2003; SARMENTO, 2010).

Existem ainda subgrupos de acordo com a granulometria. As farinhas do tipo seca podem ser classificadas em: fina, onde o peneiramento é feito com malhas de 1 ou 2 mm e 100% do produto passa por ela, ficando retido até 10%; grossa, onde mais de 10% ficam retidos na peneira com malha de 2 mm; e média, no caso da farinha não se enquadrar em nenhum dos grupos de classificação anteriores. Já a farinha do grupo d’água pode ser separada nos subgrupos: fina,

quando em uma peneira de 2 mm menos de 10% do produto ficar retido; grossa, em que mais de 15% não passa através da peneira; ou média, quando fica retido na peneira de 10 a 15% do produto. Já a farinha do grupo bijusada é classificada em “tipo único”. Podem ainda ser classificadas quanto à coloração e outras características, como acidez (BRASIL, 2011; SARMENTO, 2010).

Ainda que estejam no mesmo grupo de classificação, existe uma grande heterogeneidade entre as farinhas, até numa mesma propriedade é difícil manter uniformidade, fazendo com que este produto seja desvalorizado (CHISTÉ et al., 2006; DIAS; LEONEL, 2006).

3.2.2. FÉCULA DE MANDIOCA: ASPECTOS GERAIS

A fécula é um produto insípido, inodoro, um pó branco e fino que absorve água intumescendo seus grânulos, e se geleifica na água quente. É constituído de amilose (18%) e amilopectina (82%), que são cadeias lineares e ramificadas, respectivamente (EMBRAPA, 2003; SILVA et al., 2012).

Define-se por fécula, segundo Instrução Normativa 23/2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, “o produto amiláceo extraído das raízes de mandioca, não fermentada, obtida por decantação, centrifugação ou processos tecnológicos adequados”.

A indústria da fécula de mandioca teve início na década de 1950, sendo as primeiras unidades em Santa Catarina. Contudo, somente a partir de 2000 este produto recebeu mais investidores. Obtida das raízes de mandioca, é um produto bastante nobre que possui utilidade em diversos segmentos além da indústria alimentícia, como plásticos, indústrias siderúrgicas, madeireira, papelaria, têxtil, cerâmica, adesivos, mineração, indústrias farmacêuticas, entre outros. O campo da biotecnologia para desenvolvimento de aplicações e modificações de amido oferecem produtos de maior valor agregado, sendo uma tendência a utilização deste derivado (EMBRAPA, 2003; FELIPE, 2019).

A fécula de mandioca pode ser classificada nos tipos 1, 2 ou 3, cujos parâmetros se encontram na Tabela 2 (BRASIL, 2005).

Tabela 2 – Parâmetros de classificação da fécula de mandioca.

Tipos	1	2	3
Fator ácido (mL)	4,00	4,50	5,00
Ph	4,50 a 6,50	4,50 a 6,50	4,00 a 7,00
Amido (%)	>84	>82	>80
Cinzas (%)	<0,20	<0,25	<0,75
Vazamento (%)	0,105	0,105	0,105
Abertura (mm)	99,00	98,00	97,00
Polpa (mL)	0,50	1,00	1,50

Fonte: BRASIL, 2005.

3.2.3. POLVILHO: ASPECTOS GERAIS

O polvilho é mais um derivado da mandioca que possui grande consumo, devido a sua utilização para produtos como biscoitos e o pão de queijo, que deixou de ser um produto regional, e tornou-se um produto nacional. O polvilho pode ser dividido em 2 principais tipos, o doce e o azedo, que diferem entre si em relação ao teor de acidez (MACHADO; ARAÚJO; PEREIRA, 2010).

A fécula de mandioca não fermentada é denominada polvilho doce, produto rico em carboidratos, solúvel em água, tendo acidez máxima de 1 mL de NaOH 1N/100g (PEREIRA et al., 2004; RESSUTTE et al., 2018).

O polvilho azedo é obtido a partir da fermentação do polvilho doce, o qual deve possuir acidez máxima de 5 mL de NaOH 1N/100g. O produto permanece em tanques (abertos ou fechados) e dependendo de fatores como temperatura e contaminação inicial com microrganismos fermentativos, pode permanecer de 3 a 60 dias. Tal processo torna o polvilho azedo mais solúvel, apresentando maior absorção de água, em relação ao polvilho doce (EMBRAPA, 2003; PEREIRA et al., 2004).

O polvilho azedo possui a propriedade de expansão sem utilização de agentes químicos ou biológicos, e além de conferir sabor característico, seu produto não possui glúten. Tais características resultantes da utilização de polvilho azedo, podem não ser atingidas quando usado polvilho doce (CARVALHO et al., 1996; CEREDA; BRITO, 1987).

3.2.4. FARINHA DE MANDIOCA: PRODUÇÃO

Na produção da farinha de mandioca, inicialmente a raiz é lavada e descascada, seguido pelo processo de ralação e prensagem. Existem etapas opcionais, como o peneiramento após o esfarelamento e/ou torração, que podem variar de acordo com o tipo de produto que se deseja obter (EMBRAPA, 2003, COHEN et al., 2007).

A torração é uma etapa crítica deste processo, no qual ocorre redução do teor de umidade, restringindo o desenvolvimento microbiano e evitando deterioração do produto. De acordo com a legislação brasileira, devem ser obtidos valores inferiores a 13% para garantir a qualidade e conservação do produto (DÓSEA et al., 2010; BRASIL, 2011).

3.2.5. FÉCULA DE MANDIOCA: PRODUÇÃO

Para produção de fécula de mandioca, inicia-se o processo com a lavagem e descascamento das raízes de mandioca seguido pela trituração e ralação, que neste caso é úmida, ou seja, com adição de água no ralador. Então, é feita a extração da fécula, ocorrendo a separação da água com fécula (leite de fécula) da massa fibrosa, seguida pela separação da água e da fécula, por decantação em tanques ou separadoras/concentradoras. Por fim, são realizadas a secagem e moagem, a fécula pode ainda ser peneirada e classificada antes do acondicionamento e estocagem.

A partir da reidratação da fécula de mandioca, é obtida a goma de mandioca, também conhecida como massa de tapioca ou goma de mandioca hidratada, cuja umidade varia entre 45%-55%, enquanto a umidade da fécula de mandioca é de 13%. A goma é caracterizada pela formação de géis ou pastas quando em contato com a água. O principal emprego deste produto é para o preparo de tapioca, alimento com crescente procura devido ao apelo mais saudável, natural e sem glúten (JÚNIOR; ALVES, 2019; LIMA et al., 2007).

3.2.6. POLVILHO: PRODUÇÃO

A produção de polvilho doce e azedo tem início da mesma maneira, as raízes de mandioca são recebidas, lavadas, descascadas e raladas, em seguida é feita a extração da fécula em tanques ou extratores. O polvilho doce segue para secagem, moagem (opcional) e armazenamento, enquanto o polvilho azedo, passa primeiramente pela etapa de fermentação em tanques, com uma camada de água de aproximadamente 20 cm. Apenas após o período de fermentação, o polvilho azedo segue para secagem e armazenamento (ELETROBRAS, 2014; EMBRAPA, 2003).

Antes de serem processadas, as raízes de mandioca não devem ficar armazenadas por longos períodos, devido à possível exposição à luz solar, temperaturas elevadas, danos mecânicos, etc. Um fluxo contínuo desde a colheita até o produto final deve ser planejado, de modo que a mandioca não permaneça muito tempo estocada, o período ideal é de 2 a 3 dias e seu excedente não processado deve ser levado a um local de armazenamento de matéria prima adequado (CHISTÉ; COHEN, 2006).

O acondicionamento é também uma etapa crítica, pois após a secagem, o produto apresenta temperatura elevada, podendo ocorrer uma condensação de vapor, ocasionando perda de qualidade e possível deterioração (EMBRAPA, 2003).

3.2.7. ARMAZENAMENTO

Um local adequado deve ser designado para armazenar os produtos prontos, após o processamento. Deve-se evitar o contato direto do alimento com solo e paredes, podendo ser utilizado um estrado de madeira. Também, é recomendado utilizar o sistema PEPS (primeiro que entra é o primeiro que sai) isto é, utilizar o produto que entrou na área de estoque primeiro. Durante o armazenamento, as condições devem garantir que não haja desenvolvimento de substâncias físicas, químicas ou biológicas que comprometam a saúde do consumidor (BRASIL, 2011; CHISTÉ; COHEN, 2006; JUNIOR; ALVES, 2014).

3.2.8. COMERCIALIZAÇÃO

As farinhas de mandioca e as féculas são usualmente embaladas à temperatura ambiente, para que não ocorra condensação e conseqüentemente, perda da crocância ou degradação do produto. Sua embalagem depende do tipo de comércio a que será destinada, para farinhas, sacos de 50 kg podem ser utilizados para venda a granel em feiras e mercados municipais. A fécula destinada ao processamento em outras indústrias, é vendida em sacos de papel kraft de 25 ou 50 kg. Para venda em supermercados, estes produtos são embalados em sacos plásticos, geralmente de 500 g ou 1 kg (EMBRAPA, 2003).

3.3. FUNGOS E MICOTOXINAS

Alimentos cultivados em contato direto com o solo estão suscetíveis a contaminação por fungos, já que no solo podem ser encontradas diversas comunidades fúngicas, as quais possuem papel importante em processos de biodegradação e manutenção dos ecossistemas, entretanto, fungos presentes no solo podem contaminar a superfície dos vegetais cultivados, e penetrar em seus tecidos (ADJOVI et al. 2015; PAUL, 2015).

O clima tropical e a umidade relativa elevada, fornecem condições para o desenvolvimento de diversas espécies de fungos, inclusive toxigênicos. Os derivados da mandioca em sua maioria, são obtidos de um modo artesanal, esta falta de infraestrutura durante o processamento e armazenamento também pode facilitar a contaminação pós colheita, e desenvolvimento de micotoxinas (BANKOLE; ADEBANJO, 2003; DÓSEA et al., 2010).

Micotoxinas são substâncias tóxicas, produzidas por fungos, que podem causar câncer, limitações no sistema imunológico, retardo no crescimento, doenças hepáticas e em alguns casos, podem levar à morte de humanos e animais (ADJOVI et al. 2015).

Os principais gêneros associados a produção de micotoxinas, de acordo com Taniwaki, Iamanaka e Silva (2014), são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*,

ainda que a presença destes fungos no alimento, não garanta a produção de toxina.

3.4. ASPERGILLUS

As espécies de *Aspergillus* são bastante versáteis, utilizam uma grande variedade de substratos orgânicos, se adaptam à diversas condições ambientais e estão presentes no ar, solo, água e em ambientes internos. Este gênero pode ser encontrado, praticamente em qualquer lugar, são poucos os alimentos e matérias primas em que este gênero não ocorra de maneira consistente (GOLDMAN; OSMANI, 2008; PAULUSSEN et al., 2016; PITT; HOCKING, 2009).

Seus conídios são rapidamente transportados pelo ar e são altamente tolerantes ao estresse. Apesar da grande diversidade de espécies, apenas algumas causam danos à humanos e animais. A aspergilose pulmonar é a infecção de maior ocorrência para este gênero. Causada majoritariamente pelo *Aspergillus fumigatus*, representa cerca de 90% das doenças causadas à humanos. As espécies *A. flavus* e *A. niger* também podem causar aspergilose, em menor proporção, bem como *A. nidulans* e *A. terreus*. Além disso, espécies pertencentes a *Aspergillus* section *Flavi*, *A.* section *Nigri* e *A.* section *Circumdati* podem produzir micotoxinas, prejudiciais à saúde de humanos e animais (AMORIM et al., 2004; PAULUSSEN et al., 2016).

3.5. AFLATOXINAS

As aflatoxinas correspondem ao grupo de micotoxinas que mais ocorrem em alimentos, é considerada do Grupo 1, por seu efeito carcinogênico em humanos, sendo amplamente discutida e estudada sua influência em desenvolver e/ou potencializar outras doenças (IARC, 1993; MAZIEIRO; BERSOT, 2010).

Atualmente, dezoito espécies do grupo *A.* section *Flavi* são reconhecidas como produtoras de aflatoxinas: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. pseudonomius*, *A. novoparasiticus*, *A. pseudotamarii*, *A. togoensis*, *A. pseudocaelatus*, *A. luteovirescens*, *A. minisclerotigenes*, *A. arachidicola*, *A. sergii*,

A. transmontanensis, *A. mottae*, *A. aflatoxiformans*, *A. austwickii*, *A. pipericola* e *A. cerealis* (FRISVAD et al., 2019). Porém as espécies que ocorrem com maior frequência na natureza, produtoras de aflatoxinas, são *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. As aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ são as mais comuns, e dentre elas, a AFB₁ é a mais potente (BANKOLE; ADEBANJO, 2003; MISHRA; DAS, 2003).

As aflatoxinas podem ser encontradas em frutas desidratadas e secas, milho e seus derivados, oleaginosas, como amendoim e derivados, castanha do Brasil, leite, produtos de cacau e especiarias, como pimentas, noz-moscada, gengibre e cúrcuma (MAZIEIRO, 2010; TANIWAKI; IAMANAKA; SILVA, 2014, PITT; HOCKING, 2009).

3.6. LEGISLAÇÃO

De maneira global, os limites estabelecidos para aflatoxinas em alimentos variam em média entre 0 e 50 µg/kg (ppb), porém, a maioria dos países estabelece como nível regulatório o valor máximo de 20 µg/kg. O Brasil segue o mesmo limite para alimentos em geral, ou seja, a soma de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ deve estar abaixo de 20 µg/kg (CHU, 1990; FREIRE, 2007; MISHRA; DAS, 2003).

A legislação vigente do Brasil foi desenvolvida com base nos resultados obtidos por metodologias que atendem aos critérios presentes no Codex Alimentarius, e aplica-se às empresas importadoras, produtoras, distribuidoras e comercializadoras dos grupos de alimentos listados na resolução. Os limites máximos para leites e fórmulas infantis são os menores, 0,5 e 1 µg/kg, os maiores limites são de 20 µg/kg, e estão neste grupo as especiarias, amendoim, o milho e castanha do Brasil com casca para consumo direto. Apesar de aplicada para diversas categorias de alimentos, ainda não foram estabelecidos limites máximos para mandioca e seus produtos derivados (BRASIL, 2011).

3.7. OCORRÊNCIA DE FUNGOS E MICOTOXINAS EM MANDIOCA E PRODUTOS DERIVADOS

A produção de aflatoxinas é induzida pela alta quantidade de carboidratos no meio, já que estes são responsáveis por fornecer os carbonos precursores da síntese desta toxina (ESSONO et al., 2009). De acordo com Cock (1985), os 92,5% da composição da mandioca são carboidratos, e apenas 3,2% são proteínas, portanto, é provável que as aflatoxinas tenham afinidade neste tipo de alimento.

Em Gana, foram analisadas 101 amostras de mandioca desidratada, chamada 'kokonte' e sua micobiota foi descrita por Wareing et al. (2001). Verificou-se que leveduras e *Cladosporium* spp. foram os mais frequentes nas amostras, mas outros fungos também foram isolados, como o *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., *Colletotrichum* spp., *Drechslera* spp., *Fusarium* spp., *Monilia* spp., *Nigrospora oryzae*, *Phoma sorghina*, *Geotrichum* spp., *Aureobasidium* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Penicillium* spp., *Paecilomyces variotii* e *Wallemia sebi*. Neste mesmo estudo, foram quantificadas micotoxinas (aflatoxinas, patulina, esterigmatocistina, ácidos penicílico e ciclopiazônico, neosolaniol e toxina T-2) em 27 das amostras, com maior ocorrência de esterigmatocistina, patulina e ácido ciclopiazônico. Em nenhuma das amostras que continham *A. flavus* foram encontradas aflatoxinas.

Foram analisados 4 tipos de amostras de produtos de mandioca: pellets, farinhas (industrial e local) e 'garri' (raiz de mandioca seca e moída). Os produtos foram coletados em 3 mercados principais de cada uma das 6 regiões escolhidas na Nigéria. Foram isolados *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Mucor* spp., *Neospora* spp., *Choanophora* spp., *Cladosporium* spp., *Rhizopus* spp., *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium oxysporium*, *Botrydiploia theobromae*, *Helminthosporium* spp. e *Trichoderma* spp. (AGHIMIEN; IKENEBOMEH, 2017). As amostras também foram testadas quanto à presença de aflatoxinas, obtendo maiores concentrações nas farinhas de mandioca local, com nível mais elevado alcançando 83,54 µg/kg.

Nas Filipinas, Bulatao-Jayme et al. (1982) em sua pesquisa relacionando a exposição de aflatoxinas com câncer no fígado, encontraram que a maior

concentração desta toxina dentre os alimentos testados, estava na mandioca e seus produtos. Um total de 142 amostras foram analisadas com 100% de amostras positivas para aflatoxinas, com média de 467,5 µg/kg.

Kaaya e Eboku (2010), ao analisarem 75 amostras de chips de mandioca na Uganda, encontraram 30% das amostras positivas para contaminação com aflatoxinas, com valores de 0 a 4,5 µg/kg e uma média de 0,51 µg/kg.

Em mercados da Tanzânia e República do Congo, Manjula et al. (2009) obtiveram 38 amostras de mandioca, as quais apresentaram resultados positivos para aflatoxinas. Eles quantificaram aflatoxinas B₁ para diferentes tipos de processamento e tempo de armazenamento. Para a mandioca não processada, os valores variaram de 0 a 1,58 µg/kg. Para as mandiocas armazenadas por 3 a 4 dias, até amostras armazenadas por 4 meses, os valores variaram de 0,86 a 33,8 µg/kg.

Na quantificação de micotoxinas em 4 amostras de farinha de mandioca, em Benin, Ediage et al. (2011), encontraram valores para aflatoxina B₁ variando entre abaixo do limite de quantificação de 0,8 µg/kg até 9 µg/kg e para aflatoxina B₂, entre abaixo do limite de quantificação de 3 µg/kg e 8 µg/kg.

CAPÍTULO 1

Micobiota da mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) e seus produtos derivados comercializados no Brasil

RESUMO

No presente estudo, foram analisados: a presença de fungos em amostras de mandioca, farinhas, féculas, polvilhos e gomas, além do solo. Foram coletadas 101 amostras no interior do estado de São Paulo, sendo 27 de raízes de mandioca, e 22 amostras dos respectivos solos, além de 52 amostras de derivados de mandioca, coletados das fábricas processadoras e do comércio. O método utilizado para as raízes de mandioca foi o do plaqueamento direto com desinfecção superficial; e diluição em placas para as amostras de farinhas e solos. Após a inoculação nos meios de cultura e nas temperaturas apropriadas, realizou-se a identificação através de chaves taxonômicas. Foram isolados 493 fungos de 23 gêneros ou grupos de classificação diferentes. Para as amostras de mandioca, os fungos predominantes foram *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. com frequência de ocorrência de 55% e 52% respectivamente. *Paecilomyces* spp. e *Penicillium* spp. apresentaram mesma frequência de ocorrência, estavam presentes em 9% das amostras de farinhas de mandioca. O polvilho doce apresentou maior frequência de ocorrência para *Byssosclamyces* spp. e *Penicillium* spp. (36%). As amostras de polvilho azedo e goma de mandioca, apresentaram apenas o gênero *Paecilomyces*, com frequência de ocorrência de 33% e 22% respectivamente. Nas amostras de solo, prevaleceram os gêneros *Penicillium* spp. (91%) e *Cladosporium* spp. (82%).

1. INTRODUÇÃO

1.1. MANDIOCA

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) pertence à família Euphorbiaceae e ao gênero *Manihot*. Esta planta pode alcançar de 1,3 a 5 m de altura, e produzir em média 3 a 10 raízes cilíndricas ou esféricas, de coloração branca ou amarela, variando de 15 a 100 cm de comprimento (ALVES, 2002; BEZERRA, 2002).

A cultura da mandioca não exige solos férteis e é capaz de se adaptar a diferentes níveis de acidez. Suportam variação da precipitação de 600 a 3.000 mm e desenvolvem-se melhor em climas mais quentes. Além disso, podem ser cultivadas em altitudes que variam desde o nível do mar até 2.300 metros. Esta colheita pode ser realizada durante grande parte do ano, podendo levar de 7 a 22 meses de semeadura (GABRIEL et al., 2014; AGEITEC, 2018).

De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (JUNIOR; ALVES, 2014), as mandiocas podem ser classificadas em duas principais categorias: mandioca-mansa, conhecida também como macaxeira ou aipim, que são as mais comumente consumidas 'in natura' e a mandioca-brava, que geralmente é utilizada para elaboração de produtos como farinhas, gomas e tucupi. A mandioca-brava é também classificada como perigosamente venenosa, pois seu potencial tóxico está acima de 100 mg HCN/kg e para serem categorizadas como inócuas, devem possuir menos que 50 mg HCN/kg (COHEN; OLIVEIRA; CHISTÉ, 2007).

É uma raiz rica em carboidratos, principalmente amido, podendo atingir 35% em sua composição. Possui teor reduzido de proteínas, variando de 2-3% (base seca), porém apresenta em sua composição alguns minerais, como cálcio e ferro, além de traços de vitamina A e vitamina C (BEZERRA, 2002).

A produtividade da mandioca pode ser parcialmente ou até totalmente comprometida em caso de desenvolvimento de microrganismos. Esta contaminação ocorre principalmente em condições de práticas inadequadas e uso de variedades susceptíveis (GOMES; LEAL, 2003). Este fato pode causar alto impacto econômico e provocar a queda progressiva da produtividade, já que alguns microrganismos são capazes de sobreviver no solo por longos períodos,

provocando danos nas colheitas seguintes (NOTARO, et al., 2013). A contaminação por microrganismos pode ocorrer desde a colheita, processamento, transporte, armazenamento, contato com solo, água e ar (NETO et al., 2004).

Na Colômbia, 120 amostras de mandioca foram analisados por Noon e Booth (1977), os quais observaram os gêneros fúngicos: *Aspergillus*, *Botryodiplodia*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Trichoderma*.

1.2. PRODUTOS DERIVADOS DA MANDIOCA

Além de consumida 'in natura', a mandioca pode ser transformada em diversos produtos, como pratos doces, salgados e bebidas típicas. De acordo com o Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE, 2009) os principais derivados obtidos da mandioca são farinhas, fécula, polvilho doce e polvilho azedo.

O consumo médio per capita de farinha de mandioca no Brasil, de acordo com dados do IBGE (2011), é de 2,56 kg ao ano, ultrapassando o consumo da própria mandioca 'in natura', que é de 2,20 kg ao ano, aproximadamente.

Mesquita, Araujo e Pereira (2017) encontraram os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* de maneira predominante em amostras de farinha de mandioca em Macapá. Resultado similar foi obtido por Gomes, Silva e Fernandes (2007), em Manaus, onde 40% e 38% do total das amostras de farinha de mandioca apresentou contaminação pelo gênero *Penicillium* e *Aspergillus*, respectivamente.

Dados referentes à microbiota da mandioca e produtos derivados, ainda são escassos no Brasil, apesar do grande consumo e popularidade destes alimentos. Este trabalho apresenta dados úteis para nortear a atual situação, para que soluções e alternativas sejam apresentadas, visando reduzir o problema de contaminação.

2. OBJETIVOS

Analisar a microbiota de raízes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), seus produtos derivados e seu solo, através do isolamento e identificação de gêneros e/ou espécies dos fungos filamentosos encontrados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Foram obtidas 101 amostras: Solo onde são plantadas as raízes (22), raízes de mandioca (27), farinha de mandioca (23), polvilho doce (11), polvilho azedo (9) e goma de mandioca (9). O total de raízes por amostra variou de acordo com a quantidade disponível encontrada no campo para coleta. As coletas foram realizadas no estado de São Paulo, na região denominada médio Paranapanema, nas cidades de Assis, Campos Novos Paulista, Cândido Mota, Palmital, Ribeirão do Sul e São Pedro do Turvo. Uma parte das amostras foi adquirida de supermercados da região de Campinas. O período o qual as coletas foram realizadas foi de Julho de 2018 a Abril de 2019.

As amostras foram transportadas ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital), em Campinas, e armazenadas em refrigeração (abaixo de 10 °C). Primeiramente foram analisadas as amostras de raízes de mandioca, devido à sua alta perecibilidade.

3.2. ATIVIDADE DE ÁGUA

A medida da atividade de água (a_w) das amostras foi realizada em triplicata, utilizando equipamento AquaLab – Decagon (Decagon, Pullman, Wa, USA) a 25 °C (± 1 °C).

3.3. MÉTODO DE PLAQUEAMENTO DIRETO PARA RAÍZES DE MANDIOCA

Inicialmente, foram feitos cortes nas mandiocas, de modo a obter 30 pedaços por amostra, garantindo que pelo menos um pedaço de cada raiz presente nesta amostra, fosse incluído. Cada fração obtida possuía dimensão aproximada de 1 cm³ para possibilitar o plaqueamento. Utilizou-se o método de PITT; HOCKING (2009), com desinfecção superficial utilizando hipoclorito de sódio 0,4%, durante 1 minuto.

Após a etapa de corte, os pedaços foram distribuídos em 3 placas de Petri, contendo o meio ágar Dicloran Rosa Bengala Clorafenicol (DRBC) e inoculados a 25 °C por 5 a 7 dias. Após o período de incubação, foi realizada a contagem e o resultado foi expresso em porcentagem de infecção fúngica (%).

3.4. MÉTODO DE DILUIÇÃO EM PLACAS PARA PRODUTOS DERIVADOS DA MANDIOCA E SOLO

Para o método de diluição e plaqueamento em superfície, foram pesados 25 gramas da amostra e adicionados 225 mL de água peptonada 0,1%. Após homogeneizar por 30 segundos em Stomacher, seguiram-se as diluições seriadas. Alíquotas de 0,1 mL foram adicionadas às placas de Petri contendo o meio Dicloran 18% Glicerol (DG18), até a diluição 10⁴. Os resultados obtidos foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC/g) de amostra (PITT; HOCKING, 2009).

3.5. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

As colônias foram isoladas, purificadas e inoculadas em três pontos equidistantes em meio ágar extrato de levedura Czapek (CYA), incubadas a 25 °C por 7 dias.

Meios de cultura seletivos foram utilizados para auxiliar na identificação após o isolamento, uma vez que um mesmo gênero fúngico pode apresentar várias espécies distintas.

Para o gênero *Aspergillus*, utilizou-se o meio ágar *Aspergillus Flavus* e *Parasiticus* (AFPA) com incubação a 25 °C por 7 dias. Neste meio de cultura, as colônias de *A. flavus* e *A. parasiticus*, apresentam o reverso laranja-amarelado, sendo um método eficiente, já que poucos outros fungos produzem coloração similar (PITT; HOCKING, 2009).

O gênero *Fusarium* foi agrupado através de suas características similares apresentadas nos meios ágar batata dextrose (PDA) e ágar Dicloran Clorafenicol Peptona (DCPA), utilizando placas de Petri com divisória, permitindo um meio de cultura diferente em cada metade. Nestes meios macro e micro conídios são formados, após incubação a 25 °C por 7 dias (PITT; HOCKING, 2009).

A classificação das espécies de *Penicillium* ocorreu com o auxílio dos meios de cultura ágar Extrato de Malte (MEA) e ágar Creatina e Sacarose (CREA). No CREA, a coloração roxa do meio sofre uma alteração devido a variação de pH, sendo amarelo para pH ácido e roxo pH alcalino, dependendo do metabolismo da espécie (PITT; HOCKING, 2009).

Por apresentar alta frequência de ocorrência, os bolores do gênero *Trichoderma* spp. foram agrupados. Inoculou-se nos meios de cultura PDA, MEA e DG18, de acordo com Samson et al. (2010).

3.6. CHAVE DE CLASSIFICAÇÃO

A denominação de algumas espécies foi possível utilizando as chaves de classificação apresentada por PITT; HOCKING (2009) e SAMSON et al. (2010). Os fungos isolados e purificados, foram identificados através de suas características morfológicas microscópicas e macroscópicas, como diâmetro das colônias, cor da colônia e de seu reverso, presença de exsudados e pigmentos, forma de suas estruturas e conídeos.

4. RESULTADOS

No total, foram isoladas 493 cepas de 23 gêneros ou grupos de fungos. Os isolados foram separados de acordo com o grupo de mandioca (raiz, farinhas, féculas, etc) ou os solos em que foram obtidos. Os resultados estão descritos nas Tabelas 1.1, 1.2, 1.3 e 1.4. A figura 1 apresenta as fotos de fungos comuns encontrados nas amostras.

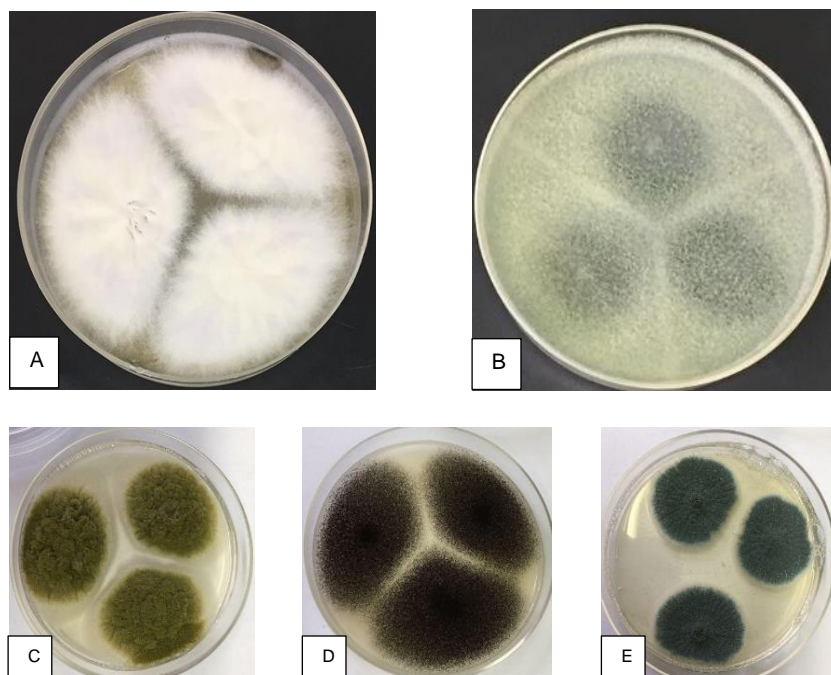


Figura 1. Fungos encontrados nas amostras de mandioca, seus derivados e solo. Colônias em meio de cultura CYA. A: *Fusarium* sp.; B: *Trichoderma* sp.; C: *Aspergillus* section *Flavi*; D: *Aspergillus* section *Nigri*; E: *Penicillium* sp.

4.1. SOLO

Nas amostras de solo coletadas, a média de a_w foi de 0,983, com mínima de 0,946 e máxima de 0,998. Todas as 22 amostras de solo apresentaram presença de fungos. A contagem média de fungos foi de $4,06 \times 10^4$ UFC/g, com variações entre $1,80 \times 10^4$ UFC/g a $1,20 \times 10^5$ UFC/g.

Foram isoladas 162 cepas, de 16 gêneros ou grupos de fungos. Sendo os mais comuns os gêneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Aspergillus*. O gênero *Penicillium* estava presente em mais de 90% das amostras, apresentando

a maior frequência de ocorrência das amostras de solo. A contagem média foi de $2,03 \times 10^4$ UFC/g, variando entre < 100 a $1,10 \times 10^5$ UFC/g. Algumas espécies puderam ser identificadas, e correspondem à *P. javanicum*, *P. sclerotiorum*, *P. brevicompactum*, *P. griseofulvum*, *P. raistrickii*, *P. citrinum*, *P. restrictum* e *P. brefeldianum*.

Tabela 1.1. Frequência de ocorrência (FO) e contagem dos gêneros ou grupos fúngicos (UFC/g), encontrados nos solos onde são plantadas raízes de mandioca.

Gênero ou grupo fúngico	FO (%)	Média da contagem (UFC/g)	Varição (UFC/g)
<i>Absidia spp.</i>	36,36	$1,68 \times 10^3$	$<100-1,40 \times 10^4$
Ascomycetos	4,55	$4,55 \times 10$	$<100-1,00 \times 10^3$
<i>Aspergillus spp.</i>	40,91	$1,95 \times 10^3$	$<100-1,60 \times 10^4$
<i>Cladosporium spp.</i>	81,82	$5,23 \times 10^3$	$<100-2,20 \times 10^4$
Fungos dematiáceos	9,09	$9,09 \times 10$	$<100-1,00 \times 10^3$
<i>Fusarium spp.</i>	54,55	$1,41 \times 10^3$	$<100-1,00 \times 10^4$
<i>Geotrichum spp.</i>	18,18	$7,27 \times 10^2$	$<100-6,00 \times 10^3$
Hifomicetos	18,18	$1,50 \times 10^3$	$<100-1,70 \times 10^4$
<i>Paecilomyces spp.</i>	4,55	$4,55 \times 10$	$<100-1,00 \times 10^3$
<i>Penicillium spp.</i>	90,91	$2,03 \times 10^4$	$<100-1,10 \times 10^5$
<i>Syncephalastrum spp.</i>	4,55	$4,55 \times 10$	$<100-1,00 \times 10^3$
<i>Talaromyces spp.</i>	4,55	$4,55 \times 10$	$<100-1,00 \times 10^3$
<i>Thielavia spp.</i>	4,55	$4,55 \times 10$	$<100-1,00 \times 10^3$
<i>Trichoderma spp.</i>	36,36	$2,64 \times 10^3$	$<100-2,20 \times 10^4$
Zigomicetos	31,82	$8,18 \times 10^2$	$<100-5,00 \times 10^3$

FO = Frequência de ocorrência (n^0 de amostras contaminadas/ n^0 total de amostras)

UFC/g = Unidades Formadoras de Colônias por grama

Média da contagem = Soma dos valores da contagem de colônias do gênero ou grupo fúngico nas amostras/ n^0 total de amostras analisadas

As espécies de *Cladosporium* foram encontradas em aproximadamente 82% das amostras, apresentando uma contagem média de $5,23 \times 10^3$ UFC/g, com variações entre <100 e $2,20 \times 10^4$ UFC/g.

4.2. MANDIOCA (RAIZ)

A média da atividade de água (a_w) das amostras de mandioca (raiz) foi 0,987, variando entre 0,922 a 0,996. Das 27 amostras analisadas, todas apresentaram infecção fúngica. A infecção total média foi de 86,79%, com 50% e 100% de infecção mínima e máxima, respectivamente. Foram isolados 287 fungos, de 19 gêneros ou grupos diferentes. O gênero predominante foi *Fusarium*, encontrado em mais de 55% das amostras, com infecção média de 0 a 36,67%.

Tabela 1.2. Frequência de ocorrência e média de infecção fúngica em raízes de mandioca (%).

Fungos	FO (%)	Média de infecção (%)	Varição (%)
<i>Absidia spp.</i>	14,81	1,11	0-16,67
Ascomicetos	3,70	0,12	0-3,33
<i>Aspergillus spp.</i>	22,22	2,84	0-33,33
<i>Chaetomium spp.</i>	14,81	2,22	0-33,33
Fungos dematiáceos	25,93	1,60	0-10,00
<i>Epicoccum spp.</i>	7,41	0,25	0-3,33
<i>Fusarium spp.</i>	55,56	7,04	0-36,67
<i>Geotrichum spp.</i>	29,63	7,28	0-63,33
Hifomicetos	11,11	2,96	0-36,67
Fungos leveduriformes	3,70	1,60	0-43,33
<i>Mucor spp.</i>	22,22	1,11	0-10,00
<i>Nigrospora spp.</i>	7,41	0,62	0-13,33
<i>Paecilomyces spp.</i>	7,41	0,25	0-3,33
<i>Penicillium spp.</i>	44,44	6,17	0-40,00
<i>Rhizopus spp.</i>	3,70	0,49	0-13,33
<i>Sordaria spp.</i>	3,70	0,12	0-3,33
<i>Syncephalastrum spp.</i>	3,70	0,37	0-10,00
<i>Thielavia spp.</i>	15,52	1,73	0-23,33
<i>Trichoderma spp.</i>	51,85	13,58	0-96,67

FO = Frequência de ocorrência (n° de amostras contaminadas/ n° total de amostras)

Média de infecção = Soma dos valores da % de infecção pelo gênero ou grupo fúngico nas amostras/ n° total de amostras analisadas

Em seguida, foi o gênero *Trichoderma* que esteve presente em aproximadamente 52% das amostras de raízes mandioca. Este gênero apresentou uma média de infecção de 14%, com uma máxima de 97% de

infecção. As espécies de *Penicillium* spp. foram encontradas em 44% das amostras, com média de infecção de 6%. As espécies com maior predominância foram *P. javanicum*, seguido por *P. citrinum* e *P. brefeldianum*.

4.3. PRODUTOS DERIVADOS DA MANDIOCA

4.3.1. FARINHA DE MANDIOCA

Nas amostras de farinhas de mandioca, a média de a_w foi de 0,390, com valores entre 0,082 a 0,677. A contagem média de fungos nestas amostras foi de $2,61 \times 10$ UFC/g, das 23 amostras, apenas 4 apresentaram contaminação fúngica.

Foram isoladas 6 cepas pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Paecilomyces* e *Penicillium*. A frequência de ocorrência de *Paecilomyces* spp. e *Penicillium* spp. foi de 8,70%, com contagens médias de 8,70 UFC/g e $1,30 \times 10$ UFC/g, respectivamente, como mostra a Tabela 1.3. Foi possível identificar algumas cepas à nível de espécie, como *Penicillium citrinum* e *Paecilomyces variotii*.

Tabela 1.3. Frequência de ocorrência (FO) e contagem dos gêneros de fungos (UFC/g) encontrados na farinha de mandioca.

Gênero	FO(%)	Média da contagem (UFC/g)	Varição (UFC/g)
<i>Penicillium</i> spp.	8,70	$1,30 \times 10$	$<100-2,00 \times 10^2$
<i>Paecilomyces</i> spp.	8,70	8,70	$<100-1,00 \times 10^2$
<i>Aspergillus</i> spp.	4,35	4,35	$<100-1,00 \times 10^2$

FO = Frequência de ocorrência (n° de amostras contaminadas/ n° total de amostras)

Média da contagem = Soma dos valores de contagem de colônias do gênero de fungos nas amostras/ n° total de amostras analisadas

4.3.2. POLVILHO DOCE

As amostras de polvilho doce apresentaram média de a_w de 0,461, com variação entre 0,317 e 0,598. Foi encontrado um valor médio de $7,18 \times 10^2$ UFC/g

na contagem fúngica, sendo que das 11 amostras analisadas, apenas 6 apresentaram presença fúngica.

Ao todo, 20 cepas foram isoladas, os gêneros *Byssochlamys* e *Penicillium* apresentaram maior frequência de ocorrência, ambos com contagem média de $2,27 \times 10^2$ UFC/g, como pode ser observado na Tabela 1.4. Uma das espécies de *Penicillium* identificadas corresponde à *P. javanicum*. Os gêneros com menor frequência de ocorrência para as amostras de polvilho doce foram *Aspergillus* (sendo uma das cepas identificadas como *A. fumigatus*), seguidos por *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Rhizopus* e o grupo de fungos dematiáceos.

Tabela 1.4. Frequência de ocorrência (FO) e contagem dos gêneros ou grupos fúngicos (UFC/g), encontrados no polvilho doce.

Fungos	FO(%)	Média da contagem (UFC/g)	Varição (UFC/g)
<i>Aspergillus</i> spp.	18,18	$5,45 \times 10$	$<100-4,00 \times 10^2$
Fungos dematiáceos	9,09	9,09	$<100-1,00 \times 10^2$
<i>Byssochlamys</i> spp.	36,36	$2,27 \times 10^2$	$<100-8,00 \times 10^2$
<i>Cladosporium</i> spp.	9,09	9,09	$<100-1,00 \times 10^2$
<i>Paecilomyces</i> spp.	9,09	9,09	$<100-1,00 \times 10^2$
<i>Penicillium</i> spp.	36,36	$2,27 \times 10^2$	$<100-1,30 \times 10^3$
<i>Rhizopus</i> spp.	9,09	9,09	$<100-1,00 \times 10^2$

FO = Frequência de ocorrência (n° de amostras contaminadas/ n° total de amostras)

Média da contagem = Soma dos valores da contagem de colônias do gênero ou grupo fúngico nas amostras/ n° total de amostras analisadas

4.3.3. POLVILHO AZEDO

A média de a_w para as amostras de polvilho azedo variou entre 0,451 e 0,595, com média de 0,515. Das 9 amostras analisadas, 3 apresentaram contaminação fúngica.

Foram isoladas 3 cepas do gênero *Paecilomyces*, a frequência de ocorrência encontrada foi de 33,33%, com contagem média de $3,33 \times 10$ UFC/g e variação entre <100 e $1,00 \times 10^2$ UFC/g. A espécie predominante foi identificada como *Paecilomyces variotii*.

4.3.4. GOMA DE MANDIOCA

Para as amostras de goma de mandioca, a média de a_w foi de 0,989, com variação entre 0,979 e 0,997. Das 9 amostras, apenas 2 apresentaram contaminação fúngica.

A frequência de ocorrência obtida foi de 22,22%, com contagem média de $4,58 \times 10^3$ UFC/g. Foram isoladas 4 cepas de um único gênero e espécie, *Paecilomyces variotii*. A contagem máxima encontrada foi de $4,10 \times 10^4$ UFC/g.

5. DISCUSSÃO

Analisando todas as amostras sem distinção de categorias, a frequência geral de ocorrência foi de, aproximadamente 67%. Tal fato indica que as amostras foram susceptíveis a infecção por fungos, que podem ocasionar problemas como deterioração dos alimentos, podridão de raízes ou produção de micotoxinas.

De acordo com Gomes e Leal (2003), a podridão de raízes é uma doença que afeta severamente e limita a produção da mandioca, podendo ocasionar uma redução média de 30% na produtividade. Os principais fungos causadores desta doença são *Phytophthora* spp., *Phythium sclerotieichum* e *Fusarium* spp. No nosso trabalho, o gênero *Fusarium* spp., foi o de maior incidência nas amostras de mandioca.

Sule e Oyeyiola (2012), estudaram os fungos dos solos de plantação de mandioca. Foram isolados *Aspergillus*, *Acremonium*, *Brettanomyces*, *Botrytis*, *Byssochamys*, *Cladosporium*, *Doratomyces*, *Geotrichum*, *Gliocladium*, *Humicola*, *Moniliella*, *Mucor*, *Monascus*, *Neuspora*, *Oidiodendron*, *Penicillium*, *Papulospora*, *Piricularia*, *Rhodotorula*, *Rhizopus*, *Saccharomyces*, *Trichoderma* e *Ustilago*. Alguns dos gêneros são semelhantes aos encontrados nos solos do presente estudo, entre eles: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Penicillium* e *Trichoderma*.

A alta frequência de ocorrência do gênero *Cladosporium* nas amostras de solo, coincide com informações de Bensch et al. (2012), os quais afirmam que este fungo é comumente encontrado em amostras de ar e solo.

Os fungos encontrados nas raízes de mandioca do presente trabalho, coincidem com alguns dos gêneros encontrados por Noon e Booth (1977) na Colômbia. Neste estudo, as 120 amostras de mandioca, com 11 dias após a colheita, os seguintes gêneros foram isolados: *Aspergillus*, *Botryodiplodia*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Trichoderma*.

Gnonlonfin et al. (2008) encontraram em amostras de chips de mandioca, em Benin, os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor* e *Rhizopus*. Anos mais tarde, nos mesmos produtos e locais, Gnonlonfin et al. (2012) encontraram *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Nigrospora* e *Rhizopus*. Para as amostras de produtos derivados da mandioca analisadas neste trabalho, coincidiram os gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* e *Rhizopus*.

Na Uganda, Kaaya e Eboku (2010) encontraram com maior incidência, os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor* e *Rhizopus* nas amostras de chips de mandioca. Resultado semelhante foi reportado por Jimoh e Kolapo (2008) na Nigéria, que encontraram os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Rhizopus*.

Mesquita, Araujo e Pereira (2017) encontraram os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* de maneira predominante em amostras de farinha de mandioca em Macapá. Resultado similar foi obtido por Gomes, Silva e Fernandes (2007), em Manaus, onde 40% e 38% do total das amostras de farinha de mandioca apresentou contaminação pelo gênero *Penicillium* e *Aspergillus*, respectivamente.

Lima et al. (2007), pesquisou a presença de microrganismos indicadores de qualidade em farinhas e gomas de mandioca, detectando fungos filamentosos e fungos leveduriformes (não especificados) em quantidade variando de $1,3 \times 10^3$ a $9,3 \times 10^5$ UFC/g.

Das amostras de produtos derivados de mandioca analisados no nosso trabalho, apenas a goma de mandioca apresentou um valor elevado, de $4,10 \times 10^4$ UFC/g. A Resolução que estabelece padrões microbiológicos para alimentos, RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, não estabelece limites para bolores e leveduras em tubérculos, como mandioca, ou produtos derivados. Entretanto, em portaria já revogada, Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997, do Ministério da Saúde, bolores e leveduras não deveriam ultrapassar 10^4 UFC/g para farinhas, féculas, amidos e fubá (BRASIL, 1997).

As espécies de *Penicillium* que ocorreram com alta frequência, são comuns como deterioradoras de alimentos e algumas espécies são potencialmente produtoras de micotoxinas, como patulina, citrinina, ocratoxina A entre outras (TANIWAKI; IAMANAKA; SILVA, 2014).

Os alimentos podem ser contaminados na pré-colheita devido a rotação de culturas, padrão de cultivo, irrigação, plantio e colheita. Os fungos estão presentes no solo, contaminando a superfície das raízes e penetrando nos tecidos. Um período de seca, bruscas variações de temperatura ou presença de insetos podem favorecer o aumento da contaminação (ADJOVI et al., 2015).

Um fator que pode influenciar diretamente o crescimento fúngico é a atividade de água. Nas amostras de mandioca e solo, com maior atividade de água, houve alto índice de contaminação, e grande número de isolados. Dentre os derivados da mandioca, a goma de mandioca apresentou a maior média de a_w e também a maior contagem de fungos. A farinha de mandioca apresentou menor média de a_w , bem como menor média de contagem fúngica. Alimentos com a_w menor que 0,60 são considerados microbiologicamente estáveis. A umidade relativa elevada e alta temperatura, típico de países tropicais, como o Brasil, podem favorecer o desenvolvimento de microrganismos (TANIWAKI; IAMANAKA; SILVA, 2014).

As amostras com atividade de água reduzida, apresentaram em sua predominância, fungos xerofílicos, isto é, capazes de crescer em atividade de água inferior a 0,85 como os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Paecilomyces* (PITT; HOCKING, 2009).

A investigação da micobiota de raízes de mandioca ainda é escassa, mesmo em países onde este alimento é consumido em grande escala. Estudos referentes à produtos derivados, como chips e farinhas são mais recorrentes, porém, observa-se que a maioria provém do continente africano. O Brasil possui poucos dados referentes a estes produtos, sendo importante maior exploração do tema, para que seja possível implantar medidas preventivas e corretivas no plantio e na cadeia de produção.

6. CONCLUSÃO

O conhecimento da micobiota da mandioca, bem como a de seus produtos derivados, é importante para conhecer quais fungos estão presentes nestes alimentos, inclusive os toxigênicos, e quais são os possíveis riscos à saúde humana e animal, a fim de buscar uma maneira de evitar o impacto negativo que eles podem causar.

No presente estudo, foi verificada a presença majoritária de *Fusarium* spp, *Trichoderma* spp., *Paecilomyces* spp., *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp. e *Aspergillus* spp. É essencial que seja feito um monitoramento do processo, desde a pré-colheita, para que os fungos não encontrem condições propícias para o desenvolvimento, garantindo a segurança destes alimentos.

Boas práticas aplicadas à cadeia produtiva, como colheita no tempo correto, armazenamento das raízes em boas condições, agilidade para início do processamento, temperatura na secagem/torração, transporte e embalagens adequados são pontos importantes para controle a fim de limitar o crescimento fúngico.

7. REFERÊNCIAS

- ADJOVI, Y. et al. Occurrence of mycotoxins in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its products. *International Journal of Food Safety, Nutrition and Public Health*, v. 5, p. 217-247, 2015.
- AGEITEC – AGÊNCIA EMBRAPA DE INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA. *Árvore do Conhecimento*> Mata Sul Pernambucana - Mandioca. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio_mata_sul_pernambucana/arvore/CONT000fbz80bbi02wx5eo0sawqe3ql7dt3b.html>. Acesso em: 24 abr, 2018.
- AGHIMIEN, M. O.; IKENEBOMEH, M. J. Community Structure of Aflatoxin Producing Fungi in Cassava Products from Nigerian Geo-political Zones. *NISEB Journal*, v. 17, n. 4, p. 164-172, 2017.
- ALVES, A. A. C. Cassava Botany and Physiology. *In: HILLOCKS, R. J.; THRESH, J. M.; BELLOTTI, A. Cassava: biology, production and utilization*, cap. 05, p. 67-89, 2002.
- ALVES, A. A. C. Fisiologia da Mandioca. *In: SOUZA, L. S. Aspectos Socioeconômicos e Agronômicos da Mandioca*, cap. 7, p. 139-162, 2006.
- ALVES, A. et al. Alterações na qualidade de raízes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) minimamente processadas. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, v. 29, n. 2, p. 330-337, 2005.
- AMORIM, D. S. et al. Infecções por *Aspergillus* spp: aspectos gerais. *Pulmão RJ*, v. 13, n. 2, p. 111-118, 2004.
- BANKOLE, S. A.; ADEBANJO, A. Mycotoxins in Food in West Africa: Current Situation and Possibilities of Controlling it. *African Journal of Biotechnology*, v. 2 (9), p. 254-263, 2003.

- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.
- BENSCH, K. et al. The Genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology*, v.72, p. 1-401, 2012.
- BEZERRA, V. S. Valor Nutricional da mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) e Transformações Pós Colheita. Embrapa Amapá, Macapá, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 23, de 15 de Dezembro de 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 52, de 07 de Novembro de 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 451, de 19 de Setembro de 1997.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº 7, de 18 de Fevereiro de 2011.
- BRITO, V. H.; CEREDA, M. Fermented Foods and Beverages from Cassava (*Manihot esculenta Crantz*) in South America. *In*: PENNA, A. L. B; NERO, L. A.; TODOROV, S. D. *Fermented Foods of Latin America: From Traditional Knowledge to Innovative Applications*, ed. 1, cap 10, p. 192-213, 2016.
- BULATAO-JAYME, J. et al. A case-control dietary study of primary liver cancer risk from aflatoxin exposure. *International Journal of Epidemiology*, v. 11, n.2, p.112-119, 1982.
- CARDOSO, E. M. R.; POLTRONIERI, L. S. TRINDADE, D. R. *Recomendações Para o Controle da Podridão Mole de Raízes de Mandioca no Estado do Pará*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2000.

- CARVALHO, E. P. et al. Polvilho Azedo: Aspectos Físicos, Químicos e Microbiológicos. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 31, n.2, p, 129-137, 1996.
- CEREDA, M. P.; BRITO, V. H. S. Fermented Foods and Beverages from Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in South America. In: CEREDA, M. P. Tecnologia e Qualidade do Polvilho Azedo. Informe Agropecuário, cap. 10, p. 192-213, 1987.
- CHISTÉ, R. C. et al. Estudo das propriedades físico-químicas e microbiológicas no processamento da farinha de mandioca do grupo d'água. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 27, n. 02, p. 265-269, 2007.
- CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O. Efeito do Processo de Fabricação de Farinha de Mandioca. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2006.
- CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O. Influência da fermentação na qualidade da farinha de mandioca do grupo d'água. Acta Amazonica, v. 41, n. 02, p. 279-284, 2011.
- CHU, F. S. Mycotoxins: Food Contamination, Mechanism, Carcinogenic Potential and Preventive Measures. Mutation Research, v. 259, p. 291-306, 1990.
- COHEN, K. O.; OLIVEIRA, S. S. CHISTÉ, R. C. Quantificação de Teores de Compostos Cianogênicos Totais em Produtos Elaborados com Raízes de Mandioca. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2007.
- COCK, J. H. Cassava: New potencial for a neglected crop. Westview Press, Boulder, Colorado, 1985.
- CUNHA, L. A. A. Prosa Rural – Produtos alternativos produzidos com fécula de mandioca.

DIAS, L. T.; LEONEL, M. Caracterização Físico-Química de Farinhas de Mandioca de Diferentes Localidades do Brasil. *Ciência e Tecnologia*, v. 30, n. 04, p. 692-700, Lavras, 2006.

DÓSEA, R. R. et al. Qualidade Microbiológica na obtenção de farinha e fécula de mandioca em unidades tradicionais e modelo. *Ciência Rural*, v.40, n.2, p.441-446, Santa Maria, 2010.

EDIAGE, E. N. et al. A validated multianalyte LC-MS/MS method for quantification of 25 mycotoxins in cassava flour, peanut cake and maize samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 5173-5180, 2011.

ELETROBRAS – Centrais Elétricas Brasileiras S.A. Processamento de Farinha e Fécula de Mandioca: Uso produtivo e eficiente da energia elétrica. Rio de Janeiro, 2014.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Iniciando um Pequeno Grande Negócio Agroindustrial: Processamento da Mandioca. Brasília, 2003.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Mandioca. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/mandioca>>. Acesso em: 23 abr, 2018a.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Principais variedades de mandioca recomendadas. Bahia, 2018c.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Produção: Mandioca em números. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/congresso-de-mandioca-2018/mandioca-em-numeros>>. Acesso em: 23 abr, 2018b.

- ENCK, B. F. et al. Cultivares de Mandioca Submetidos à Adubação Fosfatada na Amazônia Sul Ocidental. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, v. 14, n. 25, p. 365-371, 2017.
- ESSONO, G. et al., Aflatoxin-producing *Aspergillus* spp. and aflatoxin levels in stored cassava chips as affected by processing practices. *Food Control*, v. 20, p. 648-654, 2009.
- FALADE, K. O.; AKINGBALA, J. O. Utilization os Cassava for Food. *Food Reviews International*, v.27, n. 1, p. 51-83, 2010.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food Supply – Crops Primary Equivalent. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat>>. Acesso em: 03 fev, 2020.
- FELIPE, F. I. Produção e Consumo de Fécula da Mandioca no Brasil. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada – CEPEA USP, 2019. Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/>>. Acesso em fev. 2020.
- FIALHO, J. F.; VIEIRA, E. A. Mandioca no Cerrado: Orientações Técnicas. Embrapa Amazônia Ocidental; Embrapa Cerrados; Embrapa Meio-Norte, Brasília, 2013.
- FILHO, A. G.; STROHHAECKER, L.; FEY, E. Profundidade e espaçamento de mandioca no plantio direto na palha. *Ciência Rural*, v. 33, n. 3, p. 461-467, 2003.
- FILHO, W. P. C.; ALVES, H. S. Produção e Mercado de Mandioca: Análise de Preços ao Produtor. *Informações Econômicas*, v. 34, n. 09, p. 47-52, 2004.
- FREIRE, F. C. O. et al. Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 110, 2007.

- GABRIEL, L. F. et al. Mudança climática e seus efeitos na cultura da mandioca. Revista Brasileira De Engenharia Agrícola e Ambiental. Campina Grande, v.18, n.1, p. 90-98, 2014.
- GNONLONFIN, G. J. B. et al. Mycoflora and absence of aflatoxin contamination of commercialized cassava chips in Benin, West Africa. Food Control, v. 23, p. 333-337, 2012.
- GNONLONFIN, G. J. B. et al. Mycoflora and natural occurrence of aflatoxins and fumonisin B₁ in cassava and yam chips from Benin, West Africa. International Journal of Food Microbiology, v. 122, p. 140-147, 2008.
- GOLDMANG, G. H.; OSMANI, S. A. The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods, v. 26, 2008.
- GOMES, J. C.; LEAL, E. C. Cultivo da mandioca para a Região dos Tabuleiros Costeiros – Doenças. Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/>>. Acesso em 24 abr, 2018.
- GOMES, L. P; SILVA, L. J. G.; FERNANDES, G. S. T. Identificação dos principais gêneros fúngicos nas farinhas de mandioca comercializadas nos principais mercados de Manaus. Revista Igapo, p. 60-64, 2007.
- GUIMARÃES, D. G. et al. Caracterização morfológica de genótipos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Scientia Plena, v. 13, n. 09, 2017.
- IARC. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. International Agency for research on cancer, v. 56, p. 245-295, 1993.
- IAC – INSTITUTO AGRONÔMICO. Cultivares IAC. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/cultivares>>. Acesso em 10 fev, 2018.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 – Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil, Rio de Janeiro, 2011.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – Série Histórica da Estimativa Anual de Área Plantada, Área Colhida, Produção e Rendimento médio dos Produtos das Lavouras. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 02 de mar., 2020.

JIMOH, K. O.; KOLAPO, A. L. Mycoflora and aflatoxin production in market samples of some selected Nigerian foodstuffs. *Research Journal of Microbiology*, 3 (3): p. 169-174, 2008.

JUNIOR, M. S. M.; ALVES, R. N. B. *Cultura da Mandioca Apostila*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2014.

JUNIOR, M. S. M.; ALVES, R. N. B. *Cultura da Mandioca – Aspectos socioeconômicos, melhoramento genético, sistemas de cultivo, manejo de pragas e doenças e agroindústria*. Embrapa Amazônia Oriental, Brasília, 2016.

JUNIOR, M. S. M.; ALVES, R. N. B. *Mandioca, agregação de valor e rentabilidade de negócios*. Embrapa Amazônia Oriental, Brasília, 2019.

KAAYA, A. N.; EBOKU, D. Mould and aflatoxin contamination of dried cassava chips in eastern Uganda: Association with traditional processing and storage practices. *Journal of Biological Sciences*, 10 (8): p. 718-729, 2010.

KOUAKOU, J. et al. *Cassava production and processing*. Collection Pro-Agro, 2016.

- LIMA, C. P. S. et al. Presença de microrganismos indicadores de qualidade em farinha e goma de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz). Revista Atenção Primária à Saúde, v.10, n.1, p. 14-19, 2007.
- MACHADO, A. V.; ARAÚJO, F. M. M. C.; PEREIRA, J. Caracterização Física, Química e Tecnológica do Polvilho Azedo. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, v. 05, n. 03, p. 01-06, 2010.
- MANJULA, K. et al. Aflatoxin and fumosina contamination of cassava products and maize grain from markets in Tanzania and Republic of the Congo. Toxin Review, 28(2-3): 63-69, 2009.
- MATTOS, P. L. P.; CARDOSO, E. M. R. Cultivo da mandioca para o Estado do Pará. Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em 10 fev., 2020.
- MAZIEIRO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.12, n.1, p 89-99, 2010.
- MESQUITA, J. S.; ARAÚJO, S. K. P. R.; PEREIRA, F. C. S. Análise micológica de farinha de mandioca vendida nas feiras do produtor na cidade de Macapá-AP. Revista Ciência e Sociedade, n.2, p.103-112, 2017.
- MISHRA, H. N; DAS, C. A Review on Biological Control and Metabolism of Aflatoxin. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 3, p. 245-264, 2003.
- MUNIZ, M. F. S. et al. Caracterização de Isolados de *Phytophthora drechsleri*, agente causal da podridão mole de raízes de mandioca. Fitopatologia Brasileira, v. 31, n. 02, p. 195-198, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 10 fev, 2020.

- NETO, C. F. et al. Microbiologia de farinhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) durante o armazenamento. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 551-555, 2004.
- NOON, R. A.; BOOTH, R. H. Nature os post-harvest deterioration of cassava roots. *Transactions of the British Mycological Society*, v. 69 (2), p. 287-290, 1977.
- NOTARO, K. A. et al. Prospecção de fitopatógenos associados à podridão radicular da mandioca em Pernambuco, Brasil. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v.29, n.5, p. 1832-1839, 2013.
- OTSUBO, A. A.; MERCANTE, F. M.; MARTINS, C. S. Aspectos do Cultivo da Mandioca em Mato Grosso do Sul. EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, Dourado, 2002.
- PAUL, E. A. *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*. Ed. 4, Colorado, 2015.
- PAULUSSEN, C. et al. Ecology of aspergillosis: Insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microbial Biotechnology*, 2016.
- PERAICA, M. et al. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 77 (9), p. 754-766, 1999.
- PEREIRA, J. et al. Função dos ingredientes na consistência da massa e nas características do pão de queijo. *Food Science and Technology*, v. 24, n. 04, p. 494-500, 2004.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Fungi and food spoilage*. Springer Science Business Media: New York, 593, 2009.

- RESSUTTE, J. B. et al. Impacto da formulação de biscoitos sem glúten, do tipo “biju”, elaborados com polvilho doce, açúcares e edulcorante (sucralose) nos atributos de cor e análise sensorial. 6º Simpósio de Segurança Alimentar, Gramado, 2018.
- SAMSON, R. A. et al. Food and Indoor Fungi. Holanda: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2010.
- SARMENTO, S. B. S. Legislação Brasileira para Derivados da Mandioca. Revista Raízes e Amidos Tropicais, v. 6, p. 99-119, 2010.
- SEAB – SECRETARIA DO ESTADO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. Análise da conjuntura agropecuária, Mandioca – Safra 2015/16, 2015.
- SEAB – SECRETARIA DO ESTADO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. Prognóstico Mandioca 2017/18, 2017.
- SEBRAE – SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. Mandiocultura: Derivados da Mandioca. Salvador, 2009.
- SILVA, A. D. A.; SANTOS, E. O. Cultura da Mandioca. Instituto Agronômico de Pernambuco. Disponível em: <<http://www.ipa.br/>>. Acesso em: 10 fev, 2018.
- SILVA, P. A. et al. Obtenção e Caracterização das Féculas de Três Variedades de Mandioca Produzidas no Estado do Pará. COBEQ – Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2012.
- SOUZA, S. Cultivo de mandioca com uso de tecnologias permite aumento de produtividade acima de 150% no AM. Embrapa Amazônia Ocidental, 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 24 abr, 2018.

SULE, I. O.; OYEYIOLA, G. P. Fungal population in the root region of cassava cultivar TMS 30572. *World Journal of Agricultural Sciences*, v.8, p. 73-79, 2012.

TANIWAKI, M. H.; IAMANAKA, B. T.; SILVA, N. Fungos Deterioradores de Alimentos: Ocorrência e Detecção. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 2014.

TOMICH, R. G. P. et al. Etnovarietades de Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) Cultivada em Assentamentos Rurais de Corumbá, MS. Embrapa Pantanal, Corumbá, 2008.

WAREING, P. W. et al. Consumer preferences and fungal and mycotoxin contamination of dried cassava products from Ghana. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, p. 1-10, 2001.

CAPÍTULO 2

Ocorrência de fungos aflatoxigênicos e aflatoxinas em amostras de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e seus produtos derivados comercializados no Brasil

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a presença de fungos produtores de aflatoxinas nas amostras de mandioca, produtos derivados e solos, e quantificar o nível de aflatoxinas. Foram analisadas 101 amostras e 77 cepas do gênero *Aspergillus* foram isoladas, sendo 51 de *Aspergillus* section *Flavi*. Das espécies identificadas, *A. flavus*, *A. aff. arachidicola*, *A. oryzae* e *A. aff. novoparasiticus* foram as mais frequentes. Todas as cepas de *A. section Flavi* foram testadas quanto à produção de aflatoxinas, utilizando método de ágar plug, e a maioria (74%) se mostrou positiva quando à produção de aflatoxinas do grupo B e G ou do grupo B. Para extração, *clean up* e quantificação de aflatoxinas das amostras de mandioca e derivados, os extratos foram purificados em coluna de imunoafinidade e as toxinas detectadas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Somente uma amostra de farinha de mandioca apresentou níveis detectáveis de aflatoxinas, com valores de $AFB_1 = 0,06 \mu\text{g/kg}$ e $AFB_2 = 0,04 \mu\text{g/kg}$.

1. INTRODUÇÃO

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos, são compostos tóxicos e contaminantes comuns em diversos alimentos no mundo. São denominadas aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, com base em sua fluorescência sob luz ultravioleta, sendo B = *Blue* e G = *Green*, e de acordo com sua mobilidade quando em corrida cromatográfica em camada delgada (FREIRE et al., 2007).

As aflatoxinas são consideradas as micotoxinas mais tóxicas e perigosas, e são consideradas do grupo 1, segundo IARC (1993), ou seja, possuem efeito carcinogênico para humanos e animais (ADJOVI, 2014). De acordo com Chu (1991) houve uma incidência de 10% de hepatocarcinoma em ratos alimentados por 2 anos com sua dieta contendo 1 µg/kg de aflatoxina B₁.

Várias espécies de *Aspergillus* section *Flavi* produtoras de aflatoxinas já foram descritas, mas as mais estudadas são: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Até o momento, 18 espécies deste grupo são reconhecidas como produtoras de aflatoxinas: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. pseudonomius*, *A. novoparasiticus*, *A. pseudotamarii*, *A. togoensis*, *A. pseudocaelatus*, *A. luteovirescens*, *A. minisclerotigenes*, *A. arachidicola*, *A. sergii*, *A. transmontanensis*, *A. mottae*, *A. aflatoxiformans*, *A. austwickii*, *A. pipericola* e *A. cerealis* (FRISVAD et al., 2019).

Existem diversos substratos favoráveis ao crescimento de fungos aflatoxigênicos e à produção de toxina. Para o crescimento de *A. flavus*, em média, a atividade de água do alimento deve estar acima de 0,80, mas para o desenvolvimento de aflatoxinas, a atividade de água mais favorável é entre 0,95 e 0,99. Ainda, o teor de carboidratos disponível é considerado fator importante para a produção de aflatoxinas, glicose e frutose são ótimas fontes de crescimento do fungo (PEREIRA; CARVALHO; PRADO, 2002).

Dependendo do alimento, pode haver contaminação no campo, na pré-colheita, ou na pós-colheita, se armazenadas em condições propícias, como alta umidade e temperatura. Kaaya e Eboku (2010), encontraram aflatoxinas em chips de mandioca, na Uganda, com média de 0,51 µg/kg, e avaliaram que as condições de produção e armazenamento dos produtos estavam inadequadas.

Manjula et al. (2009) observaram que todas as amostras de mandioca analisadas, obtiveram resultados positivos para aflatoxinas. Eles quantificaram aflatoxinas B₁ para diferentes tipos de processamento e tempo de armazenamento. Para mandioca não processada, os valores variaram de 0 a 1,58 µg/kg. Para mandiocas armazenadas por 3 a 4 dias, até amostras armazenadas por 4 meses, os valores variaram de 0,86 a 33,8 µg/kg, observando que a produção desta toxina aumentou com o tempo de armazenamento.

Na Nigéria, Aghimien e Ikenebomeh (2017), constataram que 52% das amostras analisadas de produtos derivados da mandioca, como pellets, farinhas e 'gari' (raiz de mandioca seca e moída) não apresentaram contaminação por aflatoxinas. Por outro lado, 25% das amostras apresentaram níveis de aflatoxinas superiores a 20 µg/kg.

Em contrapartida, alguns autores isolaram fungos produtores de aflatoxinas em amostras de mandioca e produtos derivados, porém não observaram a presença desta micotoxina nestes alimentos (ADJOVI, 2014; GNONLONFIN et al. 2008; WAREING et al. 2001; MUZANILA; BRENNAN; KING, 2000).

Em 2019, a Comissão do Codex Alimentarius da Food Agriculture Organization of the United Nations (FAO) e World Health Organization (WHO), publicou recomendações a respeito de micotoxinas em mandioca e seus produtos. Foi avaliada a importância no âmbito econômico e de saúde pública, concluindo que apesar de improvável os efeitos agudos devido à ingestão de uma única fonte de mandioca, os efeitos a longo prazo podem impactar na saúde, ocasionando câncer hepático, cirrose hepática, imunossupressão, mutagênese e comprometimento do crescimento.

A legislação brasileira não especifica limites específicos para aflatoxinas em mandioca e produtos derivados, porém, considera-se nível máximo de 20 µg/kg para alimentos de maneira geral (FREIRE et al., 2007).

2. OBJETIVO

Avaliar a presença de fungos potencialmente produtores de aflatoxinas das espécies de *Aspergillus* section *Flavi*, em amostras de raízes de mandioca

(*Manihot esculenta* Crantz) e seus produtos derivados, além dos solos em que são cultivados. Analisar as amostras de mandioca e seus derivados quanto a presença de aflatoxinas e quantificar seu nível.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1. INCIDÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE *ASPERGILLUS SECTION FLAVI*

Foram analisados um total de 101 amostras de mandioca, seu solo e produtos derivados. Através do método descrito por Pitt e Hocking (2009), foi realizado o isolamento por plaqueamento direto para as raízes de mandioca e diluição em placas, para produtos derivados e solo. Foram obtidos 51 isolados, pertencentes ao grupo de *Aspergillus section Flavi*, os quais foram submetidos às etapas posteriores de identificação polifásica.

Para identificação morfológica, todas as cepas isoladas, suspeitas de pertencerem a *Aspergillus section Flavi* foram repicadas nos meios ágar extrato de levedura Czapek (CYA) e ágar *Aspergillus Flavus* e *Parasiticus* (AFPA). Os isolados foram identificados morfológicamente de acordo com as chaves de classificação de Pitt e Hocking (2009).

3.2. ANÁLISE MOLECULAR

3.2.1. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Um total de 51 isolados identificados morfológicamente como pertencentes a *A. section Flavi* foram inoculados em meio CYA para obtenção de colônias monospóricas. As cepas purificadas foram crescidas em meio líquido extrato de levedura sacarose (YES) a 25 °C por 3 dias até a formação de uma película micelial, que foi então macerada manualmente com o auxílio de nitrogênio líquido. O material macerado foi utilizado para obtenção do DNA genômico através do kit PureLink Plant (Invitrogen, USA) conforme protocolo recomendado pelo fabricante.

A quantificação do DNA foi inicialmente determinada por método espectrofotométrico, em NanoDrop® (Thermo Scientific), e posteriormente a quantidade de DNA foi confirmada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), através da comparação da fluorescência sob luz UV entre as bandas de DNA obtidas e uma amostra de DNA de concentração já conhecida. Após a quantificação, as amostras foram armazenadas a -20 °C, onde permaneceram até o momento do uso.

3.2.2. PCR E SEQUENCIAMENTO

Para identificação das cepas selecionadas foi realizada a amplificação de parte do gene que codifica a beta-tubulina (*BenA*). Uma PCR foi conduzida utilizando o par de primers bt2a (5'- GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3') e bt2b (5'- ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3') (GLASS e DONALDSON, 1995). A amplificação foi realizada sob os seguintes parâmetros: a reação foi composta em um volume final de 25 µL que continha: 2,5 µL de 10X tampão de PCR (Invitrogen Life Technologies, USA), 0,2 mmol L⁻¹ de dNTP (Invitrogen Life Technologies, USA), 0,4 µmol L⁻¹ de cada um dos respectivos primers (Invitrogen, Life Technologies, USA), 2,0 mmol L⁻¹ de MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies, USA), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Life Technologies, USA) e 20 ng de DNA genômico. Uma reação controle foi realizada a partir da substituição de DNA genômico por água ultrapura. As reações foram submetidas a um termociclador VERITI® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA), programado para um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por dois minutos, seguido de 35 ciclos compostos por 45 segundos de desnaturação a 94 °C, 45 segundos a 60 °C para o anelamento e 60 segundos a 72 °C para extensão, seguida de uma extensão final de cinco minutos a 72 °C, os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e fotografado sob luz UV. DNA Ladder 1 kb Plus® (Invitrogen Life Technologies, USA) foi utilizado como padrão de tamanho para os produtos da PCR.

Os produtos da amplificação foram purificados utilizando ExoProStar™ 1 Step (GE Healthcare Life Sciences, UK) conforme protocolo do fabricante. Os

fragmentos foram submetidos ao sequenciamento direto, utilizando o Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, USA) e submetidos ao aparelho SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

3.2.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

As seqüências obtidas foram submetidas ao alinhamento local através da ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) no banco de dados do NCBI utilizando a opção REfseq (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e no banco de dados curado *Aspergillus* MLST database (www.cbs.knaw.nl/aspergillus), a identificação levou em conta a maior percentagem de identidade de seqüência (acima de 99%) bem como a comparação com as *type strains* de *A. section Flavi* (Frisvad et al., 2019).

3.3. TESTE DE PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS

As espécies de fungos potencialmente produtoras de toxinas encontradas foram testadas quanto à produção de aflatoxinas de acordo com método de Filtenborg, Frisvad e Svendsen (1983). A técnica chamada ágar plug, associada à cromatografia de camada delgada, foi utilizada nas culturas puras.

Os fungos foram inoculados em meio Ágar extrato de levedura e sacarose (YESA) a 25 °C por 7 dias. Um pedaço do ágar foi cortado da parte central da colônia do fungo, utilizando material flambado (esterilizado), e uma gota do líquido de extração (Metanol: Clorofórmio) foi colocada diretamente na parte que foi retirada. Ainda úmido, o fragmento foi posicionado na placa de sílica gel pressionando levemente. Padrões para aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ foram adicionados na mesma placa para posterior comparação da fluorescência. Após a eluição, foi analisado em câmara com luz UV, nos comprimentos de onda de 366 e 254 nm.

3.4. EXTRAÇÃO DE AFLATOXINAS

O método utilizado para extração de aflatoxinas foi baseado em Stroka et al. (2000), com adaptações. No presente estudo este método foi otimizado para mandioca e seus derivados.

As amostras de mandioca foram inicialmente raladas e moídas, para obtenção de partículas mais homogêneas. No caso das farinhas, féculas, polvilhos e gomas, não necessitaram passar por esta etapa. Nos casos em que a análise não pôde ser realizada imediatamente, foi necessário armazenar em câmara fria, à temperatura de 4 °C.

Primeiramente, 25 g de cada amostra foram extraídos com 2,5 g de cloreto de sódio e 100 mL de solução metanol/água (80/20, v/v). A mistura foi agitada em misturador (New Brunswick Scientific Company, USA) por 30 minutos. Duas filtrações foram realizadas e 10 mL do líquido filtrado foram diluídos com 60 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS). A seguir, a mistura passou pela coluna de imunoafinidade para aflatoxinas, Easi-Extract Aflatoxin, (R-Biopharm, Alemanha), com uma vazão aproximada de 1 gota por segundo. A coluna foi lavada com 30 mL de água destilada. As aflatoxinas foram eluídas com 1,25 mL de metanol, seguido de 1,75 mL de água deionizada purificada pelo sistema Milli-Q, em um frasco de vidro âmbar.

Antes da injeção, foi necessário fazer uma filtração de 1 mL do material, utilizando um filtro de seringa com poro de 0,22 µm e diâmetro de 13 mm. Então, foi injetado 20 µL em equipamento Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) com detector de fluorescência (Agilent 1260 Infinity model system, CA, USA). A coluna cromatográfica C18 utilizada, conta com as dimensões de 4,6 mm x 150 mm e tamanho da partícula de 5 µm, com fase móvel contendo água: metanol: acetonitrila (62: 22: 16) acrescido de 119 mg de brometo de potássio e 350 µL de ácido nítrico 4M.

3.5. LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram obtidos através de 8 repetições utilizando amostras de mandioca e farinha de mandioca que não apresentaram contaminação natural. Foi calculada recuperação através da fortificação destas amostras no nível de 0,60 µg/kg de aflatoxinas totais (B₁, B₂, G₁ e G₂) utilizando-se um padrão. Para otimização do método, foram seguidas as recomendações descritas por Eurachem Guides (2014).

4. RESULTADOS

4.1. OCORRÊNCIA DE *ASPERGILLUS* SECTION *FLAVI*

Foram analisadas as amostras de raízes de mandioca, seu solo e derivados da mandioca, como farinha, fécula, polvilho e goma. Ao todo, foram isoladas 77 cepas de *Aspergillus* spp., observando-se espécies como *A. fumigatus*, *A. sydowii*, *A. terreus* e *A. wentii*. Quanto à infecção por *Aspergillus* section *Flavi*, foi encontrada em 18 amostras, com 51 isolados. As espécies não identificadas, foram denominadas de maneira genérica como *A. section Flavi*.

A maior frequência de ocorrência para amostras de solo foram obtidas por *A. section Flavi*, seguidas por *Aff. A. novoparasiticus*, presentes em 27,3% e 18,2% das amostras, respectivamente. As espécies com menor frequência de ocorrência foram *A. arachidicola* e *A. novoparasiticus* (4,55%), como pode ser observado na Tabela 2.1.

Para as amostras de raízes de mandioca, foi possível identificar as espécies *A. flavus*, *A. novoparasiticus* e *Aff. A. arachidicola* pela técnica molecular. As maiores frequências de ocorrência foram observadas para *A. section Flavi* e *A. flavus*, presentes em aproximadamente 11% das amostras analisadas. A média de infecção foi baixa, apresentando resultados em torno de 1% para todas as espécies, como consta na Tabela 2.2. Não foram isolados *Aspergillus* section *Flavi* nas amostras de derivados da mandioca.

Tabela 2.1. Frequência de ocorrência, média da contagem e valores mínimo e máximo de contagem de espécies de *Aspergillus* section *Flavi* em amostras de solo.

Espécie	FO (%)	Média da contagem (UFC/g)	Varição (UFC/g)
<i>A. arachidicola</i>	4,55	4,55	<100-1,00 x 10 ²
<i>A. novoparasiticus</i>	4,55	2,27 x 10	<100-5,00 x 10 ²
<i>A. oryzae</i>	13,64	1,36 x 10	<100-1,00 x 10 ²
Aff. <i>A. arachidicola</i>	13,64	2,27 x 10	<100-2,00 x 10 ²
Aff. <i>A. flavus</i>	9,09	9,09	<100-1,00 x 10 ²
Aff. <i>A. novoparasiticus</i>	18,18	4,09 x 10	<100-5,00 x 10 ²
<i>A. section Flavi</i>	27,27	3,18 x 10	<100-2,00 x 10 ²

FO = Frequência de ocorrência (nº de amostras contaminadas/nº total de amostras)

Média da contagem = Soma dos valores da contagem de colônias das espécies de *A. section Flavi* nas amostras/nº total de amostras analisadas

Tabela 2.2. Frequência de ocorrência, média de infecção e valores mínimo e máximo de infecção pelas espécies de *Aspergillus* section *Flavi* em amostras de mandioca (raiz).

Espécie	FO (%)	Média de infecção (%)	Varição (%)
<i>A. flavus</i>	11,11	1,36	0-16,67
<i>A. novoparasiticus</i>	3,70	0,12	0-3,33
Aff. <i>A. arachidicola</i>	3,70	0,25	0-6,67
<i>A. section Flavi</i>	11,11	0,74	0-10,00

FO = Frequência de ocorrência (nº de amostras contaminadas/nº total de amostras)

Média de infecção = Soma dos valores de % de infecção das amostras/nº total de amostras analisadas

4.2. POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS

Das 51 cepas de *A. section Flavi*, 38 cepas foram positivas quanto à produção de aflatoxinas e 13 negativas. As amostras de solo, apresentaram 20 isolados produtores de aflatoxinas e 11 não produtores, já para as amostras de mandioca (raiz), os valores encontrados foram 18 positivas e 2 negativas.

Para as amostras de solo, a frequência de ocorrência de cepas positivas para produção de aflatoxinas dos grupos B e G foi a mesma das cepas não produtoras de nenhum tipo desta micotoxina, como descrito na Tabela 2.3. As amostras de mandioca indicam que aproximadamente 15% das amostras foram

positivas para produção de aflatoxina do tipo B, 7,41% para B e G e apenas 3,70% apresentaram resultados negativos.

Tabela 2.3. Frequência de ocorrência de cepas produtoras de aflatoxinas dos grupos B e G e de cepas não produtoras de aflatoxinas

	FO (%) – Solo	FO (%) – Mandioca
B+G+	31,82	7,41
B+	4,55	14,81
AFLA-	31,82	3,70

FO = Frequência de ocorrência (nº de amostras com cepas produtoras ou não de aflatoxinas/nº total de amostras do mesmo segmento).

4.3. OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS

Os limites de detecção e quantificação podem ser observados na Tabela 2.4. Das 8 repetições realizadas para otimização do método, a média de recuperação das aflatoxinas totais foi de 110,8%, com média de recuperação para B₁ de 111,9%, B₂ de 112,5%, G₁ de 103,57 e G₂ de 115,0%.

Tabela 2.4. Limites de detecção e quantificação para aflatoxinas

	B ₁ (µg/kg)	B ₂ (µg/kg)	G ₁ (µg/kg)	G ₂ (µg/kg)	Total (µg/kg)
LOD	0,02	0,02	0,02	0,01	0,06
LOQ	0,07	0,06	0,06	0,02	0,21

LOD = Limite de Detecção

LOQ = Limite de Quantificação

As amostras provenientes do solo não foram analisadas para presença de aflatoxinas, apenas as amostras de raízes de mandioca e seus produtos derivados, totalizando 79 amostras.

As aflatoxinas foram encontradas em apenas uma amostra de farinha de mandioca, que apresentou uma quantidade baixa, próxima ao limite de detecção, com valores de AFB₁ de 0,06 µg/kg e AFB₂ de 0,04 µg/kg. As demais amostras não obtiveram níveis acima dos limites de detecção e quantificação.

Das amostras testadas, 18 (23%) continham em sua micobiota fungos produtores de aflatoxinas, porém, em nenhuma delas, houve detecção. Ao

contrário, na única amostra que apresentou quantidade detectável de aflatoxinas, não foi possível isolar nenhum fungo potencialmente produtor desta toxina.

5. DISCUSSÃO

A recuperação obtida tanto para aflatoxinas totais, quanto individualmente para aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ estão de acordo com os valores recomendados pela Comissão Europeia (2006), a qual determina que para concentração inferior a 1 µg/kg, os valores devem permanecer entre 50% e 120%.

Foram encontrados *Aspergillus section Flavi* nas amostras, porém, estes representaram apenas cerca de 10% dos 493 isolados, presentes em 101 amostras analisadas. As cepas obtidas de *Aspergillus section Flavi* apresentaram em sua maioria, resultados positivos para capacidade de produção de aflatoxinas.

Apenas uma amostra apresentou contaminação por aflatoxinas, todavia, com limites baixos, próximos ao limite de detecção. Tal fato, está de acordo com o resultado encontrado por Adjovi et al. (2014), o qual analisou 36 amostras de mandioca, encontrando *A. flavus*, *A. parvisclerotigenus* e *A. novoparasiticus*, com a maioria de suas cepas produtoras de toxinas, porém, não foi observada a presença de aflatoxinas. Neste mesmo estudo, os autores inocularam uma cepa altamente aflatoxigênica de *A. flavus* na mandioca, e apesar do fungo se desenvolver, as aflatoxinas não foram produzidas.

Em Benin, Gnonlonfin et al. (2008), estudaram chips de mandioca em 20 vilarejos, e apesar da presença de *A. flavus*, não foi detectada aflatoxina em nenhuma das amostras. Resultado semelhante também foi obtido por Wareing et al. (2001), que não observaram desenvolvimento de aflatoxinas em nenhuma das amostras analisadas de produtos secos derivados da mandioca, contendo *A. flavus*.

Muzanila, Brennan e King (2000), coletaram amostras de chips de mandioca, posteriormente transformadas em farinhas, em vilarejos na Tanzânia. Foram feitas análises para verificar a produção de aflatoxinas, mas nenhuma das amostras apresentou contaminação.

A diversidade da microbiota presente nas amostras de mandioca e seus produtos, pode sugerir competição entre os fungos presentes pelos nutrientes

disponíveis. Esta interação pode alterar o crescimento fúngico e reduzir o nível de produção de aflatoxinas (PEREIRA; CARVALHO; PRADO, 2002; GNONLONFIN et al., 2008).

A ausência de aflatoxinas nas amostras de mandioca e seus produtos derivados, pode estar relacionada à diversos outros fatores, como condições climáticas, tipo de substrato e processamento (GNONLONFIN et al., 2008).

Apesar de não ter sido encontrado o fungo produtor de aflatoxinas na amostra contaminada, sua ausência não implica em inexistência de toxinas, já que estas podem permanecer nos alimentos mesmo após a morte de seu fungo produtor (TANIWAKI; IAMANAKA; SILVA, 2014).

6. CONCLUSÃO

Foram encontrados fungos produtores de aflatoxinas nas amostras, ainda que em pequena quantidade. Apesar de isolados e identificados fungos produtores destas micotoxinas, apenas em uma amostra (farinha de mandioca) foi verificada a contaminação, apresentando valores bem próximos ao limite de detecção.

Entretanto, estudos recentes mostram o potencial da mandioca e produtos derivados de agirem como substrato para fungos aflatoxigênicos, sendo importante realizar controle e monitoramento de um maior número de amostras e regiões do Brasil, que é um país de grande dimensão e com características heterogêneas quanto ao clima, umidade, solo, etc.

7. REFERÊNCIAS

- ADJOVI, Y. C. S. et al. Analysis of the contrast between natural occurrence of toxigenic *Aspergilli* of the *Flavi* section and aflatoxin B1 in cassava. Food Microbiology, v. 38, p. 151-159, 2014.
- AGHIMIEN, M. O.; IKENEBOMEH, M. J. Community Structure of Aflatoxin Producing Fungi in Cassava Products from Nigerian Geo-political Zones. NISEB Journal, v. 17, n. 4, p. 164-172, 2017.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology., v.215, p. 403-410, 1990.
- CHU, F. S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and prevent measures. Mutation Research, v. 259, p. 291-306, 1991.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Discussion Paper on the Establishment of MLS for HCN in Cassava and Cassava-Based Products and Occurrence os Mycotoxins in These Products. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, Yogyakarta, Indonesia, 2019.
- Commission Regulation (EC) nº 401/2006. Official Journal, p. 12, 2006.
- EURACHEM GUIDES. The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. LGC, Teddington, ed. 2, 2014.
- FILTENBORG, O; FRISVAD, J. C.; SVENDSEN, J. A. Simple screening method for molds producing intracelular mycotoxins in pure cultures. Applied and Environmental Microbiology, v. 45, n. 2, p. 581-585, 1983.

- FREIRE, F. C. O. et al. Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 110, 2007.
- FRISVAD, J. C. et al. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Stud Mycol.*, v.93, p.1–63, 2019.
- GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Appl. Environm. Microbiol.*, 61: 1323-1330, 1995.
- GNONLONFIN, G. J. B. et al. Mycoflora and natural occurrence of aflatoxins and fumonisin B₁ in cassava and yam chips from Benin, West Africa. *International Journal of Food Microbiology*, v. 122, p. 140-147, 2008.
- KAAYA, A. N.; EBOKU, D. Mould and aflatoxin contamination of dried cassava chips in eastern Uganda: Association with traditional processing and storage practices. *Journal of Biological Sciences*, 10 (8): p. 718-729, 2010.
- MANJULA, K. et al. Aflatoxin and fumonisin contamination of cassava products and maize grain from markets in Tanzania and Republic of the Congo. *Toxin Review*, 28(2-3): 63-69, 2009.
- MOSS, M. O. Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 50, p. 137-142, 2002.
- MUZANILA, Y. C.; BRENNAN, J. G.; KING, R. D. Residual cyanogens, chemical composition and aflatoxins in cassava flour from Tanzanian villages. *Food Chemistry*, v. 70, p. 45-49, 2000.

- PEREIRA, M. M.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G. Crescimento e Produção de Aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v. 20, n. 1, p. 141-156, 2002.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and food spoilage. Springer Science Business Media: New York, 593, 2009.
- STROKA, J. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study. Food Chemical Contaminants, v. 83, n. 2, p. 320-340, 2000.
- TANIWAKI, M. H.; IAMANAKA, B. T.; SILVA, N. Fungos Deterioradores de Alimentos: Ocorrência e Detecção. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 2014.
- WAREING, P. W. et al. Consumer preferences and fungal and mycotoxin contamination of dried cassava products from Ghana. International Journal of Food Science and Technology, 36, p. 1-10, 2001.

CAPÍTULO 3
Conclusões Gerais

CONCLUSÃO GERAL

Foi possível verificar a presença de fungos de diversos gêneros e espécies, tanto na mandioca, como em seus produtos derivados e no solo. Tais fungos podem oferecer riscos à saúde humana, além de causar prejuízos econômicos. Houve maior incidência de *Fusarium* spp., *Paecilomyces* spp. e *Penicillium* spp. Para evitar tais impactos negativos, é importante realizar um monitoramento do processo desde a pré-colheira, para que não haja condições propícias para desenvolvimento de bolores. Fungos com potencial para produção de aflatoxinas foram isolados e testados, observando que a maioria das cepas demonstrou resultado positivo para produção destas toxinas. Apesar da incidência de *Aspergillus* section *Flavi* nas amostras, foi verificada a produção de aflatoxinas em apenas uma delas (farinha de mandioca) com níveis baixos, próximos ao limite de detecção deste método. Tal fato pode estar relacionado a fatores como condições climáticas, tipo de substrato ou processamento.

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSO

Trabalho intitulado: “Fungi and Toxins in Cassava: From the Field to Consumer” apresentado em 2019 – Conference of the International Commission on Food Mycology, Freising, Alemanha. No período de 03 a 05 de junho.