

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

SILMARA MIRANDA MUNDIM

FUNGOS E MICOTOXINAS EM FARINHA DE MANDIOCA DA
REGIÃO AMAZÔNICA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos, área de concentração Qualidade de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ariane Pacheco Kluczkovski

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Ormezinda Cristina C. Fernandes

MANAUS
2014

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M965f Mundim, Silmara Miranda
 Fungos toxigênicos e micotoxinas em farinha de mandioca da
 Região Amazônica / Silmara Miranda Mundim. 2014
 76 f.: il. color; 28 cm.

 Orientadora: Ariane Pacheco Kluckzkovisk
 Coorientadora: Ormezinda Cristina Cristo Fernandes
 Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade
 Federal do Amazonas.

 1. Aspergillus Flavus. 2. Aflatoxina. 3. MALDI-TOF. 4. Penicillium
 citrinum. I. Kluckzkovisk, Ariane Pacheco II. Universidade Federal
 do Amazonas III. Título

SILMARA MIRANDA MUNDIM

FUNGOS E MICOTOXINAS EM FARINHA DE MANDIOCA DA
REGIÃO AMAZÔNICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos, área de concentração Qualidade de Alimentos.

Aprovado em 27 de junho de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Ormezinda Celeste Cristo Fernandes, Presidente
Instituto Leonidas e Maria Deane - Fundação Osvaldo Cruz

Prof^a Dr^a Ana Cyra dos Santos Lucas, Membro
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a Dr^a Helyde Albuquerque Marinho, Membro
Instituto Nacional de Pesquisa no Amazonas

Prof^a Dr^a Maristela Martins, Membro
Universidade Federal do Amazonas

Ao meu Senhor Jesus Cristo pela vida em abundância e por ser minha a fortaleza. À minha mãe Marlene Gomes de Miranda pelo amor incondicional, pelo exemplo de mulher e pesquisadora. À minha avó Áurea Gomes de Miranda pelo amor dedicado, saudades eternas. Ao meu filho amado Bruno Miranda Mundim Alves, por me ensinar sobre o amor diariamente. Às minhas irmãs guerreiras Ana Paula Miranda M. Pombo e Fabiana Miranda Lafontaine.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor e salvador, Jesus Cristo, por me ensinar o verdadeiro sentido da vida e por me sustentar até aqui, por ele e para ele são todas as coisas.

A minha mãe Marlene Gomes de Miranda pelo amor e por me ensinar a nunca desistir e sempre seguir em frente, por ser a minha referência de professora e pesquisadora.

Ao meu filho amado, Bruno Miranda Mundim Alves, por mudar as minhas convicções, me ensinar tanto no decorrer da caminhada, a você todo o meu amor.

A minhas irmãs Ana Paula Miranda M. Pombo pelo exemplo de professora e pesquisadora por ser uma irmã presente em todos os momentos importantes de minha vida; e a minha irmã Fabiana Lafontaine por ser um exemplo de mulher persistente por ser uma grande companheira nos momentos difíceis. Às minhas irmãs minha eterna gratidão.

Ao meu pai Altamir Vieira Mundim pelo apoio.

À minha orientadora Dr^a Ariane Kluczkovski pela confiança em mim depositada.

À minha co-orientadora Dr^a Ormezinda Fernandes e a Josy Caldas Rodrigues por toda a sua dedicação, colaboração, apoio e pelo incentivo durante o desenvolvimento dessa pesquisa, serei sempre grata.

Aos pesquisadores Vitor Hugo Brito e Victor Souza por colaborarem de forma imprescindível com o desenvolvimento dos experimentos de laboratório.

Ao meu querido amigo Carlos Ramon do Nascimento Brito por me ensinar dia a dia, por revisar todo o artigo e por estar sempre pronto a atender todas as minhas solicitações.

Aos amigos e colegas Eliana Thiago, Danille Albuquerque, Geina Farias, Bruno Rizzute, Marcio Coutto e Esmeraldino Neto pela amizade, apoio e incentivo.

Aos colegas de turma pela amizade, companheirismo e incentivo.

Aos professores do programa por contribuírem para ampliação do conhecimento.

Aos professores Dr. Cledir Santos, Dr. Nelson Lima e Dr. Reginaldo Gonçalves Lima Neto e Dr^a Marney Cereda pela significativa contribuição na pesquisa.

Ao Instituto de Saúde e Biotecnologia pela liberação do afastamento para realização da pós graduação.

A Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade concedida.

A Fundação de pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM pela bolsa de estudo concedida.

A Universidade Católica Dom Bosco de Mato Grosso do Sul por conceder o laboratório e reagentes para análises algumas realizadas.

Ao Instituto Leonidas e Maria Deane- FIOCRUZ/AM pela realização da maioria dos experimentos realizados durante o período de pesquisa.

Ao Centro e Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) pelo apoio às análises de micotoxinas realizadas.

“ Posso todas as coisas em Cristo Jesus
que me fortalece” (Filipense 4:13)

RESUMO

Fungos filamentosos são organismos com a capacidade de produzir diversos metabólitos secundários, dentre eles, as micotoxinas, caracterizadas pelas propriedades tóxicas que apresentam ao organismo humano e animal. São produzidas em sua maioria por espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, relevantes pelo envolvimento com contaminação de alimentos e produção de micotoxinas. O estudo objetivou identificar a micobiota e ocorrência de micotoxinas em amostras de farinha de mandioca produzidas em Coari na região Amazônica, Brasil. Foram coletadas 30 amostras de farinha de mandioca no mercado local e avaliadas quanto à umidade e atividade de água (a_w), fungos (isolamento, purificação e identificação pela taxonomia tradicional) e micotoxinas. A confirmação das espécies fúngicas toxigênicas foi feita pela biologia molecular, foi realizada microscopia eletrônica de varredura em três espécies toxigênicas e micotoxinas foram identificadas por MALDI-TOF. Os resultados de umidade e (a_w) variaram de 7,08 a 13,55% e 0,37 a 0,69 respectivamente. Entre as amostras analisadas, 30% apresentaram fungos e destes 18,5% foram toxigênicos. As espécies identificadas com maior frequência foram *Aspergillus flavus*, *Penicillium waksmanii* e *Penicillium citrinum*. Entre os fungos toxigênicos foram encontrados *Penicillium citrinum*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus amoenus*. MALDI-TOF demonstrou presença de aflatoxina B1, citrinana e patulina com maior frequência. Conclui-se que é necessário maior orientação para os produtores da farinha de mandioca, um dos alimentos mais consumido na região Norte do país, pois fungos toxigênicos e micotoxinas foram encontrados nas amostras analisadas.

Keywords: *Aspergillus flavus*. *Penicillium citrinum*. MALDI-TOF. Aflatoxina.

ABSTRACT

Filamentous fungi are organisms with the ability to produce various secondary metabolites, among them, mycotoxins, characterized by the toxic properties that have the human and animal organism. Are produced mostly by species of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*, by engaging with relevant food contamination and mycotoxin production. The study aimed to identify the mycoflora and mycotoxins in samples of cassava produced in TNL in the Amazon region, Brazil flour. 30 samples of cassava flour in the local market and evaluated for moisture and water activity (a_w), fungi (isolation, purification and identification by traditional taxonomy) and mycotoxins were collected. Confirmation of toxigenic fungal species was made by molecular biology, scanning electron microscopy was performed in three toxigenic species and mycotoxins were identified by MALDI-TOF. The results of moisture and (a_w) ranging from 7.08 to 13.55% and 0.37 to 0.69 respectively. Among the samples analyzed, 30% had fungi and of these 18.5% were toxigenic. The species most frequently identified were *Aspergillus flavus*, *Penicillium waksmanii* and *Penicillium citrinum*. Among the toxigenic fungi *Penicillium citrinum*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus amoenus* were found. MALDI-TOF showed the presence of aflatoxin B1, patulin and citrinana more frequently. We conclude that greater attention to cassava flour, one of the most consumed foods in the north of the country is needed as toxigenic fungi and mycotoxins were found in the samples analyzed.

Keywords: *Aspergillus flavus*. *Penicillium citrinum*. MALDI-TOF. Aflatoxin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fotografia de constituintes da planta de mandioca: parte aérea, caule e raíz.....	16
Figura 2: Mapa da área de concentração da produção de Mandioca no Estado do Amazonas.....	20
Figura 3: Fluxograma das etapas de processamento da farinha de mandioca do tipo d'água.....	24
Figura 4: Fotos das etapas do processamento da farinha de mandioca do tipo d'água.....	25
Figura 5: Fotos das etapas do processamento da farinha de mandioca do tipo d'água.....	25
Figura 6: Fotos das etapas do processamento da farinha de mandioca do tipo d'água.....	26
Figura 7: Fotos das etapas do processamento da farinha de mandioca do tipo d'água.....	26
Figura 8: Fotos das estruturas morfológicas evidenciadas pela Microscopia Eletrônica de Varredura.....	46
Figura 9: Espectros de massa gerados pelo MALDI TOF.....	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Produção anual de mandioca nos principais países produtores em diferentes continentes no período de 2006 a 2010.....	18
Quadro 2: Produção de mandioca segundo região geográfica do Brasil.....	19
Quadro 3: Dados sobre a produção de mandioca nos dez maiores produtores de mandioca no Amazonas em 2010.	20
Quadro 4: Composição nutricional da mandioca dos mansa e brava.....	21
Quadro 5: Classificação de farinha de mandioca do Grupo Seca.....	28
Quadro 6: Classificação de farinha de mandioca do Grupo d'água.....	28
Quadro 7: Composição nutricional da farinha de mandioca.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Fungos isolados em amostras de farinha de mandioca.....	43
Tabela 2: Frequência relativa dos fungos isolados nas amostras de farinha de mandioca.....	44
Tabela 3 – Espécies de fungos identificadas pela taxonomia tradicional e biologia molecular.....	45
Tabela 4: Micotoxinas em amostras de farinha de mandioca.....	48

Sumário

1	Introdução.....	13
2	Revisão de literatura.....	15
3	Objetivos.....	36
	3.1 Objetivo geral.....	36
	3.2 Objetivo específico.....	36
4	Material e Método.....	31
	4.3 Identificação por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	40
	4.4 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento.....	41
	4.5 Identificação de micotoxinas por MALDI TOF.....	41
5	Resultados e discussão.....	42
6	Conclusão.....	49
7	Referências.....	50
8	Apêndice.....	60

1. INTRODUÇÃO

A mandioca é um dos alimentos mais consumidos em todo território brasileiro. Seu uso é predominantemente para consumo humano, seguido pela industrialização em farinha, amido e derivados e na nutrição animal. O país ainda se destaca como o segundo maior produtor mundial de mandioca, com aproximadamente 2 milhões de hectares, com produção de cerca de 25 milhões de toneladas de raízes frescas, ficando apenas atrás da Nigéria, na África.

No estado do Amazonas, a cultura desta raiz ocupa lugar de destaque, e em 2010 foram produzidas 307.483 toneladas, com grande contribuição dos municípios do médio Solimões, Tefé e Coari. A principal forma de consumo da mandioca, na região, é feita na forma de farinha, que constitui um alimento de alto valor energético, rico em carboidratos. O seu consumo é extremamente importante para o aporte de energia, principalmente no que se refere à população de baixa renda, sendo geralmente apreciada acompanhando peixe e o açaí, além de fazer parte de pratos típicos da região.

A mandioca tem sido classificada em mansa e brava de acordo com a concentração de ácido cianídrico: a primeira quando é inferior a 100 mg kg^{-1} e a segunda quando possui valores superiores, e por esse motivo deve ser consumida apenas após tratamento adequado. O processamento da farinha, na região amazônica, ocorre de maneira artesanal em pequenas unidades fabris, as casas de farinhas, sem critérios de higiene e sem uniformidade, por esse motivo pouco valorizado. Cada produtor possui processamento próprio, que favorece a heterogeneidade do produto nos aspectos de granulometria, coloração, acidez, umidade e outras características. O modo artesanal de obtenção de farinhas possibilita contaminação por micro-organismos, porém durante a etapa de desidratação grande parte deles são eliminados, por ser realizada com temperaturas acima de $200 \text{ }^\circ\text{C}$. Sendo assim, é durante o armazenamento o maior risco de contaminação, pois ocorre de maneira inadequada, além do agravante clima quente e úmido, que contribui significativamente para o desenvolvimento desses micro-organismos principalmente os fungos, que podem se desenvolver em alimentos com baixa umidade e baixa atividade de água, como a farinha de mandioca.

Os fungos podem liberar micotoxinas, metabólitos secundários que são tóxicos para seres humanos e animais. Estas toxinas são de grande importância em termos econômicos e de saúde pública. Do ponto de vista econômico, causam prejuízos a produtores e comprometem a comercialização. Do ponto de vista de saúde pública, segundo a ONU, cerca de 40% da

expectativa de vida que é reduzida em países pobres está relacionada com a existência de micotoxinas na dieta destas populações.

É importante considerar que estudos onde há investigação de micotoxinas em alimentos no Brasil vem aumentando nos últimos anos principalmente no Centro-sul do país. Porém na região Norte pesquisas com este enfoque ainda são muito escassas e muitos alimentos produzidos e consumidos na região ainda não foram analisados quanto a presença de micotoxinas, outros possuem poucos estudos a respeito sendo necessário maiores investigações, é o caso da farinha de mandioca.

O município de Coari-AM situado na Região do Médio Solimão se destaca pela produção e o consumo de farinha de mandioca, e neste contexto o presente estudo tem como objetivo investigar os aspectos toxicológicos das farinhas de mandioca produzida neste município.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) apresenta importância socioeconômica mundial, como principal fonte de carboidratos de baixo custo para milhões de pessoas, essencialmente nos países em desenvolvimento (ALMEIDA *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.* 2007). De acordo com a FAO a mandioca é considerada o terceiro alimento energético mais importante nos trópicos, após o arroz e milho.

Em função da importância histórica, a mandioca é cultivada extensivamente em todos os estados brasileiros, em consequência das condições favoráveis ao seu crescimento, e também pela sua facilidade de cultivo, adaptabilidade a diversos tipos de solos e relativa resistência a períodos de estiagem (ALMEIDA; SANTOS, 2011).

Na região Norte, o Amazonas ocupa o segundo lugar na produção da mandioca (IBGE, 2010). Esta cultura é tradicionalmente executada por pequenos produtores rurais, que utilizam na maioria das vezes a mão de obra familiar, sendo de grande importância para a geração de renda, e em alguns casos é a única fonte econômica. É a principal fonte alimentar para as famílias de baixo poder aquisitivo, consumida principalmente na forma de farinha, processada pelo próprio grupo familiar, que geralmente substitui os alimentos mais valorizados comercialmente (JESUS *et al.*, 2012).

De acordo com o Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE, 2009), há uma grande variedade de nomes dados à mandioca, alguns de origem regionalista e outros denominando variedades diferentes da planta. Dependendo da região, pode ser popularmente conhecida como: aipim, aimpim, candinga, castelinha, macamba, macaxeira, macaxera, mandioca brava, mandioca doce, mandioca mansa, mandioca doce, mandioca amarga, maniva, maniveira, moogo, mucamba, pão-da-américa, pão-de-pobre, pau-de-farinha, pau-farinha, tapioca, uaipi e xagala.

2.1.1 Aspectos botânicos

O gênero *Manihot* tem 98 espécies, porém a única cultivada para a produção de raízes comestíveis comercialmente é a *M. esculenta* Crantz, por suas raízes serem ricas em carboidratos (NASSAR *et al.*, 1986; 2006).

A mandioca cultivada é um arbusto perene, pertencente a família *Euphorbiaceae*, é de fácil adaptação as diferentes condições endofoclimáticas. É cultivada em regiões de clima tropical

e subtropical, é bem tolerante à seca e possui ampla adaptação às mais variadas condições de clima e solo. A classificação taxonômica é descrita por Carvalho (2005) como:

Reino: *Plantae*

Divisão: *Magnoliophyta*

Classe: *Magnoliopsida*

Ordem: *Euphorbiales*

Família: *Euphorbiaceae*

Gênero: *Manihot*

Espécie: *Manihot esculenta*

A raiz adventícia desta planta apresenta o padrão anatômico normal de desenvolvimento até o início do processo de tuberização, estabelecendo-se uma diferenciação maior de células parenquimáticas do xilema para acúmulo de grãos de amido. O espessamento da raiz ocorre pela migração de substâncias de reserva para a raiz de armazenamento e dessa forma ocorre o crescimento em diâmetro pela deposição do amido (CARVALHO, 2005).

Figura 1. Constituintes da planta mandioca. A) Parte aérea e B) Caule e raízes tuberosas.



Fonte: Acervo pessoal (BRITO, 2014).

2.1.2 Origem, domesticação e diversificação

A origem e domesticação da mandioca há muito tempo é discutida. Olsen e Schall (1999; 2004) esclareceram a origem da mandioca, avaliando características morfológicas, geográficas e filogenéticas de inúmeras populações nessas nas regiões entre América do Sul e México. Nestes estudos foram utilizados dois tipos de marcadores de DNA: SPNs (*Single*

Nucleotide Polymorphisms) e SSR (*Simple Sequence Repeats*). O estudo propõe que a espécie originou-se no Sudoeste da Amazônia e que a *M. esculenta* sub. *flabellifolia* é a ancestral da espécie cultivada atualmente. Em complemento a essa afirmativa, outras evidências tanto do complexo agrícola desta região no passado como estudos arqueológicos corroboram nesta conclusão. É importante considerar que essa raiz apresenta uma ampla diversidade genética, resultante da seleção natural ocorrida durante a evolução da espécie, na pré e pós-domesticação. Nos diversos ambientes a mandioca se diversificou, a seleção resultou numa ampla diversidade de clones com adaptação específica a determinados ecossistemas (HERSHEY, 1989).

Quando os europeus chegaram a América no século XV, a mandioca já era cultivada em todo continente (ALLEN, 2002). Após o descobrimento da América houve uma rápida dispersão desta espécie. No século XVI, a mandioca foi introduzida na Ásia e na África por portugueses e espanhóis, onde se desenvolveu com grande sucesso e hoje, o continente africano é considerado um centro secundário de diversidade (HERSHEY, 1989). Testes de campo realizados pela Embrapa em vários estados da Amazônia legal na busca da agrobiodiversidade focalizando características na raiz de reserva mostraram uma surpreendente variabilidade genética nessas raízes.

2.1.3 Agricultura Tradicional e Agrobiodiversidade

O cultivo da mandioca é de grande relevância econômica como principal fonte de carboidratos para milhões de pessoas, essencialmente nos países em desenvolvimento (AMUSA *et al.* 2003; GNONLONFIN, 2008).

Para caracterizar a cultura da mandioca no Brasil é utilizado o termo de agricultura tradicional ou agricultura autóctone por se tratar de um sistema agrícola cujas bases técnicas reportam ao Brasil pré-colonial, mantidas pelas populações indígenas remanescentes e populações que se utilizam de técnicas transmitidas culturalmente por seus antepassados (CURY *et al.*, 1993). Essas técnicas adaptam-se aos ecossistemas das regiões onde são praticadas (FARADO *et al.*, 2000).

Esse tipo de agricultura é caracterizado pelo uso de um ciclo de corte da vegetação em estágio de sucessão secundária, seguido pela queima desta vegetação quando seca, plantio, cultivo, abandono da área após alguns anos, a essa dá-se o nome de itinerante, coivara ou de corte e queima (CURY, 1993; ÉDEN, 1993). A contribuição desta agricultura é a sua diversidade genética, pois os processos evolutivos estão constantemente ativos. A diversidade genética da

mandioca é notada pelo grande número de variedades cultivadas conhecidas como *variedades tradicionais* ou *etnovariedades* (BRUSH *et al.*, 1981; BRESSAN *et al.*, 2005).

A mandioca é a principal planta cultivada na agricultura autóctone no Brasil (MARTINS, 1994). Cultivada sob um sistema agrícola tradicional, possui grande variabilidade genética, ausentes em cultivares melhoradas (CLEVELAND *et al.*, 1994). Pesquisadores relatam que a diversidade associada à cultura de mandioca está grandemente relacionada ao sistema de reprodução da cultura, pela prática de manejo dos agricultores e pelas pressões de seleção exercidas (BEZERRA, 1997; CURY, 1993; 1998).

2.1.4 Distribuição geográfica da mandioca

A produção da mandioca encontra-se fortemente distribuída pelo continente africano, que hoje detém parte significativa da produção mundial, sendo distribuída por vários países, com destaque para a Nigéria e República Democrática do Congo (Quadro 1) (FAO, 2010). Segundo a FAO, na África a mandioca é produzida para consumo da própria população, na sua maioria *in natura*, cozida ou frita. Ainda são poucas as indústrias de transformação da raiz e geralmente o processamento ocorre de maneira artesanal. Em seguida, destaca-se a Ásia, com maior contribuição da Tailândia e Indonésia. Nesse continente a produção, ao contrário da África e América do Sul, colocando a Tailândia como o principal exportador de derivados de mandioca do mundo (FAO, 2010). Dentre os países da América do Sul, o Brasil é um expressivo representante desta cultura (Quadro 1) (FAO, 2010).

Quadro 1: Produção anual de mandioca nos principais países produtores em diferentes continentes no período de 2006 a 2010.

Países	Quantidade produzida por ano (em milhões de toneladas)				
	2006	2007	2008	2009	2010
ÁFRICA	117,5	114,0	118,0	113,6	121,3
Nigéria	45,7	43,4	44,5	36,8	42,5
República Dominicana	14,9	15,0	15,1	15,0	11,4
Angola	9,0	9,7	10,1	12,8	13,9
Outros	47,2	54,0	48,7	49,0	53,5
ÁSIA	67,5	73,0	78,8	79,0	81,5
Indonésia	19,9	19,9	21,5	22,0	24,0
Tailândia	22,6	26,9	25,1	30,0	22,0
Outros	24,9	30,4	29,6	27,0	35,5
AMÉRICA DO SUL	35,4	35,4	34,7	33,7	35,6
Brasil	26,6	26,5	26,7	24,4	24,5
Outros	8,7	8,8	8,8	9,3	11,6
OUTROS PAÍSES	1,9	1,7	1,5	1,7	3,6
TOTAL MUNDIAL	223,2	225,8	233,3	233,8	242,0

Fonte: FAO (2010).

A produção brasileira apesar de ser significativa, praticamente estagnou nos últimos anos, ora apresentando pequenos decréscimos ora apresentando pequenos acréscimos, porém nada significativo (IBGE, 2010).

Cultivada em todas as regiões do Brasil, a cultura da mandioca tem a maior contribuição das regiões Nordeste e Norte, que juntas atingem 60% da produção nacional, seguidas das regiões Sul (23,99%), Sudeste (9,93%) e Centro Oeste (5,61%) (Quadro 2).

As duas regiões citadas possuem características de produção semelhantes, apresentando grande participação da agricultura familiar no cultivo, com a maior parte da produção destinada ao mercado interno (LEONEL; OLIVEIRA, 2003). As regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste tem o plantio da mandioca voltado para o mercado industrial, principalmente na produção de amido e farinha de mandioca.

Quadro 2: Produção de mandioca de acordo com a região geográfica do Brasil.

Região Geográfica	Período (ano)					Total 2010
	2006	2007	2008	2009	2010	
	Milhões de toneladas					%
Norte	7.306	7.559	7.662	7.147	6.594	27,18
Nordeste	9.615	9.742	9.838	8.178	8.055	33,20
Sudeste	2.492	2.358	2.341	2.236	2.410	9,93
Sul	5.749	5.370	5.248	5.488	5.821	23,99
Centro Oeste	1.478	1.511	1.614	1.353	1.378	5,61
Brasil	26.639	26.541	26.703	24.403	24.260	100

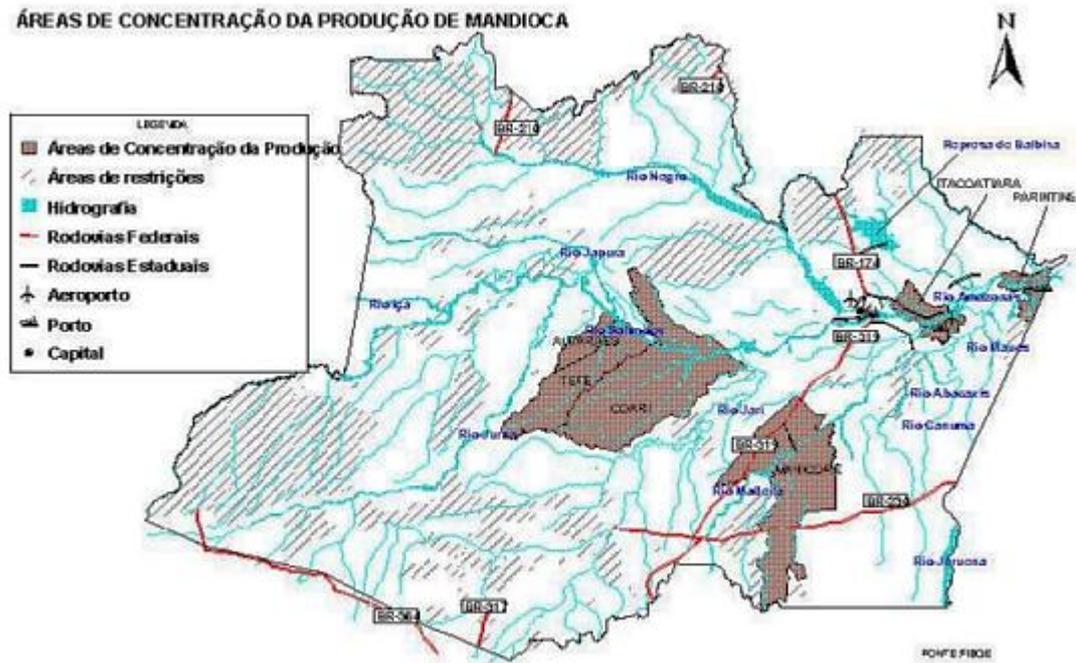
Fonte: IBGE (2010).

No estado do Amazonas, a cultura da mandioca ocupa lugar de destaque. Em 2010 foram produzidas 307.483 toneladas. Dos sessenta e dois municípios amazonenses, Tefé e Coari, representantes do médio Solimões, estão entre os dez primeiros produtores (Figura 1 e Quadro 3) (IBGE, 2010).

Embora haja grande produção de mandioca no Amazonas, os rendimentos médios são inferiores aos demais estados brasileiros e abaixo da média nacional, o que evidencia uma baixa produtividade. Este fato pode ser explicado pelo sistema de plantio rudimentar, com nenhuma ou pouca inovação tecnológica (ALMEIDA; SANTOS, 2011).

Na região, o consumo da mandioca ocorre predominantemente na forma de farinha, com o principal objetivo de suprir a necessidade alimentar da família e caso haja excedente, o produto é comercializado em feiras rurais (LEONEL; OLIVEIRA, 2003).

Figura 2: Área de concentração da produção da mandioca no estado do Amazonas.



Fonte: SEPLAN (2010).

Quadro 3: Dados de produção de mandioca nos municípios produtores do estado do Amazonas, ano agrícola de 2010.

Cultivo de mandioca no Amazonas	Área	Produção
Município	ha	T
Parintins	5.234	65.901
Manacapuru	6.442	26.577
Manicoré	9.514	25.560
Tefé	10.021	24.252
Maués	4.717	14.457
Uarini	6.005	12.060
Presidente Figueiredo	1.550	11.400
Ipixuna	1.045	10.868
Coari	870	8.640

Fonte: IBGE(2010).

2.2 Composição nutricional

É importante considerar que a composição química da mandioca depende de fatores como cultivar, a idade da planta, o manejo e principalmente os fatores genéticos associados (CENI *et al.*, 2009). De maneira geral a mandioca caracteriza-se por ser um alimento de alto valor energético, possui teor elevado de amido, contêm fibras e alguns minerais como potássio, cálcio, fósforo, sódio e ferro Segundo Ceni *et al.* (2009) ao analisarem minerais em diferentes cultivares de mandioca, constataram que são apreciáveis fontes de potássio e magnésio. O Quadro 4 demonstra a diferença na composição nutricional entre mandioca “brava” e

“mansa”, entretanto os autores não trazem os valores de cianeto para confirmar a classificação das raízes de mandioca analisadas.

Quadro 4: Composição nutricional da mandioca “Mansa” e “Brava”.

Nutriente	“Mandioca Mansa”	“Mandioca Brava”
	g 100⁻¹	
Amido	80,1	86,3
Proteína	1,3	1,2
Fibra	3,4	1,4
Lipídeo	0,2	0,3
Umidade	12,3	9,6
Fibra	2,7	1,2

Fonte: Charles *et al.* (2005).

Grizotto *et al.* (2004) consideraram a mandioca excelente fonte de fibras dietéticas com ênfase a celulose e ligninas, com maior participação da celulose que da lignina. Em relação à proteína na mandioca, pode chegar até cerca de 1,5% de proteína, porém no caso de hibridização esse valor pode chegar a 5% (NASSAR, 2006).

2.3 Produtos derivados da mandioca

A mandioca é uma raiz altamente perecível. Quando está na sua forma *in natura* a sua deterioração fisiológica (deterioração primária) pode ocorrer de dois a três dias após a colheita e logo em seguida ocorre a contaminação por micro-organismos saprofíticos (deterioração secundária), e por esse motivo processar esse alimento torna-se essencial.

O processamento das raízes de mandioca é realizado principalmente para reduzir o teor de umidade tornando assim possível seu armazenamento, eliminar o potencial tóxico da raiz e deixá-la mais palatável (ARYEE *et al.*, 2005; DIAS; LEONEL, 2006). Entre os produtos derivados da mandioca presentes na dieta dos brasileiros estão:

✓ Fécula, polvilho doce, amido ou amido nativo de mandioca: Corresponde ao produto mais conhecido em âmbito mundial. O amido corresponde a um componente composto por glicose proveniente do processo fotossintético vegetal, sendo armazenado na forma de grânulos nos órgãos de reserva (raízes). Quando estes são extraídos, apresentam-se como pó branco fino, insípido e inodoro, como máximo da acidez permitida de 1 mL de solução de NaOH 1N por 100g de amostra (BRASIL, 1978).

✓ Polvilho Azedo: Corresponde a um amido modificado obtido a partir do processo fermentativo do amido nativo, com características específicas de expansão das massas e

elevado teor de acidez, até 5 mL de solução de NaOH 1N por 100 g de amostra (BRASIL, 1978).

✓ Puba, massa de mandioca ou carimã: Obtida a partir de raízes deixadas de molho, na água, cerca de três dias, para fermentarem, em seguida são prensadas e embaladas (ALMEIDA, 1992).

✓ Tucupi: É obtido a partir da água de constituição das raízes, a manipeira, removido por prensagem das raízes frescas picadas ou da massa ralada. Tipicamente produzido na região Norte do Brasil. Contém sempre amido e parte dos demais constituintes das raízes, como sais minerais, açúcares, proteínas e os glicosídeos cianogênicos. Após fervura prolongada são utilizados temperos como molho de pimenta ou incorporados em receitas (CORREA *et al.*, 2005).

✓ Farinha de mandioca d'água: É o produto mais comum da região Norte do Brasil, proveniente da raiz da mandioca, fabricada, na maioria das vezes, por processo artesanal, motivo pelo qual possui grande variação na cor, textura, granulometria, acidez e umidade (CORREA *et al.*, 2005; VILPOUX, 2003). O processamento consiste no descascamento prévio das raízes, seguido por fermentação quando imerso em água. Posteriormente o material é ralado, prensado e assado em fornos (CEREDA; VILPOUX, 2003).

✓ Farinha de tapioca: É o produto obtido sob forma granulada a partir da fécula de mandioca e submetido a processo tecnológico adequado (CORREA *et al.*, 2005). O consumo se dá principalmente na forma de mingau, roscas, bolos, pudins, sorvetes, e acompanhando o açaí na região Norte do país (CEREDA; VILPOUX, 2003).

2.3.1 Farinha de mandioca

A farinha é um dos principais produtos proveniente da mandioca, para alimentação humana no Brasil (CEREDA, 2005). É consumida em todo o país em especial nas regiões Norte e Nordeste. Entretanto, os produtos definidos como farinha podem apresentar características muito diferentes, no que se refere a cor, granulometria e sabor (CORREA *et al.*, 2005) de acordo com o processo de elaboração.

Na região Amazônica são encontradas farinha seca grossa e amarela, a farinha d'água ou puba e a farinha mista, dentre elas a mais encontrada é a farinha mista (CARDOSO, 2005). O consumo per capita anual na região Norte é de 34 kg/hab/ano, os estados com maior índices de consumo de farinha são Pará 43,98 kg/hab/ano e Amazonas 43,78 kg/hab/ano, estes valores são superior a qualquer outra região do país (IBGE, 2010). Esse dado é explicado pelo fato da

população da região possuir o hábito alimentar com base na farinha, proveniente da forte influência indígena (CARDOSO, 2005).

De acordo com a Instrução Normativa nº 52 de 7 de novembro de 2011, que estabelece o regulamento técnico da farinha de mandioca conceitua este alimento comum produto obtido de raízes de mandioca, do gênero *Manihot*, submetidas a processo tecnológico adequado de fabricação e beneficiamento (BRASIL, 2011).

Considerando a mesma Legislação, a farinha de mandioca pode ser classificada em Grupos, Classes e Tipos. A classificação de acordo com o processo tecnológico empregado na fabricação pode ocorrer em três grupos diferentes.

✓ Farinha seca: Produto obtido das raízes de mandioca sadias, devidamente limpas, descascadas, trituradas, raladas, moídas, prensadas, desmembradas, peneiradas, secas à temperatura adequada, podendo novamente ser peneirada e ainda beneficiada;

✓ Farinha d'água: Produto predominantemente fermentado, obtido das raízes de mandiocas sadias, maceradas, descascadas, trituradas ou moídas, prensadas desmembradas, peneiradas e secas a temperatura adequada, podendo ser novamente peneirada;

✓ Farinha bijusada: Produto de baixa densidade, obtido das raízes de mandioca sadias, limpas, descascadas, trituradas, raladas, moídas, prensadas, desmembradas, peneiradas e laminadas a temperatura adequada, na forma predominante de flocos irregulares.

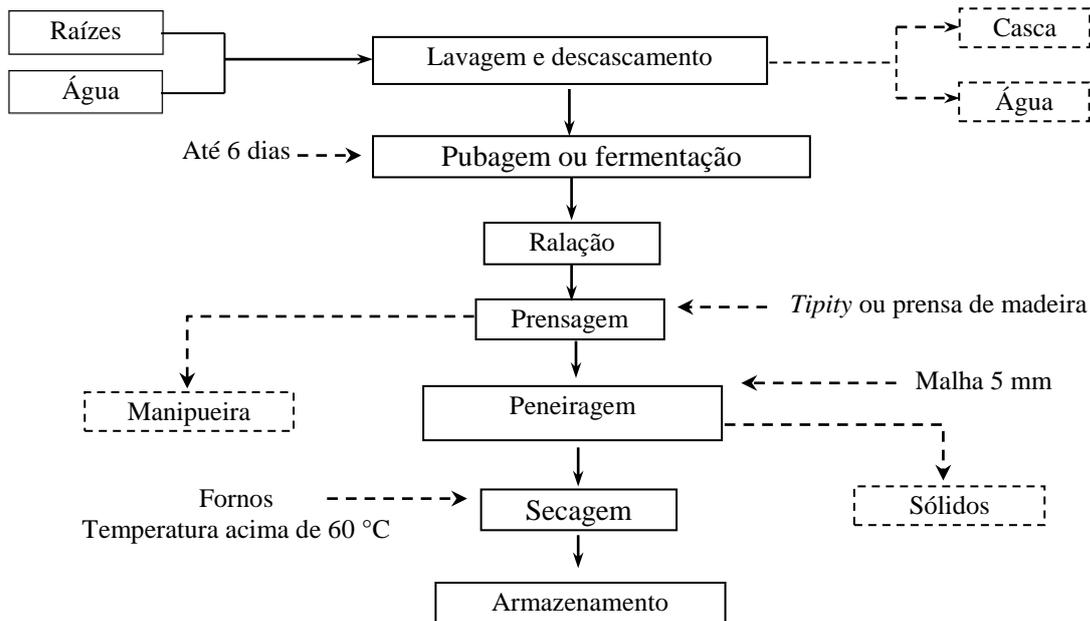
✓ Farinha mista: É um tipo de farinha regional que não está prevista na instrução normativa nº52 de 7 de novembro de 2011, porém é muito produzida na região, é obtida pela mistura da massa ralada com a fermentada em proporções diferentes, sendo de 75 a 80% da massa fermentada e de 20 a 25 % da massa ralada. Após a mistura das massas segue o processo da farinha d'água.

Na região Norte a farinha mais utilizada é a farinha d'água e farinha mista, produzida em pequenos estabelecimentos denominados casas de farinha. O processamento ocorre por pequenos produtores de forma artesanal com o objetivo de suprir a necessidade da família e comercializarem em feiras rurais ou pequenos comércio (CHISTÉ *et al.* 2006; CEREDA; VILPOUX, 2003).

2.3.1.1 Processamento da farinha de mandioca do tipo d'água

O processamento da farinha de mandioca do grupo d'água se difere da seca por apresentar a etapa do molho ou pubagem onde a raiz é fermentada. Esta condição resulta um odor característico na farinha. As etapas do processamento estão dispostos na Figura 6.

Figura 3: Fluxograma das etapas básicas de processamento da farinha de mandioca d'água.



Fonte: Cereda e Vilpoux (2003) e Cardoso (2005) adaptado.

As operações envolvidas no processo de fabricação de farinha d'água correspondem a:

- ✓ Colheita: Esta etapa geralmente ocorre na própria comunidade. A colheita é feita de forma manual e por esse motivo exige pessoas envolvidas nessa tarefa (ALMEIDA, 1992). De maneira geral, para a produção de farinha de mandioca são utilizadas raízes de plantas com 18 a 24 meses de idade, que proporcionam maior rendimento industrial (CEREDA; VILPOUX, 2003).
- ✓ Descascamento: Nas comunidades é realizado descascamento manual das raízes, com uso de faca, desta forma há grande necessidade de mão-de-obra (ALMEIDA, 1992; CEREDA; VILPOUX, 2003).
- ✓ Pubagem: É o processo de amolecimento das raízes de mandioca por fermentação natural, sem uso de inoculo. Em algumas comunidades a pubagem ainda é feita na margem dos rios, com água mais fria, exigindo um tempo maior para a fermentação se completar, porém em outras já é possível perceber a instalação de tanques pequenos nas comunidades (alvenaria, caixa d'água e fibra-cimento) permitindo maior controle do processo (Figura 4A) (ALMEIDA, 1992; CEREDA, 2005).

O tempo de pubagem varia entre comunidades. Tradicionalmente a pubagem ocorre em torno de seis dias e após esta etapa a raiz apresentará textura mole, e cheiro característico de fermentado (Figura 4B).



Figura 4: Preparo de farinha d'água. A) Pubagem das raízes de mandioca (imersão em água) e B) massa após pubagem.

Fonte: Acervo pessoal (MUNDIM, 2014).

✓ **Ralação:** Esta etapa é geralmente feita antes da prensagem, porém pode ser feita após esta etapa. A ralação é na maioria das vezes feita por um ralador tracionado, por motores e movido a óleo diesel, gasolina ou eletricidade, conforme a disponibilidade do local (Figura 5A) (CARDOSO, 2005).

✓ **Prensagem:** Depois de ralada, a massa de mandioca deve ser prensada em estrutura feita com folhas de palmeira denominada *Tipity*. Essas prensas provêm de tecnologia de origem indígena e são fabricadas no local com material disponível, muito barato, resistente, de fácil manutenção, mas de difícil limpeza (ALMEIDA, 1992). Em alguns locais são utilizados a prensa de madeira, em que a força de prensagem é feita por meio de eixo de fuso (Figura 5B).



Figura 5: Preparo de farinha d'água. A) Ralação das raízes de mandioca e B) prensagem da massa ralada.

Fonte: Acervo pessoal (MUNDIM, 2014).

✓ **Peneiragem ou esfarelamento:** Após a prensa a massa ralada é esfarelada numa peneira com furos com cerca de 5 mm de diâmetro e o resíduo retido volta ao ralador para reaproveitamento (Figura 6A) (ALMEIDA, 1992).

✓ Secagem: Pode ser considerada a etapa mais importante do processamento da farinha d'água, pois dela depende a granulometria final do produto (CEREDA, 2005). É realizada em fornos redondos onde a massa é constantemente mexida com uma pá pelo farinheiro. As temperaturas alcançadas são muito altas permitindo formação de grânulos típicos do produto em razão da gelificação do amido (Figura 6B) (ALMEIDA, 1992).



Figura 6: Preparo de farinha d'água. A) Peneiragem da massa e B) Torrefação

Fonte: Acervo pessoal (MUNDIM, 2014).

✓ Armazenamento: A farinha é embalada para transporte e comercialização em sacos de fibras de plásticos trançadas com capacidade até 60 Kg. Os sacos são então deslocados em transportes fluviais, na maioria das vezes, ou terrestres para posteriormente serem comercializados nas feiras das cidades próximas do local de produção (Figuras 7 A e B) (CARDOSO, 2005).



Figura 7: Preparo de farinha d'água. A) e B) Armazenamento.

Fonte: Acervo pessoal (MUNDIM, 2014).

2.4 Qualidade da farinha de mandioca

A farinha produzida no estado do Amazonas apresenta-se de forma muito heterogênea principalmente no que se refere a coloração, textura, granulometria, aos fatores físico químicos e microbiológicos. Por esse motivo trata-se de um produto pouco valorizado. Esta falta de padronização ocorre, sobretudo pelo processo ser realizado por pequenos produtores, cada um deles seguindo por seu próprio critério de elaboração e qualidade, como diferentes temperaturas de forno no momento da secagem, variação no tempo de pubagem, intensidade de prensagem e outros (DIAS; LEONEL, 2006; CHISTÉ et al. 2006).

Várias casas de farinha possuem problemas estruturais, Oliveira e Rebouças (2008) ao realizar um diagnóstico higiênico sanitário em 40 unidades de casas de farinha no sudoeste da Bahia constataram que 100% delas estavam deficientes, as maiores dificuldades relatadas foram em relação a limpeza da estrutura, dos equipamentos dos utensílios e manipulação e controle da qualidade, não muito diferente do que ocorre na região Amazônica.

2.4.1. Parâmetros de qualidade de farinhas - Instrução Normativa nº52 de 07 de novembro de 2011

2.4.1.1 Critérios para classificação

A farinha de mandioca do Grupo Seca pode ser classificada em três diferentes classes de acordo com sua granulometria, são eles: Fina, quando 100% do produto passar através da peneira de 2 mm; Grossa, quando a retenção na peneira de 2 mm for de mais de 10% ou média quando não se encaixar em nenhum dos casos anteriores.

No caso da farinha de mandioca do Grupo d'água a classificação segundo a granulometria ocorre diferenciada do grupo seca, pois é levado em consideração o processamento de cada uma delas, ocorrendo da seguinte forma: Fina, quando o produto fica retido até 10% na peneira com abertura de malha 2 mm; Média, quando o produto retido na peneira de malha de 2 mm fica entre 10 a 15% e Grossa quando o produto retido é maior que 15% na peneira com abertura de malha de 2 mm.

Segundo a Instrução Normativa cada grupo da farinha de mandioca pode ser classificada de formas diferenciadas, considerando parâmetros como: Quantidade de amido, fibras brutas, cinzas, análise sensorial, cascas e entrecasas e matéria estranha (Quadro 5 e Quadro 6). A farinha de mandioca bijusada que se enquadra no tipo único.

Caso os parâmetros da farinha de mandioca estejam fora do previsto na normativa, o produto deverá receber a seguinte nomenclatura: Produto desclassificado ou Fora do Tipo. Quando

classificada como Fora do Tipo poderá ser comercializada como se apresenta, desde que identificada como Fora do Tipo.

Quando o produto for Desclassificado será considerada imprópria para o consumo, com comercialização proibida, tal fato ocorrerá quando apresentar as seguintes situações: Aspecto generalizado mofo ou fermentação, mau estado de conservação, odor estranho impróprio ao produto que inviabiliza a sua utilização para o uso proposto ou presença de insetos.

De forma geral a farinha de mandioca deve se apresentar limpa e seca. Os produtos devem ser obtidos processados, embalados, armazenados, transportados e conservados em condições adequadas, de forma a não permitir contaminação de substâncias físicas, químicas e biológicas que coloquem em risco a saúde do consumidor.

A umidade deverá ser inferior a 13% e a acidez desses produtos para o grupo seca e bijusada serão consideradas de baixa acidez quando apresentarem valores até 3 meq NaOH (0,1 N) 100 g⁻¹, ou alta acidez valores acima de 3,0 meq 100 g⁻¹; e para o grupo d'água será considerada de baixa acidez a farinha de mandioca que apresentar valores até 5,0 meq de NaOH 100g⁻¹, ou alta para valores acima de 5,0 meq 100 g⁻¹.

Quadro 5: Classificação de farinha de mandioca do Grupo Seca

Classe Tipo	Fina			Média			Grossa		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Teor de amido (g 100g ⁻¹)	≥86,0	≥82,0 <86,0	≥80,0 >82,0	≥86,0	≥82,0 <86,0	≥80,0 >82,0	≥86,0	≥82,0 <86,0	≥80,0 >82,0
Teor de cinzas (g 100g ⁻¹)	≤1,4	≤1,4	≤1,4	≤1,4	≤1,4	≤1,4	≤1,4	≤1,4	≤1,4
Fibra bruta (g 100g ⁻¹)	≤2,3	≤2,3	≤2,3	≤2,3	≤2,3	≤2,3	≤2,3	≤2,3	≤2,3
Cascas e entrecascas (g 100g ⁻¹)	Não realizada			≤1,1	<1,1 ≤2,2	>2,2 ≤3,4	≤1,3	>1,3 ≤2,6	>2,6 ≤3,9
Características sensoriais	Normal ou Característico								
Matéria estranha	Ausência na amostra de trabalho (1 kg)								

Fonte: BRASIL (2011).

Quadro 6: Classificação de farinha de mandioca do Grupo d'água .

Classe Tipo	Fina			Média			Grossa		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Teor de amido (g 100g ⁻¹)	≥86,0	≥82,0 <86,0	≥80,0 <82,0	≥86,0	≥82,0 <86,0	≥80,0 <82,0	≥86,0	≥82,0 <86,0	≥80,0 <82,0
Teor de cinzas (g 100g ⁻¹)	≤1,4	≤1,4	≤1,4	≤1,4	≤1,4	≤1,4	≤1,4	≤1,4	≤1,4
Fibra bruta (g 100g ⁻¹)	≤2,3	≤2,3	≤2,3	≤2,3	≤2,3	≤2,3	≤2,3	≤2,3	≤2,3
Cascas e entrecascas (g 100g ⁻¹)	≤1,5	>1,5 ≤3,0	>3,0 ≤6,0	≤1,5	>1,5 ≤3,0	>3,0 ≤6,0	≤1,5	>1,5 ≤3,0	>3,0 ≤6,0
Características sensoriais	Normal ou Característico								
Matéria estranha	Ausência na amostra de trabalho (1 kg)								

Fonte: BRASIL (2011).

2.4.1.2 Exigências para rotulagem da farinha de mandioca

Para a comercialização da farinha de mandioca a rotulagem é obrigatória e quando o produto for embalado, destinado especificamente a alimentação humana, deverá conter as seguintes informações: identificação do produto, grupo, classe, tipo, identificação do lote e data de acondicionamento, nome da empresa, registro no cadastro nacional de pessoa jurídica - CNPJ ou no cadastro nacional de pessoa física - CPF, e endereço da empresa embaladora ou do responsável pelo produto e acidez do produto.

No caso de farinha de mandioca a granel destinada diretamente a alimentação humana, o produto deverá ser identificado e as expressões colocadas em lugar de destaque e de fácil visualização, contendo, no mínimo, as informações relativas ao grupo e ao tipo do produto.

2.4.1.3 Valor nutricional da farinha de mandioca

A forma das farinhas varia muito em função do local de produção e do tipo. No entanto, seus componentes são similares e dependem da composição das raízes de mandioca utilizadas. As únicas composições que dependem do processo e do tipo de armazenamento são umidade e acidez (CEREDA e VILPOUX, 2003).

O Quadro 7 demonstra achados similares entre diferentes autores, referente composição da farinha de mandioca d'água. Observa-se elevado valor energético proveniente da presença da grande quantidade de carboidrato. Entre os micronutrientes é descrita a presença de cálcio, magnésio, fósforo e ferro. São baixos os teores de lipídios e de proteínas. Para Cereda e Vilpoux (2003) o fato da farinha não ser um alimento rico em proteínas não é algo preocupante, pois na Região Norte este alimento é geralmente consumida com alimentos.

Quadro 7: Composição nutricional da farinha de mandioca d'água descrita por diferentes autores

Nutriente	IBGE (2008)	FRANCO (2002)	TACO (2011)
	g 100 g⁻¹		
Umidade	10,4	Não relatado	9,4
Proteína	1,6	1,4	1,6
Lipídeo	0,3	0,4	0,3
Carboidratos	87,9	83,24	87,9
Fibra alimentar	1,8	Não relatado	6,4
Cinzas	1,2	Não relatado	0,9
	mg 100 g⁻¹		
Cálcio	65	45	65
Magnésio	37	Não relatado	37
Fósforo	42	198	Não relatado
Ferro	1,10	0,90	Não relatado
	Kcal		
Calorias	361,0	342,7	360

Fonte: IBGE (2008), FRANCO (2002) e TACO (2011) adaptado.

2.5 Fungos em alimentos

Os fungos constituem um grande grupo de seres vivos que podem ser encontrados em quase todos os nichos ecológicos. São seres eucariontes heterotróficos, altamente eficientes na degradação de ampla gama de substratos (AZEVEDO, 1997). Quando o enfoque é no alimento os fungos mais estudados são os fungos filamentosos por serem produtores de micotoxinas, metabólitos secundários, que se caracterizam pela elevada toxicidade em animais e seres vivos.

De acordo com Pitt e Hocking (2009), os principais fatores que afetam o crescimento de fungos em alimentos são a disponibilidade de água livre (atividade de água), o efeito de solutos específicos, a concentração de íons hidrogênio (pH), a temperatura do processo e de estocagem, a atmosfera de armazenamento, a consistência do alimento e as características nutricionais. É importante enfatizar que a temperatura, umidade, atividade de água e substrato são relatados como fatores mais importantes para o desenvolvimento de fungos e produção de micotoxinas. No entanto as condições ambientais como umidade relativa e temperatura são fatores determinantes para o desenvolvimento dos fungos, pois influenciarão diretamente nas características intrínsecas dos alimentos, uma vez que a umidade relativa se equilibra com a água livre do alimento (Pitt e Hocking, 2009).

A deterioração fúngica causam grandes impactos econômicos entre eles estão: diminuição do poder germinativo, alteração no sabor e no aroma (causado principalmente pelas exoenzimas), descoloração e mudança química e nutricional (Paster, Bulerman, 1988). A produção de micotoxinas nos alimentos são, atualmente, a maior preocupação em relação aos fungos nos alimentos, porque estas podem apresentar grandes prejuízos a saúde de animais e seres humanos.

2.5.1 Fungos micotoxigênicos

Fungos filamentosos são organismos que produzem diversos metabólitos secundários, dentre eles, as micotoxinas. São produzidas em sua maioria por espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* relevantes pelo envolvimento com contaminação de alimentos e produção de micotoxinas (IARC, International Agency for Research on Cancer, 1993). Tais fungos podem ocorrer naturalmente em alimentos agrícolas pré e pós-colheita, e por influência de condições químicas da matriz, umidade, temperatura e pH (Belli, 2004).

Para um metabólito secundário ser definido como micotoxina ficou estabelecido que deve satisfazer os seguintes critérios: ser causadora de doença em animais ou homens, ocorrer

na natureza, ser produzida por fungos e ser aguda ou cronicamente tóxica (PASTORE; MACEDO, 2004).

O desenvolvimento de fungos no alimento não implica na presença de micotoxinas no substrato, assim como a ausência de sinais aparentes de contaminação por fungos não significa que o alimento encontra-se livre de toxinas, uma vez que elas podem permanecer no produto mesmo depois do desaparecimento dos fungos responsáveis por sua produção (SABINO, 1996). Para Molinin e Valentini (1999), a maioria das micotoxinas são termoestáveis, resistindo a determinados tratamentos térmicos ou processos de desidratação que são suficientes para destruir o micélio vegetativo dos fungos que as produziram.

Devido à elevada toxicidade, a exposição do homem ao consumo de alimentos é questão de saúde pública no mundo (CALDAS *et al.*, 2002). Os sinais e sintomas da intoxicação por micotoxinas vão desde lesão na pele, sintomas de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hematotoxicidade, podendo chegar à morte. As micotoxinas podem ainda apresentar efeitos mutagênicos, teratogênicos, carcinogênicos ou imunossupressores (JECFA, 2001).

2.5.2 Micotoxinas

As micotoxinas são substâncias produzidas durante o metabolismo secundário de fungos filamentosos que contaminam os alimentos, são caracterizadas pelas propriedades totóxicas que apresentam aos organismos humano e animal. São sintetizadas sob condições específicas, a maioria das micotoxinas são resistentes a tratamentos físicos e químicos. Entre as micotoxinas mais frequentemente encontradas em alimentos estão as:

- ✓ Aflatoxinas (AFTs): São as micotoxinas mais relatadas em alimentos e com maior risco de toxicidade, classificadas em B1, B2, G1 e G2 (Ardic *et al.*, 2008). A AFLB1 é a mais tóxica e considerada como um fator etiológico do câncer hepático sendo por esse motivo classificada com o status de grupo 1 ou seja potencialmente carcinogênica (IARC, International Agency for Research on Cancer, 1993). A contaminação por AFT é um problema particular em grande variedade de produtos alimentares, incluindo o milho, sementes oleaginosas, especiarias, amendoim, nozes, leite (na forma de metabólito da AFT B1 AFT M1) e frutas secas (IARC, 1993). Estes metabólitos são produzidas principalmente por fungos do gênero *Aspergillus* estando entre os mais frequentes as espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.
- ✓ Ocratoxina A: já foi detectada em muitos alimentos, sendo mais comum em alimentos vegetais secos e armazenados (como milho, cevada, amendoim, café, soja, trigo,

centeio, arroz e outros), onde encontram um substrato altamente nutritivo para seu desenvolvimento (FAO, 2001; SILVA *et al.*, 2007; GOLLUCKE e TAVARES, 2004). É considerada uma nefrotoxina os efeitos principais são necrose do epitélio tubular renal, foi associada a nefropatia endêmica dos Balcãs, doença caracterizada por progressiva redução das funções renais em humanos (ROSSIELO *et al.* 2008). Em estudos com animais, tem demonstrado efeitos carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos (PALMA *et al.* 2007;ROSSIELO *et al.* 2008).

- ✓ Citrinina (CIT): É um metabólito produzido principalmente por fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* sendo a espécie *Penicillium citrinum* uma das maiores produtoras. Os alimentos mais envolvidos são milho, arroz, trigo e outros cereais, queijo e frutas apodrecidas (COMERIO *et. al.*,1998; ABRAMSON *et. al.*, 1999; JANARDHANA *et. al.*,1999). A CIT é uma micotoxina extremamente importante no ponto de vista toxicológico, pois pode ser ingerida por animais e pelo homem e causar problemas crônicos relacionados com danos hepáticos e renais (KNASMULLER *et* , 2004), há relatos de que esta toxina .
- ✓ Patulina (PAT): É uma micotoxina produzida por algumas espécies de fungo dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Byssoclamys*. Os alimentos envolvidos são sucos de frutas, frutas *in natura* entre elas a maçã é muito relatada, além destes alimentos também se encontram em produtos agrícolas. Está relacionada a danos neurológicos, renais e hepáticos (Welke, 2008). Em estudo *in vivo* a Patulina se mostrou capaz de inativar algumas enzimas, entre elas estavam as polimerases o ácido ribonucleico e o ácido desoxirribonucleico. Isso também afeta a transcrição e a tradução causando um efeito direto no DNA (Riley, Showker, 1991).

2.5.3 Fungos e micotoxinas em farinha de mandioca

Em estudos realizados com farinha de mandioca foram encontrados relatos de maior frequência dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, fungos altamente toxigênicos (KRAEMER, 1998; LEMOS, 2001; CASTILLO, 2004; GOMES, 2007).

Alguns fungos toxigênicos tem sido isolados durante a estocagem de farinha de mandioca dentre eles estão: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus versicolor* e *Penicillium spp.* (Clerk *et al.* 1968; Shank *et al.* 1972, ...). Santos *et al.* (2012), ao realizarem a investigação da microbiota presente na farinha de mandioca, identificaram a presença de fungos micotoxigênicos, é importante considerar o risco associado à presença de fungos toxigênicos na farinha de mandioca.

No que se refere as micotoxinas estudo realizado por Ibeth et al (1991) e Ediage et al. (2011) foram encontradas em amostras de farinha de mandioca, respectivamente, AFL B1, AFL G1 e AFL B1, AFL B2, Zealeraona, diacetoxiscirpenol.

Ressalta-se que são escassos os estudos envolvendo a farinha de mandioca na investigação de fungos e micotoxinas (Essano et al, 2007).

2.6 Identificação de Fungos

2.6.1. Identificação de fungos pela Taxonomia tradicional

É denominado de método convencional, onde de acordo com o método padronizado onde são utilizadas características de colônias do fungo em questão (características macroscópicas) e características microscópicas que são analisadas em microscópios óticos.

É importante considerar que este método possui limitações, pois há espécies de fungos com características muito próximas uma da outra, que se confundem com muita facilidade e nesses casos os erros podem acontecer. Por esses motivos tanto o auxílio da microscopia eletrônica quanto a utilização de métodos moleculares são de fundamental importância.

2.6.1.1. Microscopia de Varredura como auxílio para taxonomia tradicional

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma importante ferramenta para estudo de caracteres morfológicos em fungos de diferentes espécies. A morfometria das estruturas é facilitada utilizando-se a MEV, pois é uma técnica que permite maior segurança e precisão dos resultados.

Esta técnica consiste em uma coluna óptica, um sistema de vácuo e um sistema eletrônico.

Para a preparação das amostras se faz necessário à desidratação; as amostras não condutoras necessitam de cobertura com uma camada condutora, que normalmente pode ser de ouro ou carbono (WELTON, 1984). A microscopia eletrônica oferece maior resolução, maior aumento, maior profundidade de campo e maior versatilidade que a microscopia óptica. No seu funcionamento onda e partícula, podem ser aplicados tanto para a luz quanto para elétrons: então a luz pode ser descrita, em termos de fótons, como uma radiação de comprimento de onda de 400 a 700 nm, enquanto que os elétrons podem ser considerados uma radiação com comprimento de onda usual em microscopia, de 0,001 a 0,01 nm. O comprimento de onda do elétron depende da voltagem aplicada no filamento de tungstênio. Geralmente aplica-se uma voltagem de 15 KV (GOODHEW e HUMPHREYS, 1988). A

Microscopia Eletrônica de Varredura permite diferenciar estruturas morfológicas que às vezes são muito parecidas e difíceis de serem detectadas em Microscópio óptico. Trata-se de um método importante para diferenciar estruturas morfológicas e para auxiliar na diferenciação entre as espécies.

2.6.2. Identificação de fungos pela PCR

Técnicas baseadas na análise molecular tem sido utilizadas com êxito na identificação de espécies fúngicas

A reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) permite a amplificação de segmentos específicos a partir de segmentos de DNA. O resultado da PCR pode ser observado por eletroforese, onde os produtos da PCR são separados por tamanho de fragmento em géis de agarose. A reação de PCR ocorre pela desnaturação inicial da dupla fita de DNA e anelamento do primer, oligonucleotídeos com aproximadamente 20 a 30 pb que anelam em regiões alvo do DNA. Após o anelamento do primer, ocorre a síntese do fragmento pela ação da DNA polimerase. O produto da PCR (Polymerase Chain Reaction) é sintetizado exponencialmente nos seguintes ciclos repetitivos da reação.

2.7. A Espectrometria de Massas

O espectrômetro de massas é um instrumento que permite determinar a massa molar de compostos eletricamente carregados, ou íons previamente Formados. Estes íons são selecionados de acordo com a razão massa-carga (m/z), sendo m a massa em u (massa atômica unificada), definida como $1/12$ da massa de um átomo do isótopo de ^{12}C , o qual foi designado como $12 u$ por convenção.

As técnicas avançadas em espectrometria de massas diferem principalmente no modo de ionização das amostras, como EI (electron ionization) e que é o método de ionização mais comum em espectrometria de massas, não só ioniza as moléculas pela retirada de um elétron, mas também transfere energia suficiente para que estas moléculas ionizadas se fragmentem. Com o surgimento de novas técnicas de ionização a partir da década de 80, a ionização por ESI-MS (Electrospray Ionization Mass Spectrometry) e a ionização por MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) – estendeu a espectrometria de massas à quase todos os tipos de moléculas. Tanto ESI como MALDI são técnicas brandas de ionização, o que resulta na formação de íons com baixa energia, tornando possível a ionização desde moléculas de baixa massa molecular até biomoléculas com massas de acima 1 milhão de Daltons

2.7.1. MALDI TOF na identificação de micotoxinas

MALDI- TOF – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – técnica de ionização sob vácuo foi introduzida por Hillenkamp et al. em 1985. Esta técnica consiste em solubilizar o composto a ser ionizado em uma solução contendo moléculas orgânicas, conhecidas como matriz, que geralmente é um ácido orgânico aromático formando uma mistura sólida. Um pequeno volume desta mistura é depositada em uma placa metálica que conduz corrente elétrica (energia). A placa é introduzida no sistema, sob vácuo, onde laser assistido de comprimento de onda específico, geralmente na região do UV, incide sobre o cristal. As moléculas são “desorvidas” da placa por evaporação, ocorrendo a formação de uma fase gasosa, altamente energética, atribuída a excitação eletrônica da molécula da matriz ao absorver a energia do laser. A formação dos íons ocorre através da transferência de cargas, por exemplo, transferência de prótons das moléculas da matriz para o composto. Os íons formados recebem uma alta Energia Cinética inicial que os impulsiona para o analisador de massas Time-of-Flight (TOF), onde são separados de acordo com o tempo de voo. Os compostos são separados no analisador de acordo com sua m/z .

A vantagem desse método está na sua grande especificidade e pela fácil interpretação dos espectros gerados. Marques (2006) utilizou técnicas avançadas de espectrometria de massas, (MALDI-TOF e ESI-MS) na análise de micotoxinas em alimentos. A técnica MALDI-TOF mostrou excelente desempenho nas análises de aflatoxinas e ocratoxina A.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a presença de fungos e micotoxinas em farinha de mandioca (seca, mista e d'água) produzidas na região de Coari, Amazonas.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar os aspectos físico-químicos da farinha de mandioca: Umidade e Atividade de água e acidez;
- ✓ Identificar espécies de fungos presentes na farinha de mandioca pela taxonomia tradicional com auxílio da Microscopia eletrônica de varredura;
- ✓ Detectar a espécie de fungos micotoxigênico pela taxonomia tradicional e biologia molecular;
- ✓ Identificar presença de micotoxinas;

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

Foram coletadas 30 amostras de farinha de mandioca obtidas de diferentes produtores na feira Rural Belarmino Albuquerque de Coari-AM. Antes da coleta foi feito o registro da variedade utilizada como matéria-prima pelo produtor e a identificação da unidade rural, onde a farinha de mandioca foi processada.

As amostras foram armazenadas em sacos plásticos estéreis e transportadas até Manaus - AM via transporte aéreo, para a realização das análises no período entre 30 e 90 dias.

4.2 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas no laboratório de bromatologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) com o intuito de caracterizar aspectos físico-químicos da farinha de mandioca que possam influenciar o potencial toxicológico do produto: umidade e atividade de água.

4.2.1 Umidade

O teor de umidade das farinhas foi determinado nas trinta amostras em duplicata utilizando a metodologia proposta por AOAC (2005).

Foi utilizada estufa com circulação de ar a 105° até peso constante.

4.2.2 Atividade de água

Foram analisadas as determinações da atividade de água das trinta amostras de farinha de mandioca em duplicata. Para a análise foi utilizado o aparelho AquaLab, digital, modelo CX-2, fabricado pela DECAGON, acoplado a um banho termostático controlado na temperatura de 25°C. As análises foram realizadas após 30 dias de armazenamento em local arejado.

4.3 Isolamento, purificação e detecção de fungos na cultura de farinha de mandioca

Foram realizadas no laboratório de micologia do Instituto Leônidas e Maria Diana ILMDFIOCRUZ, com o intuito de identificar a nível de espécie os fungos micotoxigênicos presentes nas amostras de farinha de mandioca.

4.3.1 Processamento da amostra e isolamento dos fungos

As embalagens de farinha foram submetidas a desinfecção externa, utilizando álcool a 70% embebido em algodão hidrófilo. Seguido a esse procedimento, cada amostra de farinha de mandioca foi retirada 10 g para ser adicionado em 90 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}). A partir desta diluição foram preparadas diluições sucessivas decimais até obtenção da diluição 10^{-4} . Todas as diluições foram homogenizadas em shaker orbital, durante cinco minutos.

Da última diluição (10^{-4}) retirou-se 0,2 μ L para ser semeado, em triplicata, na superfície de ágar Glicerol Dicloran (DG18%). As placas devidamente semeadas ficaram armazenadas em estufas (BOD) a temperatura 28°C. O crescimento dos fungos foi observado a cada 24 horas durante 7 (sete) dias. O quantitativo de unidade formadoras de colônias (UFC) foi determinado por grama de produto.

4.3.2 Purificação das colônias oriundas do isolamento primário

Após o isolamento primário, as colônias foram submetidas à purificação em tubos de ensaio contendo meio de cultura ágar malte (MEA). Estas repicadas, centralmente, na superfície do meio MEA.

4.3.3 Microcultivo

As amostras de fungos foram inoculadas em placas, contendo o meio de cultura ágar malte, em três pontos equidistantes. Da mesma placa um cubo de aproximadamente 1cm³ do meio de cultura foi cortado e na sua superfície foi inoculada a amostra, posteriormente o cubo foi coberto por uma lamínula e a placa incubada em uma estufa a 28°C por 7 dias. Após o tempo determinado a lamínula foi retirada para o preparo de uma lâmina e observada em microscópio ótico (KERN *et al.* 1999).

4.3.4 Identificação dos fungos em nível de espécie

As amostras fúngicas foram identificadas em nível de espécie, baseando-se nas características morfológicas, forma de reprodução e teste fisiológicos em cultivos obtidos em meios seletivos, segundo Domsch et al. (1980). As culturas puras foram conservadas em água destilada esterilizada (CASTELANI, 1967).

4.3.5 Potencial toxigênicos

4.3.5.1 Detecção de micotoxina em meio sólido

As análises para se detectar a produção de metabólitos secundários extracelulares foram realizadas em ágar coco (BIZZETTO *et al.*, 1997), semeando-se fragmento de cultura pura, centralmente na superfície do meio sólido contido em placa de petri. As placas foram encubadas por 4 dias a 28°C., e o verso e reverso da colônia serão observados a cada 24 horas. Será observada a alteração da cor no meio de cultura. Para avaliação da presença de micotoxinas, as colônias foram examinadas visualmente sob luz ultravioleta (UV) em 365 nm, observando a fluorescência produzida. Fragmentos dos fungos foram transferidos para o meio ágar extrato de levedura sacarose (YES) e incubados a 28°C durante sete dias, em seguida foi utilizado vapor de amônia (25%) e observada mudança de coloração rosa intenso no reverso da colônia que indica resultado positivo, segundo Saito e Machida (1999). Somente os fungos positivos para produção de micotoxina pelos métodos ágar coco e vapor de amônia foram considerados fungos toxigênicos e submetidos à extração, amplificação e sequenciamento de DNA para identificação molecular.

4.4 Microscopia eletrônica de varredura

Entre os fungos identificados como toxigênicos, duas espécies do gênero *Aspergillus* e uma do gênero *Penicillium* foram submetidas a microscopia eletrônica de varredura.

O cultivo dos fungos isolados foi realizado em ágar malte (MEA) e incubados a 25°C por cinco dias. Foi utilizado o método tradicional, e o exame do material foi realizado por microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 250.

4.4.1 Fixação do material

Para a fixação do material foi utilizado fixador com glutaraldeído por 3 horas. A lavagem em tampão compatível com o fixador, (Cacodilato de sódio ou Fosfato) pH 7,2 (3 lavagens) por 15 min cada; e a impregnação em OsO₄ ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,2M por 1 hora. Para realização da lavagem utilizou-se tampão (Cacodilato ou Fosfato de sódio) realizando-se 3 lavagens por 15 min. cada.

4.4.2 Limpeza do Material

A limpeza foi realizada por 5 minutos no ultrassom com veja limpeza pesada e quatro banhos de 3 min. cada em água destilada no ultrasson. Para o controle da limpeza monitorar na lupa e repetir o procedimento se necessário.

4.4.3 Desidratação

Foi utilizada a desidratação em série etanólica de concentração crescente onde realizou-se em álcool a 15,30, 50, 70 , 95 e 100 % por 15 min. cada e com uma repetição em cada fase exceto a concentração de 100 que foi realizada três repetições.

4.4.4 Secagem, montagem e exame do material

A secagem através do método de ponto critico, utilizando o dióxido de carbono(CO₂) como fluido de transição;

Montagem do material sobre Stubs utilizando- se fita adesiva dupla – face e/ou cola de prata. A cobertura com banho de ouro, usando o sistema de *sputtering* e o exame do material foi realizado utilizando o microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 250.

4.5 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

Os fungos classificados como toxigênicos pelos métodos ágar coco e (YES) foram submetidas à identificação pela biologia molecular.

4.5.1 Extração do DNA

Após o período de cultivo em MEA foi preparada uma suspensão de esporos de cada fungo isolado e a extração de DNA utilizando kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen[®]) segundo instruções do fabricante.

4.5.2 Amplificação da região β -tubulina pela Reação em Cadeia Polimerase (PCR)

A PCR foi realizada em mix de 25 μ l contendo: 1,0 μ L de MgCl₂ (50 mM), 0,5 μ L de dNTP (10 mM), 2,5 μ L de tampão da Taq 10X, 0,3 da Taq DNA Polimerase (5 U/ μ L) (Platium), 2 μ L de mix de iniciadores senso e anti-senso (5 μ M) e 2 μ L de DNA. Parte do gene β -tubulina foi amplificado utilizando os iniciadores Bt2a (5'GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC3') e Bt2b (5'ACCCTCAGTGTAGTGACCGGC3') (Hubka e Kolarik, 2012). Os ciclos da PCR foram: desnaturação inicial 94 °C por 5 min., seguidos de 30 ciclos de 94 °C à 30 seg.

(desnaturação), 62 °C a 1 min. (hibridização) e 72 °C em 2 min. (polimerização), finalizando com 72 °C de polimerização final e resfriadas a 4 °C.

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X (Tris-Borato EDTA) (Sambrook et al., 1989), marcados com Gelred (Biotium) visível a luz UV.

4.5.3 Sequenciamento dos produtos da PCR

Os produtos da PCR foram purificados pela metodologia da precipitação de polietilenoglicol 20% (PEG). O sequenciamento foi realizado utilizando Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em sequenciador ABI-3130. As sequencias foram editadas e analisadas usando o software Geneious com base no banco de dados públicos do GeneBank.

4.6 Identificação de micotoxinas por MALDI-TOF MS

Para a extração das micotoxinas foram transferidos 5 g de amostra para frascos de vidro ambar e adicionados 5 mL de metanol. Os frascos foram agitados por 60 min., sonicados por 5 min. e deixado em repouso por 60 min. O sobrenadante foi transferido para frasco ambar e o solvente evaporado. O extrato de cada amostra foi misturado a 1 µL da solução matrix (75 mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) em etanol/água/acetonitrila [1:1:1] com 0,03% de ácido trifluoroacético (TFA)), e deixou-se secar a temperatura ambiente (Marques, 2006). O equipamento utilizado foi MALDI TOF Autoflex III espectrometro de massa (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A variação de massa analisada foi até 2 000 Da usando modo linear com pulso de 104 ns em uma voltagem de +20 kV, e o laser Nd:YAG (*neodymium-doped yttrium aluminium garnet*; Nd:Y₃Al₅O₁₂) of 1064nm ajustado em uma potência de 66%. Os espectros brutos foram divididos em 4 intervalos do mesmo tamanho (500 Da cada). Os espectros foram interpretados conforme a massa molecular das micotoxinas investigadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Umidade e atividade de água

O teor médio e variação (mínima-máxima) da umidade nas amostras analisadas foram de 9,61% e 7,08-13,55%, respectivamente. Os resultados evidenciaram que 6,7% das amostras apresentaram valores máximos de umidade, em desacordo com a legislação brasileira, que estabelece 13% como valor máximo permitido (ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2001). Os resultados diferem de um estudo realizado em amostras de farinha na Bahia, onde os valores de umidade variaram de 4,93 a 9,33% (Santos et al., 2012). Souza et al. (2008) analisaram 18 amostras de farinhas de mandioca produzidas no município de Cruzeiro do Sul, Acre - Brasil, e obtiveram valores de umidade entre 8,10 a 12,02%.

Percebe-se que os valores máximos encontrados no presente estudo se assemelham ao de Souza et al., isso provavelmente ocorreu pela pesquisa ser conduzida na região com mesmas condições de temperatura e umidade deste estudo, ambos Estados se localizam na Região Norte, diferente do trabalho de Santos que foi realizado na região Nordeste com condições ambientais diferenciadas.

Os teores de (a_w) nas amostras analisadas apresentaram o valor médio de 0,52 e variação mínima-máxima de 0,69-0,37. Pitt e Hocking (2009) descrevem ser necessários teores de (a_w) acima que 0,70 para haver desenvolvimento de fungos, nesse estudo todas as amostras avaliadas apresentaram (a_w) abaixo de 0,70. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Chisté et al. (2006) que ao analisar dez amostras de farinha de mandioca produzidas no Pará, Brasil, encontraram valores entre 0,31 e 0,61.

Apesar dos valores de (a_w) encontrados terem sido inferiores a 0,70, é possível que durante o armazenamento haja elevação desses valores, pois o armazenamento e comercialização da farinha ocorrem em sacos de 50 Kg abertos em contato direto com a umidade relativa do ar, que na Região Norte é superior a 85%.

A avaliação dos teores de umidade e (a_w) tem grande importância em razão da influência na vida de prateleira dos alimentos, pois estão entre os parâmetros mais influentes para o desenvolvimento de fungos e produção de micotoxinas. Segundo Pitt e Hocking (2009) o teor de (a_w) do alimento está intimamente ligada à umidade relativa do ar (UR). O equilíbrio entre a UR e a a_w é algo esperado, o que pode favorecer o desenvolvimento de fungos durante o armazenamento. Ao avaliar a alteração da (a_w) em amostras de farinha de mandioca foi

observado aumento de até 24,84% em amostras obtidas de supermercados à temperatura ambiente, por um período de até 180 dias (Ferreira Neto et al., 2005).

5.2. Identificação da micobiota

Entre as 30 amostras de farinha de mandioca estudadas, 9 (30%) apresentaram fungos. A identificação à nível de gênero evidenciou a presença de 15 isolados de *Aspergillus* (27,8%), 34 isolados de *Penicillium* (63%) e 5 isolados de *Acremonium* (9,2%) (Tabela 1). A variação (mínima-máxima) da contagem de fungos nas amostras foi 2,0-25,0 UFC.g⁻¹.

Tabela 1: Fungos isolados de amostras de farinha de mandioca produzidas no município de Coari, Amazonas, Brasil.

Amostras*	**UFC.g ⁻¹	<i>Aspergillus spp</i>	<i>Penicilium spp</i>	<i>Acremonium spp</i>
A1	5	0	5	0
A2	6	0	5	1
A3	5	0	3	2
A4	2	0	0	2
A6	2	0	2	0
A7	4	1	3	0
A15	25	12	13	0
A20	3	1	2	0
A30	2	1	1	0

*09 amostras positivas em 30 amostras analisadas.

** UFC: Unidades formadoras de colônia

Pontes (2012) ao verificar a micobiota de amostras de farinha de mandioca comercializada em São Paulo - Brasil identificou contaminação em 66,8% das amostras, este resultado apresenta maior número de amostras contaminadas quando comparada ao presente estudo.

A presença dos fungos filamentosos na farinha de mandioca pode ser explicada pelos seguintes fatores: (a) a influência do ambiente, pois a região amazônica apresenta condições muito favoráveis para o crescimento, como UR > 80% e temperaturas elevadas, ou seja, >30°C (Oliveira e Rebouças, 2008); (b) pelo processamento ocorrer de forma rudimentar e muitas vezes sem conhecimento sobre boas práticas de higiene (Chisté et al., 2006); (c) armazenamento inadequado e possível exposição prolongada do alimento ao ar atmosférico (Ferreira Neto et. al, 2004). Alhadas et al. (2004) relatam que os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* são predominantemente encontrados em armazéns, moinhos e locais onde são processados produtos agrícolas.

Os valores encontrados neste estudo não ultrapassam os estabelecidos pela legislação brasileira vigente para bolores e leveduras, com máximo de 10⁴ UFC.g⁻¹. Porém, a presença de fungos filamentosos é preocupante uma vez que podem ser potencialmente produtores de

micotoxinas (Pitt e Hocking, 2009). Os resultados encontrados neste estudo corroboram com os trabalhos realizados por outros autores, que ao investigarem a micobiota de farinha de mandioca identificaram como predominantes os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* (Kremer e Stussi, 1998; Lemos et al., 2001; Gomes et al. 2007). Lemos et al. (2001) Relatam que os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os mais prováveis de serem encontrados em farinha de mandioca por serem considerados xerofílicos.

Ao realizar a identificação das espécies fúngicas presentes nas amostras da farinha pela taxonomia tradicional, foram obtidos os seguintes resultados em ordem decrescente de frequência: *Penicillium waksmanii* 14 (25,9%), *Aspergillus flavus* 13 (24,2%), *Penicillium citrinum* 11 (20,5%), *Penicilium melinii* 3 (5,6%), *Penicilium bilaii* 2 (3,7%), *Penicilium janthinelum* 1 (1,8%), *Penicilium janczewskii* 1 (1,8%), *Penicilium miczynskii* 1 (1,8%), *Penicillium variabile* 1 (1,8%), *Aspergillus japonicus* 1 (1,8%), *Aspergillus sp.* 1 (1,8%) e outros 5 (9,3%). A tabela 2 demonstra a frequência de fungos por amostra de farinha de mandioca.

Tabela 2: Frequência relativa (%) dos principais fungos isolados de amostras de farinha de mandioca produzidas no município de Coari, Amazonas, Brasil.

Amostras de Farinha	Fungal Species								
	<i>A. flavus</i>	<i>A. amoenu s</i>	<i>P. Bilai</i>	<i>P. waksmanii</i>	<i>P. miczynsk ii</i>	<i>P. citrinu m</i>	<i>P. variabl e</i>	<i>P. melini</i>	<i>P. janthinelu</i>
S1	0	0	0	60	0	20	20	0	0
S2	0	0	0	0	0	25	0	25	50
S3	0	0	0	33	0	67	0	0	0
S4	0	0	0	0	0	100	0	0	0
S6	0	0	50	50	0	0	0	0	0
S7	0	0	0	0	33	33	0	33	0
S15	46	4	0	42	4	4	0	0	0
S20	50	0	0	0	0	50	0	0	0
S30	67	0	0	0	0	33	0	0	0

Lemos et al. (2001) identificaram a presença de *A. flavus* em 10% de amostras de farinha de mandioca coletadas em Goiás-GO, além desta espécie encontraram também *A. niger*, *A. terreos* e *A. fumigatus*. Gnonlonfin (2012) ao analisar 60 amostras de mandioca chips encontrou *Aspergillus flavus* em 54 das amostras analisadas. Este estudo se assemelha com os descritos acima por também encontrar *Aspergillus flavus* em amostras analisadas. Porém outros estudos envolvendo a micobiota de farinha de mandioca são necessários para melhor discussão, pois o número de estudos envolvendo esse alimento e sua micobiota são escassos.

Entre os fungos isolados, 10 (18,5%) foram classificados como toxigênicos e identificados pela biologia molecular, sendo constatadas as seguintes espécies: *Aspergillus flavus* 2 (20%), *Aspergillus amoenus* 1 (10%) e *Penicillium citrinum* 7 (70%) (Tabela 3).

Entre as espécies isoladas da farinha de mandioca e identificada como toxigênica o *Penicillium citrinum* é muito relatada como produtora de citrinina em alimentos diversificados (xxxx). Em relação a *Aspergillus flavus* é frequentemente encontrado em alimentos e considerada a principal espécie produtora de aflatoxinas sobretudo a AFLB1 e AFLB2, há grande atenção dada a esta toxina pelo seu efeito tóxico em animais e seres humanos. Dentre as espécies pertencentes à seção versicolor apenas o *Aspergillus versicolor* foi encontrado descrito por Wareing et al. (2001) como fungo presente em produto seco da mandioca e Clerk e Caurie (1968) encontrou em farinha de mandioca. Este fungo foi também relatado como produtor da micotoxina esterigmatocistina encontrado em 10 de 49 amostras de derivado seco da mandioca (Wareing et al., 2001). Porém no presente estudo não foi encontrado *Aspergillus versicolor*, mas uma espécie pertencente a mesma seção, o *Aspergillus amoenus* que apresentou evidências de micotoxinas nas duas metodologias utilizadas nesse estudo, tal resultado conflita com a literatura que considera este fungo como não produtor de toxina.

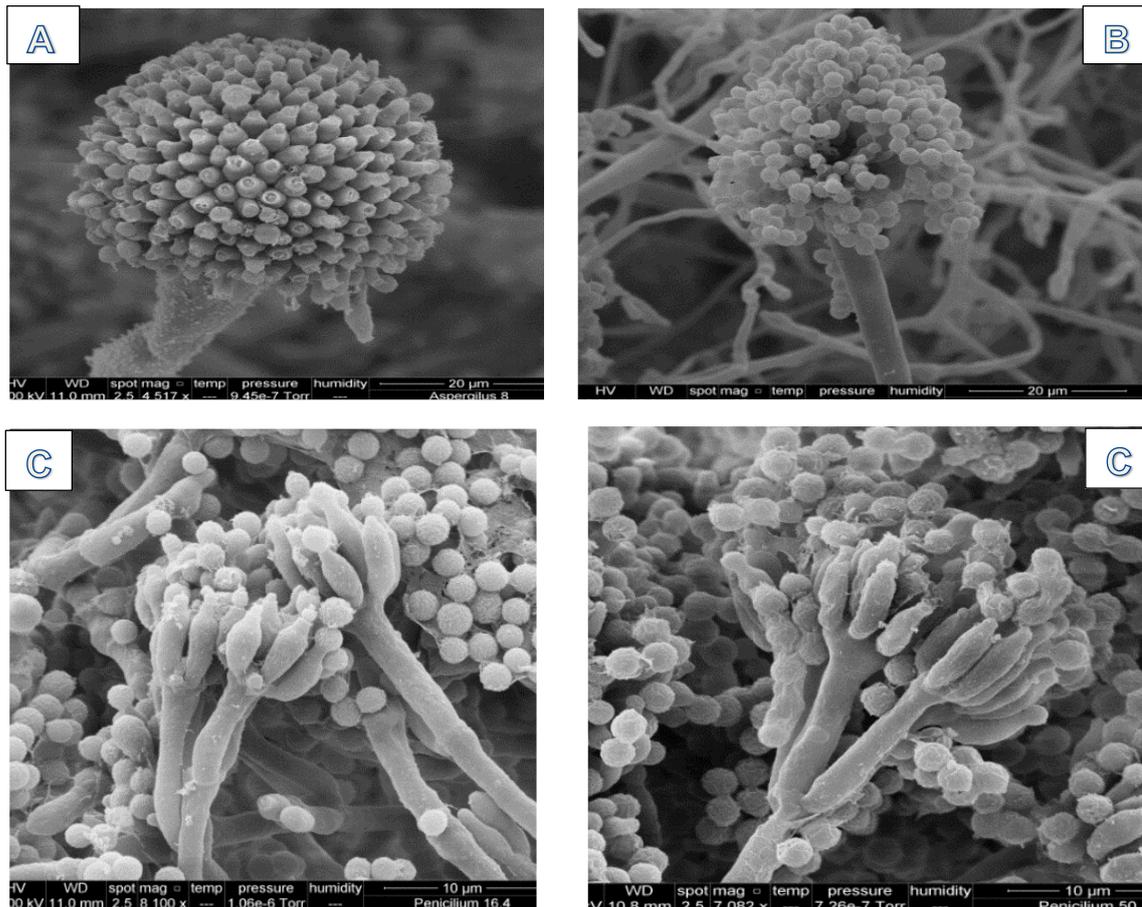
Tabela 3: Espécies identificadas pela taxonomia tradicional e biologia molecular

Número da Amostra	Taxonomia tradicional	Identificação pela B tubulina	Número no Genebank
F1510	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	KJ136090.1
F1520	<i>Apergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	KJ136096.1
F1501	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Aspergillus amoenus</i>	JN853944.1
F103	<i>Penicillium Citrinium</i>	<i>Penicillium Citrinium</i>	KC345003.1
F107	<i>Penicillium Citrinium</i>	<i>Penicillium Citrinium</i>	KC345001.1
F462	<i>Penicillium Citrinium</i>	<i>Penicillium Citrinium</i>	JX141014.1
F261	<i>Penicillium Citrinium</i>	<i>Penicillium Citrinium</i>	JX141013.1
F2050	<i>Penicillium Citrinium</i>	<i>Penicillium Citrinium</i>	KC345001.1
F309	<i>Penicillium Citrinium</i>	<i>Penicillium Citrinium</i>	KC345003.1
F3011	<i>Penicillium Citrinium</i>	<i>Penicillium Citrinium</i>	JX141012.1

As imagens das estruturas morfológicas foram obtidas pela microscopia eletrônica de varredura. A figura 2 apresenta os detalhes das estruturas de três fungos considerados toxigênicos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus amoenus*, *Penicillium citrinum*. Dentre as espécies identificadas pela taxonomia tradicional uma do gênero *Aspergillus* não foi possível identificar, pois a estrutura morfológica não apresentou visibilidade necessária, na microscopia de varredura as estruturas são mais evidentes, facilitando a identificação, pois

evidencia detalhes das estruturas morfológicas como: conidióforos, metula e conídios. Esta é uma técnica considerada como importante coadjuvante na identificação dos fungos pela taxonomia tradicional (Martinelli e Santos, 2006).

Figura 8: Estruturas morfológicas evidenciadas por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura A) *Aspergillus flavus* B) *Aspergillus amoenos* C) *Penicillium citrinum*



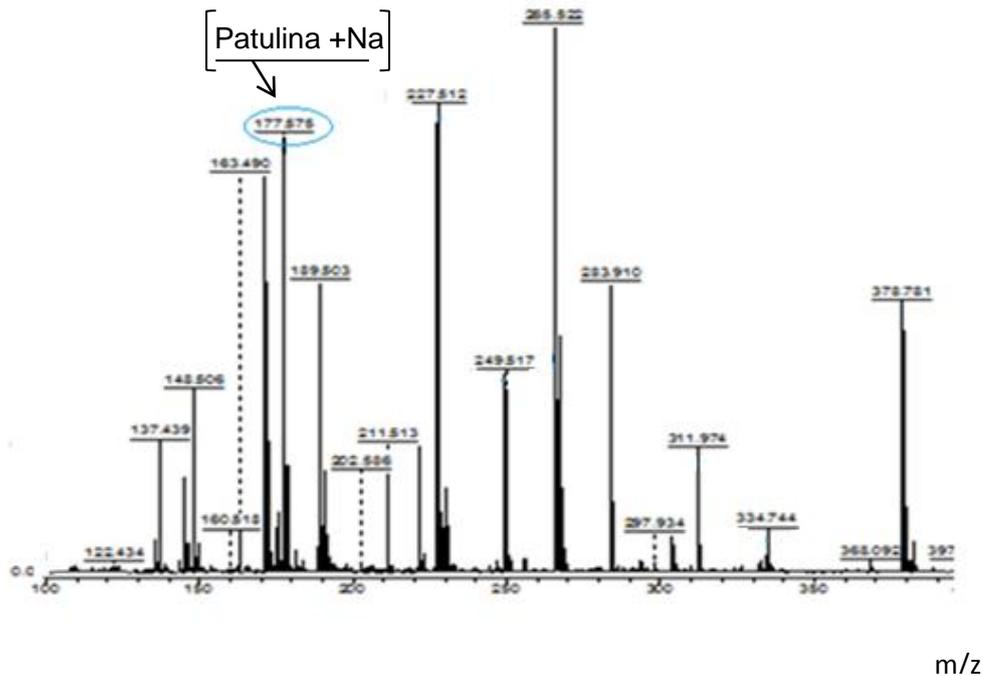
Quanto aos fungos identificados como micotoxigênicos, dentre os 15 fungos do gênero *Aspergillus* isolados, apenas 3 (20%) se mostraram potencialmente toxigênicos e entre os 34 isolados do gênero *Penicillium* 7 (20,6%) apresentaram o mesmo potencial pelas metodologias analisadas (Ágar coco e YES). Kremer e Stussi (1998) ao pesquisarem fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus* por meio do ágar coco, identificaram que 14,9% positivas.

5.3. Detecção de micotoxinas

Foram detectados espectros com m/z referentes às micotoxinas, a seus valores protonados (massa da micotoxina + H⁺) e a cationização com os íons Na⁺ (m/z = 32) e K⁺

($m/z = 39$) formando íons denominados adutos. Foram identificadas m/z referente as seguintes micotoxinas: patulina ($m/z 154+23=177$) (Figura 3), citrinina ($m/z 250+39= 289$), AFL B₁ ($m/z 312+23 =335$), AFL B₂ ($m/z 314+23= 337$) e AFL G₁ ($m/z 330+39=368$).

Figura 9: Espectros de massa obtido por MALDI-TOF MS indicando massa referente molécula de Patulina adicionada de um íon Na⁺ (177,979).



Nas amostras avaliadas, as micotoxinas mais frequentes foram: patulina, AFLB₁ e citrinina, descritas na Tabela 5. Ibeh et al. (1991) ao utilizarem métodos cromatográficos para analisar presença de AFLs em farinha de mandioca adquiridas em diferentes pontos de venda em Benin (Nigéria), constataram que 40% das amostras estavam contaminadas com AFL B₁ e AFLG₁. Ediage et al. (2011) ao pesquisarem presença de micotoxinas em amostras de farinha de mandioca pelo método LC-MS/MS encontraram AFLs B₁ e B₂, zearalenona, diacetoxiscirpenol e beauvericina. Os resultados do presente estudo se assemelham aos citados apenas pela presença de AFLs B₁ e B₂, presentes em 86,7% e 3,3% das amostras analisadas respectivamente.

Este é um dado preocupante uma vez que a AFLB₁ é considerada o mais potente hepatocarcinogênico natural (IARC, 1993), e a farinha de mandioca um dos alimentos mais consumidos na Região Norte e pode ser uma das causas de câncer hepático na região.

Santos e Silva (2010) relatam que dentre as micotoxinas a aflatoxina B1 é a mais frequente em alimentos.

As AFL são consideradas as mais perigosas pela frequência em que são encontradas em alimentos, e podem causar sérios danos hepáticos, dentre eles necrose hemorrágica (Volkler et al. 2011). A Região Norte brasileira apresenta elevado consumo de farinha de mandioca, que caso esteja contaminada por micotoxinas poderia influenciar nos índices de câncer de fígado da população da região.

Tabela 4: Micotoxinas identificadas em amostras de farinha de mandioca conforme os espectros gerados em MALDI TOF.

Amostras	Micotoxinas					
	Citrinina	Patulina	AFL B1	AFL B2	AFL G1	AFL G2
S1	X	X	X	ND	X	ND
S2	X	ND	ND	ND	X	ND
S3	X	X	X	ND	ND	ND
S4	X	X	X	X	X	X
S5	X	X	X	ND	ND	ND
S6	X	X	ND	ND	ND	ND
S7	X	X	X	ND	ND	ND
S8	X	X	X	ND	ND	ND
S9	X	X	X	ND	ND	ND
S10	ND	X	X	ND	ND	ND
S11	ND	X	X	ND	ND	ND
S12	X	X	X	ND	ND	ND
S13	X	X	X	ND	ND	ND
S14	X	X	X	ND	ND	ND
S15	X	X	X	ND	ND	ND
S16	X	X	X	ND	ND	ND
S17	X	X	X	ND	ND	ND
S18	X	X	X	ND	ND	ND
S19	ND	X	X	ND	ND	ND
S20	X	X	X	ND	ND	ND
S21	X	X	X	ND	ND	ND
S22	X	X	X	ND	ND	ND
S23	X	X	X	ND	ND	ND
S24	X	ND	X	ND	ND	ND
S25	X	ND	X	ND	ND	ND
S26	X	X	X	ND	ND	ND
S27	X	X	X	ND	ND	ND
S28	X	X	X	ND	ND	X
S29	X	X	ND	ND	ND	ND
S30	X	ND	ND	ND	ND	ND

X = Presença de micotoxina; ND: Não detectado.

6. CONCLUSÃO

A microbiota das amostras de farinha de mandioca produzida em Coari, Amazonas, Brasil apresentou-se composta principalmente por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e entre as espécies encontradas como toxigênicas estão *Penicillium citrinum*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus amoenus*.

Fatores que estão relacionados com este resultado são o armazenamento inadequado e/ou prolongado do produto associado ao fato da região amazônica possuir condições ambientais propícias (umidade relativa e temperatura) para o desenvolvimento de fungos toxigênicos e a produção de micotoxinas em farinha de mandioca produzidas na região.

Foi evidenciada m/z equivalente a AFLB1, citrinina e patulina com maior frequência, porém em futuros trabalhos, serão necessários a quantificação dessas micotoxinas, para que haja melhor compreensão do risco associado ao consumo. É necessário mais estudos para relacionar a presença de micotoxinas em farinha de mandioca com os índices de patologias hepáticas na população da Região Norte brasileira.

7. REFERÊNCIAS

- ALLEN, A.C. Cassava biology, production and utilization. **The Origins and taxonomy of cassava**. p.1-16, 2002.
- ALMEIDA, M.A.; SANTOS, E.S. Análise comportamental do agronegócio da mandioca (*Manihot esculenta*) no Brasil de 2004 a 2009. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v.5, n.2, p.441-49, 2011.
- ALMEIDA, P. F.; **Processamento e caracterização da Puba**. Tese de doutorado. Unicamp, Campinas-SP, 1992.
- AMORIM, S.S.; SILVA, C.M.G.; PIRES, R.A.; SANTOS, E.A.; CASTRO, L.; SÁ, T.A. Occurrence of mycotoxins in food and feed in Brazil. In: **Official Program and Abstract Book of the 10 th International IUPAC Symposium on Mycotoxin and Phycotoxin**. São paulo, p. 141, 2000.
- AMUSA, N.A.; ADEGBITE, A.A.; MUHAMMED, S.BAIYEWU, R.A. Yan diseases and its management inNigeria. **African Journal of Biotechnology**, v.12, p.497-502, 2003.
- AOAC International. Association of **Official Analytical Chemists International**. Official Methods of Analysis of AOAC International. Edited by CUNNIFE, P. 18 th ed., 2005.
- ARYEE, F.N.A.; ODURO, I.; ELLIS, W.O.; AFUAKWA, J.J. The physicochemical properties of flour samples from the roots of 31 varieties of cassava. **Food Control**, v.17, p. 916-922, 2006.
- BEZERRA, V.S. Coleta caracterização botânica . e avaliação agronômica de germoplasma de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) obtido em área indígena de Oiapoque no Estado do Amapá. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Alamas, v. 16, n. 2, p. 125-132, Dez. 1997.

BIZZETTO, A.; HOMECHIN, M.; DESTRO, D.; Comparação de substratos utilizados para detecção de toxinas produzidas por *Aspergillus flavus* em soja. **Revista UNIMAR**, v.19, n. 3, p. 709-719, 1997.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução n° 7 de 18 de fevereiro de 2011- Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentows. Disponível em: < [http:// www.brasilsus.com.br/legislacoes/anvisa/107378-7.htm](http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/anvisa/107378-7.htm)> Acesso em 20 de fev. de 2013.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa n°52 de 7 de novembro de 2011**- Dispõe sobre regulamento técnico da farinhademandioca.Disponívelem<<http://de7denovembrwww.ivegetal.com.br/cvegetal/Legislacaoclassificacaovegetal/In52>>

BRESSAN, E.A.;VEASSEY, E.A.; PERONI, N.; FELIPIM, A.P.;SANTOS, M.P. Collecting yam (*Dioscorea spp.*) and sweet potato (*Ipomoea batatas*) germplasm in traditional agriculture small-holdings in the vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. **Plant Genetic Resources Newslattes**, Rome, v. 144, p. 8-13, 2005.

BRUSH, S.B.; CARNEY, H.J.; HUÁMAN, Z. Dynamics of Andean potato agriculture. **Economic Botany**, New York, v.35, p. 70-88, 1981.

CAGNON, J.R.; CEREDA, M.P.; PANTOROTTO, S. Glicosídeos cianogênicos da cassava: biossíntese, distribuição, destoxificação e métodos de dosagem, p. 83-92, 2002.

CALDAS, E. D.; SILVA, S.C.; OLIVEIRA, J. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v.36, n.3, p.319-323, 2002.

CARDOSO, E.M.R, Tradição da produção de farinha de mandioca no Amazonas. In: SOUZA, L. da S.; FARIAS, A. R. N.; MATTOS, P. L. P. de; FUKUDA, W. M. G. (Ed.). Processamento e utilização da mandioca. Brasília,DF: Embrapa Informação Tecnológica; Cruz das Almas: **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical** p. 142-155, 2005.

CARVALHO, L.J.C.B.C. Biodiversidade e Biotecnologia em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), **XI Congresso Brasileiro de Mandioca. Anais.** P 68, 2005.

CASTELANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.42, p.225-226. 1967.

CASTILLO, Teresa Alarcon, **Identificação e caracterização de fungos toxigênicos associados à farinha de mandioca (Manihot sp)**. Dissertação de mestrado, UFAM, Manaus-AM, 2004.

CENI, G.C.; COLET, R.; PERUZZOLO, M.; WITSCHINSK, I.F.; TOMICKI, T.; VALDUGA, E. Avaliação de componentes nutricionais de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), **Revista de Alimentação e Nutrição**, Araraquara, v.20, n.1, p.107-111, 2009.

CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F. Farinhas e derivados.. In: Marney Pascoli Cereda; Olivier Francos Vilpoux. (Org.). Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas. 1ed.Cruz das Almas: **EMBRAPA Mandioca e Fruticultura**, v. 3, p. 576-620, 2003.

CEREDA, M.P.; Novos produtos para farinha de mandioca. XI Congresso Brasileiro de Mandioca. **Anais do XI Congresso Brasileiro de Mandioca** p. 78, 2005.

CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.; Metodologia para divulgação de tecnologia para agroindústria rurais: exemplo do processamento de farinha de mandioca no Maranhão. **Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional**. v.6, n.2, p. 219-250, 2009.

CHARLES, A. L.; SRIROTH, K.; HUANG, T. C. Proximate composition, mineral contents, hydrogen cyanide and phytic acid of 5 cassava genotypes. **Food Chemistry**, 92. 2005.

CHISTÉ, R.C.; OLIVEIRA, K.O.; SARZI. Determinação de cianeto durante as etapas de processamento da farinha de mandioca do grupo seca. **III Seminário de Iniciação Científica da UFPA e IX da Embrapa Amazônia Oriental**, 2005.

CHISTÉ, R.C.; COHEN K.O.; MATHIAS, E.A.; RAMOA JUNIOR A.G.A. Qualidade da farinha de mandioca do grupo seca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.4, p.861-864, 2006.

CHISTÉ, R.C.; COHEN, R.C.; MATHIAS, E.A.; RAMAO JÚNIOR, A.G.A. Estudo das propriedades físico-químicas e microbiológicas no processamento da farinha de mandioca do grupo d' água. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.2, p.265-269, 2007.

CHISTÉ, R.C.; COHEN, K.O. Determinação de Cianeto Total nas farinhas de mandioca do grupo seca e d'água comercializadas na cidade de Belém-PA, **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.2, n.2, p.96-102, 2008.

CHISTÉ, R.C.; COHEN, K.O.; MATHIAS, E.A.; OLIVEIRA, S.S; Quantificação de cianeto total nas etapas de processamento das farinhas de mandioca dos grupos seca e d'água. **Acta Amazônica**, v.40,n.1, p. 221-226, 2010.

CLERK, G.C; CAURIE, M. Biochemical changes caused by some *Aspergillus* species in root tuber of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Tropical Science**, 10, 149-154.

CLEVELAND, D.A; SOLERI, D.; SMITH, S.E. Do folk crop have a role in sustainable agriculture. **BioScience**, Washington, v. 44, n.11, p.740-751, Dez. 1994.

CONCEIÇÃO, R.R.P.; QUEIROZ, V.A.V.; SARAIVA, J.S.C.; ALVES, G.L.O.; FERREIRA, P.; MENDES, S.M.; COSTA, R.V.; Teores de ocratoxina em milho armazenado com palha na região Central de Minas Gerais. **XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo**

CORREA, A. D.; FARIAS. A. R. N.; MATTOS, P. L. P. de. Afiliação: **EMBRAPA-CNPMPF**. Título: Utilização da mandioca e de seus produtos na Alimentação Humana. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p. 221-298, 2005.

CORRÊA, T.B.S.; RODRIGUES, H.R.; VARGAS, E.A.; ASSAD, E.D.; PRADO, G.; COSTA, P.P. Evaluation of the incidence of mycotoxins in Brazilian maize. In: Official Program and Abstract Book of the 10th International IUPAC. Symposium on Micotoxin and Phycotoxin; São Paulo. p. 134, 2000.

CURY, R. **Dinâmica evolutiva e caracterização de germoplasma de mandioca na agricultura de mandioca (*manihot esculenta*, Crantz) na agricultura autóctone**. 1998.

Dissertação (mestrado em Genética) - Escola Superior de Agricultura " Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

CURY, R. **Distribuição de necessidade genética e correlações de caracteres em etnovarietades de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) provenientes da agricultura tradicional do Brasil.** 1998. 168 p. Tese (Doutorado em genética) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

DIAS, L.T., LEONEL, M. Caracterização físico-química de farinha de mandioca de diferentes localidades do Brasil, **Ciência Agrotecnica**, Lavras, v.30, n.4, p. 692-700, 2006.

DOMSCH, K.H.;GAMS, W. ANDERSON, T.H.Compedium of sol fungi. London: Academic Press, v.2, 1980, 859 p.

ÉDEN, M.J. Crop deversity intropical swiddens cultivation: comparative data from colombia and papua new Guinea. **Human Ecology**, New York, v. 21, n.2, p. 127-136, 1993.

ELLIS, W.O.; SMITH, J.P.; SIMPSON, B.K.;OLDHAM, J.H. Aflatoxins in food: occurrence, byosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Food Science of Nutrition*, v.30, n.1, p.120-131, 2001.

EMBRAPA. **Cultivo da Mandioca para Região do Cerrado.** 2006 Disponível em: <http://sistemadeprodução.cnptia.embrapa.br/ fontes htmal/mandioca_cerrados/index.htm> Acesso em 30 jan 2013.

ESSERS, A.J.A.; BOSVELD, M.; GRIFT, R.M.V.;VORAGEN,A.G.J.Assay for the cyanogens content in cassava products and introdection of a new chromogen. **Journal of the Science of Food and Agricultural**, v.63, p. 287-296, 1993.

FAO, 2010,. Food and Agricultural Organization of The United Nations. Disponível em <<http://www.fao.org.br>> Acesso em jan. 2013.

FARALDO, M. I. F.; SILVA, R.M.; ANDO, A.; MARTINS, P.S. Variedade genética de etno variedades de mandioca em regiões geográficas do Brasil. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p 499-505, jul/set. 2000.

FERREIRA NETO, C. Microbiologia de farinhas DE mandioca (*manihot esculenta* Crantz) durante o armazenamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.2, p.551-555, 2004.

FRAIFE FILHO, G. de A.; BAHIA, J. J. S. Mandioca. Disponível em <www.cepeac.gov.br/radar/mandioca.htm> Acesso em 10 dez. 2012.

FRANCO, Guilherme. **Tabela de Composição Química dos Alimentos**. Ed Atheneu, 2002.

FREIRE, F.C.O.; VIEIRA, I.G.P.; GUEDES, M.I.F.; MENDES, F.N.P. Micotoxinas importância na alimentação e saúde humana e animal. **EMBRAPA**, p.24-25, 2007.

FURLANI, R.P.Z.; SOARES, L.M.V. Revisão: Ocratoxina em Café. **Brazilian Journal of food Technology**. v.2, n.1, p. 1-6, 1999.

GNONLONFIN, G.J.B.;HELL, K.; FANDONHAN, P.; SIAME, A.B. Microflora 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, 2007.

GRAZZIOTTO, R.K.; MENEZES, H.C. Efeito da fermentação na qualidade de chips da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.24, n.2, p.170-177, 2004.

HERSHEY, C. H., *Manihot* genetic diversity In: International network for cassava genetic resources. **International crop Net Work Series (IPGRI)**, Rome, Paris, 1989.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2013. Disponível em <www.ibge.com.br> Acesso em jan 2013.

IBGE- Estudo Nacional da despesa familiar, 2008. Disponível em<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_composicao_nutricional> Acesso em 05 fev.2013.

JESUS, C.J.; QUEIROZ, F.P.; SOUSA, S.H.B.; PENA, H.W.A. Elasticidade - preço e renda da demanda de farinha de mandioca na região metropolitana de Belém, 2012.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Safety evaluations on certain mycotoxins in food, 2001.

KAWASHIMA, Luciane Mie. **Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil**. Tese de doutorado. Unicamp, Campinas-SP, 1992.

KERN, M.E.; BLEVINS, K.S. **Micologia Médica - Texto e Atlas** 2 ed. São Paulo. Editorial Premier, 1999.

KRAEMER, F.B.; STUSSI, J.S.P.; Avaliação Micológica de farinha de mandioca (*Manihot utilissima*): Incidência de *Aspergillus* e *Penicillium* com potencial micotoxigênico. **Revista Higiene Alimentar**, v. 12, n.57, p. 38-40, 1998.

KRUGER, C.D., **Ocratoxina A em suínos abatidos no estado do Rio de Janeiro sob inspeção sanitária. I Determinação de níveis séricos por cromatografia líquida. II Correlação com as lesões renais e hepáticas**. Niterói, Universidade Federal Fluminense, 2006, 118 p. Medicina Veterinária, Programa de pós graduação em Medicina Veterinária.

LEMONS, J.A.; COSTA, M.; LEMOS, A.A; SILVA, M.R.R.; Isolamento e identificação de fungos em farinhas de milho e mandioca em Goiania-GO. **Revista Higiene Alimentar**, v.30, n.1, p. 31-36, 2001.

LEONEL, M.; OLIVEIRA, M. A. de. Produção de farinha de mandioca com qualidade - tecnologia de outros produtos derivados de mandioca. In: **Feira da Pequena Agroindústria**, Campinas: CATI, p. 79-95, 2003.

MARTINS, R.S. Biodiversity and agriculture: patterns of domestication of Brazilian native plants species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 66, suplemento 1, p.219-224, 1994.

- MARTINS, H.M.; MARTINS, M.L. Qualidade micológica de rações para bovinos (Portugal: 1996-1999). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. Lisboa, v.96, n. 538, p. 85-88, 2001.
- MOSS, O.M. Secondary metabolism and food intoxication-moulds. **Journal of Applied Bacteriology**, Symposium Supplement 73, 80 S-88S, 1992.
- MUZALINA, YC.; 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.
- NAKAMURA, I.M., PARK, Y.K. Some physico-chemical properties cassava starch. *Die Starke: Weinhein*, v.27,n.9, p. 295-297, 1975.
- NASSAR, N.M. A. Mandioca: Uma opção contra fome, estudos e lições no Brasil e no mundo. **Ciência hoje**, Brasília, v.39, n.231, p. 31-39, out 2006.
- OSLEN, K.M.; SCALL, B.A. Evidence on the origem of cassava: phylogeography of *manihot esculenta*. **Evolution**, Lancaster, v. 96, n. 10, p. 5589-5591, Mai. 1999.
- OSLEN, K.M.; SNPs, SSRs and inferences on cassava's origin. **Plant Moelcular Biology**, Holanda, v.56 , n. 4, p.517-526, Nov. 2004.
- OSUNTOKUM, B.O. Cassava diet, chronic cyanid intoxicification and neuropathy in Nigerian Africans. **Word Review of Nutrition and Dietetcs**, v.36, n.1, p. 141-173, 1981.
- PALMA, N. Ocratoxin A- induced mutagenesis in mammalian cells is consistent whith the production of oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 20, n.7, p. 1031-1037, 2007.
- PASTORE, G.M.; MACEDO, G.A.; Utilização de fungos na industria de alimentos. **In: Esposito, E. EDUCS**. Caixias do Sul, 2004.

RODRIGUEZ, D.B.A.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 1-11, 2002.

ROSLING, H. Measuring effects in humans of dietary cyanide exposure from cassava. **Acta Horticultural**, v.376, p.271-83. 1994.

ROSSIELLO, M.R. Ochratoxin A inhibits the production of tissue factor and plasminogen activator inhibitor - by human blood mononuclear cells: Another potential mechanism of immune-suppression. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 229, p. 227-231, 2008.

SABINO, M.; Micotoxinas em Alimentos. In: OGA, S. (ed.) **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu Editora, p. 461-472, 1996.

SEBRAE. - BA. Mandiocultura: **Derivados da mandioca** - Salvador Sebrae - Bahia , 2009, 40p.

SEBRAE. Estudo de mercado sobre mandioca (farinha e fécula). **Relatório Completo**. Estudos de mercado - ESPM/SEBRAE, 2008.

SEPLAN; **Secretaria do Estado de Planejamento e Desenvolvimento Econômico** (2010). on line: Disponível em: <<http://www.seplan.am.gov.br>> Acesso em: 22 de fevereiro de 2013.

SILVEIRA, I.A.; CARVALHO, E.P.; SCWAN, R.F.; PILON, L. Aspectos gerais da fermentação da fécula de mandioca para produção de polvilho azedo. **Revista Higiene Alimentar**, v.14,nº68/69, p.26-31, 2000.

SANTOS, I.M; VENÂNCIO,A; LIMA, N. **Fungos Contaminantes na Indústria Alimentar**. Micoteca da Universidade do Minho. Centro de Engenharia Biológica Braga: Sociedade Gráfica, S. A., p. 130, 1998.

SOUZA, J.M.L.; ÁLVARES, V.S.; LEITE, F.M.N.; REIS, F.S.;FLELISBERTO, F.A.V., Caracterização físico-química de farinhas oriundas de variedades de mandioca utilizadas no vale do Juruá, Acre. **Acta Amazônica**, v.38, n.4, p.761-766, 2008.

TACO - **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4ªEdição. Campinas: Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, .SP, 2011. TDisponível em<www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php. acesso em 20 de abril de 2013.

TYLLESTAR, T. Cassava cyanogens and konzo, an upper metoneuron disease found, **Africa Lancet**, v. 33, n.9, p.208-211, 1992.

UNUNG, J.E.; AJAYI, O.A. BOKANGA, M. 2006. Effect of local processing methods on vyanogen content of cassava. **Tropical Science**, v.46, p.20-22, 2006.

VALENTE, L.M.S.; RODRIGUEZ, D.B.A., Survey of aflatoxins, ocratoxins A, zealerone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of Association of Official Analytical Chemist**, v.72, p.22-26, 1989.

VIEIRA, M.F.; FRANCISCON, C.H.; RIBEIRO, J.D.; RIBEIRO, G.A.; GONZAGA, A.D. Mandioca e macaxeira como tema transversal na escola rural do ensino fundamental no Azonas, **Brasil. Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl.1, p-15-17, 2007.

VILPOUX, O. Produção de Farinha d'água no Maranhão. **Série: Cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas**, v.3 Cap.21. Cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas. Fundação Cargill. 2003.

WAREING, W. P.; WESTBY, A.; GIBBS, J.A.; ALLOTEY, L.TL; HALM, M. Consumer preferences and fungal and mycotoxin contamination of dried cassava products from Ghana, **International Journal of Food Science and Tecnology**, Ghana, v 36, p 1-10, 2001.

WELKE, J.E.HOELTZ, M.; NOLL, I.B., Aspectos relacionados à presença de fungos toxigênicos em uvas e ocratoxinas em vinhos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39,n.8,p.2568, 2009.

8. APÊNDICE I

Artigo enviado para publicação:

Toxigenic fungi and mycotoxins in cassava flour produced in Coari, Amazonas, Brazil

Silmara M. Mundim ^{a*}, Ariane M. Kluczkovski ^a, Josy C. Rodrigues ^b, Victor C. de Souza ^b, Ormezinda C. Fernandes ^b,

^a Federal University of Amazonas, Manaus–AM - Brasil

Address: Av.. General Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I, CEP.. 60077-000 Manaus-AM - Brazil

^b Fiocruz Amazonas - Instituto Leonidas and Maria Deane (ILMD) Manaus-AM - Brazil

: Address: Street Terezina, 476. Adrianópolis. Manaus - AM. CEP: 69.057-070. Tel.: +55 (92) 3621-2323

Corresponding author:* Av.. General Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I, Cep. 60077-000, e-mail: silmara.mundim@gmail.com

Abstract

This study identified the mycobiota and occurrence of mycotoxins in samples of cassava flour produced in Coari, Amazonas, Brazil. 30 samples were collected at the local market and evaluated for moisture and water activity (a_w), presence of fungi (isolation, purification and identification by traditional taxonomy), scanning electron microscopy and mycotoxins. Confirmation of toxigenic fungi species was performed through molecular biology and mycotoxins were identified by MALDI-TOF. Results for moisture and a_w ranged from 7.08 to 13.55% and 0.37 to 0.69, respectively. Among samples analyzed, 30% had fungi and, of these, 18.5% were toxigenic. The identified species were *Aspergillus flavus*, *Penicillium*

citrinum and *P. waksmani*. Among the toxigenic fungi, *P. citrinum*, *A. flavus* and *A. amoenus* were found. MALDI-TOF showed a more frequent presence of Aflatoxin B₁, Patulin and Citrinin. Attention is needed to prevent toxigenic fungi and possible mycotoxin production during the processing of cassava flour.

Keywords: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp, MALDI-TOF, Aflatoxin

1 Introduction

Filamentous fungi are organisms which produce several secondary metabolites, among which mycotoxins stands out, characterized by its toxic properties in both human and animal organism. These toxins are produced mostly by species of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*, relevant due to its involvement in mycotoxin production and food contamination (IARC, International Agency for Research on Cancer, 1993). These fungi can occur naturally in agricultural food pre and post-harvest and under the influence of chemical conditions of matrix, moisture, temperature and pH (Belli, 2004).

Among filamentous fungi, *Aspergillus* is the producer of Aflatoxin (AFL), the most frequently reported mycotoxin in food and at greater risk of toxicity, being classified as B₁, B₂, G₁ and G₂ (Ardic et al., 2008). The AFLB₁ is the most toxic and considered as an etiological factor for liver cancer (IARC, International Agency for Research on Cancer, 1993). Consequently, liver pathologies related to the consumption of food contaminated by AFLs have been widely studied (Bordini et al., 2013). In Brazil, cases of liver cancer stand in the North Region of Brazil as one of the five leading causes of death in men (INCA, National Cancer Institute, 2010). A hypothesis for this condition would be the high consumption of certain regional foods including the cassava flour, which, according to the IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010), has an average consumption per capita of 46.2 (g/day), the country's largest.

Flour is the main product of cassava in the Amazon region and considered as an important source of carbohydrate. Its features vary according to the region it is produced, and it can be classified as dry, watery or "puba" and mixed. In the state of Amazonas, the most frequent type are puba and mixed, produced in small establishments called "flour mills". Flour processing occurs by small producers in order to supply their family need and to be sold in municipal fairs or small shops (Chisté et al., 2006). The production is artisanal

under ambient conditions with high relative humidity (RH%; between 80-95%) and temperatures greater than 25 °C (Calderari et al., 2013).

The flour processing occurs in the following steps: harvest, peeling, fermentation, grating, pressing, graining, drying and storage (Cardoso, 2005). Conditions of production and storage may favor fungal growth (Gomes et al., 2007). Santos et al. (2012) conducted an investigation on the microbiota present in cassava flour and identified mycotoxigenic fungi. However, studies involving cassava flour, fungi and mycotoxins are scarce (Essono et al., 2007). To collaborate with assessment of mycotoxins in cassava flour, this study aimed to identify the mycobiota and the presence of mycotoxins in samples of cassava flour produced in Coari, Amazonas, Brazil.

2. Material e Methods

2.1. Geographic characterization and sampling

30 samples of cassava flour were collected in December 2012, from different producers from a fair located in Coari (Figure 1), Amazonas, Brazil, a city in the middle Solimões region (4°5'6"S, 5°8'30"W). Before sampling, a recording of the feedstock variety used by the producer and the identification of the rural unit where the sample was processed was performed. Samples were collected, stored in 300g sterile plastic bags, placed in coolers and transported to Manaus, Amazonas, through airmail, to the laboratory within 30-90 days.



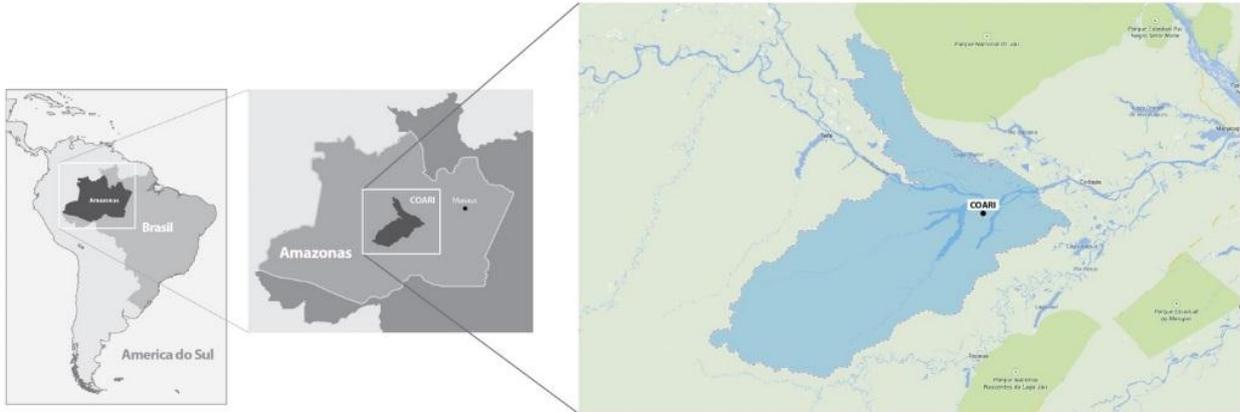


Figure 1. Location Map from Coari, Amazonas, Brazil.

2.2 Laboratory analysis

2.2.1 Humidity

The determination of moisture was performed in duplicate, using the gravimetric method described by AOAC (2005).

2.2.2 Water Activity

Water activity (a_w) was measured using a digital device (AquaLab®, CX-2 Model, DECAGON) connected to a thermostatic bath at 25 °C. Analyses were performed in duplicate.

2.2.3. Isolation, purification and identification of mycobiota

Isolation was performed using 10g of each sample, diluted in 90mL of 0.1% peptone water and subjected to a series of decimal dilutions, in order to obtain a concentration of 10^{-4} .

Seeding was performed in triplicate using 0.1mL of the final dilution onto the surface of 18% Dichloran

Glycerol Agar Base (18%DG) at 28°C for 07 days (Pitt and Hocking, 2009). After primary isolation, colonies were purified in test tubes containing Malt Extract Agar (MEA) culture medium. For identification of isolated fungi, techniques based on its macroscopic (color, size, colony texture and presence of exudate) and microscopic characteristics were performed, using keys proposed by Samson and Pitt (1985), Pitt (2000), Klich and Pitt (1988) and Raper and Fennell (1977).

2.2.4. Toxigenic potential

Fragments from isolated colonies were transferred to coconut-agar medium (Lin and Dianese, 1976) and incubated at 28°C for 07 days, being observed every 24 h. To evaluate the presence of mycotoxins, colonies were visually examined under ultraviolet (UV) light at 365nm to observe any fluorescence produced.

Fragments of fungi were transferred to Yeast Extract with supplements (YES) medium and incubated at 28°C for 07 days. Then, ammonia vapor was used (25%) in order to observe changes in color until obtaining an intense pink on the reverse of the colony, a positive result according to Saito and Machida (1999). Only fungi positive for mycotoxin production through coconut-agar medium and ammonia vapor were considered toxigenic and subjected to extraction, amplification and sequencing of DNA for molecular identification

2.3. Scanning electron microscopy

Among those identified as toxigenic fungi, two species of *Aspergillus* sp. and one of *Penicillium* sp. were examined by scanning electron microscopy. The culture of the isolated fungi was performed on Malt Extract Agar (MEA) and incubated at 25°C for 05 days. The traditional method (May-Mio et al., 2006), was used and material examination was performed using a scanning electron microscope (FEI Quanta 250).

2.4. DNA extraction, amplification and sequencing

Fungi classified as toxigenic using coconut-agar and YES medium were subjected to identification by molecular biology.

2.4.1. DNA extraction

After the cultivation period in MEA, a spore suspension of each fungus isolated was prepared. DNA extraction was performed using a DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen®), according to manufacturer instructions.

2.4.2. Amplification of β -tubulin region by Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR was performed in 25 μ L mix [1.0 μ L MgCl₂ (50mM), 0.5 μ L dNTPs (10mM), 2.5 μ L 10X Taq buffer, 0.3 Taq DNA Polymerase (5U/ μ L) (Platinum)], 2 μ L mix of sense and antisense primer (5 μ M) and 2 μ L DNA.

Part of the β -tubulin gene was amplified using the Bt2a (5'GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC3') and Bt2b (5'ACCCTCAGTGTAGTGACCGGC3') primers (Hubka and Kolarik, 2012). PCR cycles were: initial denaturation (94°C for 5 min); followed by 30 cycles at 94°C for 30 sec (denaturation), at 62°C for 1 min (hybridization) and at 72°C for 2 min (polymerization); ending with a polymerization at 72°C and a cooling to 4°C. PCR products were visualized on 1.5% agarose gel in 1X TBE (Tris-Borate EDTA) (Sambrook et al. 1989), labeled with GelRed (Biotium) visible at UV light.

2.4.3. Sequencing of PCR products

PCR products were purified by 20% polyethylene glycol (PEG) precipitation methodology. Sequencing was performed using BigDye Terminator kit (v3.1 Cycle Sequencing, Applied Biosystems). Reactions were performed on an ABI-3130 sequencer and sequences were edited and analyzed using Geneious software, based on the GenBank public database.

2.5. Identification of mycotoxins by MALDI-TOF MS

For mycotoxins extraction, 5g of each sample was transferred to amber glass vials containing 5mL of methanol. Flasks were agitated for 60 min, sonicated for 5 min and left to stand for 60 min. The supernatant was transferred to an amber vial and the solvent was evaporated. The extract from each sample was mixed with 1ml of matrix solution [75mg/ml of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) in ethanol/water/acetonitrile [1:1:1] with 0.03% trifluoroacetic acid (TFA)] and allowed to dry at room temperature (Marques, 2006). The equipment used was MALDI TOF Autoflex III mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

The mass variation analyzed was up to 2000Da, using a linear mode with 104ns pulse at +20 kV and the Nd:YAG (*neodymium-doped yttrium aluminium garnet*; Nd:Y₃Al₅O₁₂) laser of 1064nm, set to a 66% power. Raw spectra were divided into 4 intervals of 500Da each. Spectra were interpreted as the molecular weight of mycotoxins investigated.

3. Results and Discussion

3.1. Moisture and water activity

The average content and variation (minimum-maximum) of moisture in the analyzed samples were 9.61% and 7.08-13.55%, respectively. Results showed that 6.7% of samples had maximum values of humidity, in disagreement with the Brazilian legislation, which establishes 13% as the maximum value allowed (ANVISA, the National Health Surveillance Agency, 2001). Our results differ from a study conducted in flour samples from Bahia, Brazil, where humidity values ranged from 4.93 to 9.33% (Santos et al., 2012). Souza et al. (2008) analyzed 18 samples of cassava flour produced in Cruzeiro do Sul, Acre, Brazil, and obtained moisture values between 8.10-12.02%. Maximum values found in the present study resemble those found by Souza et al. (2008), which can be justified by the fact that both studies were conducted in regions located in the North Region of Brazil, with the same conditions of temperature and humidity, unlike Santos et al. (2012), who analyzed samples from the Northeast region with different environmental conditions.

Samples had an average value of a_w of 0.52 and a minimum-maximum range of 0.69-0.37. All samples evaluated in our study had $a_w < 0.70$, similar to those found by Chisté et al. (2006) when analyzing samples of cassava flour produced in Pará, Brazil, with a_w between 0.31-0.61. Pitt and Hocking (2009) describe that $a_w > 0.70$ are required for the development of fungi, higher than those found in our study. It is possible that, during storage, there is an elevation of these values, since producers used 50Kg open bags to store and sell the flour, leaving it in direct contact with humidity. The evaluation of moisture and a_w is of great importance due to the influence on the shelf life of foods, since they are among the most influential parameters for the development of mold and mycotoxin production. According to Pitt and Hocking (2009), a_w in food is closely related to relative humidity (RH) and a balance between them is something expected, which may favor the development of fungi during storage. When evaluating a_w changes an increase up to 24.84% was observed in samples obtained from supermarkets at room temperature for a period of up to 180 days (Ferreira Neto et al., 2005).

3.2. Identification of mycobiota

Among the 30 samples of cassava flour studied, 9 (30%) had fungi. Genus identification revealed the presence of 15 isolates of *Aspergillus* (27.8%), 34 of *Penicillium* (63%) and 5 of *Acremonium* (9.2%) (Table 1). The variation (minimum-maximum) in the fungal counting was 2.0-25.0 CFU.g⁻¹.

Table 1

Fungi isolated from samples of cassava flour produced in Coari, Amazonas, Brazil.

Sample*	**UFC.g ⁻¹	<i>Aspergillus</i> spp	<i>Penicillium</i> spp	<i>Acremonium</i> spp
A1	5	0	5	0
A2	6	0	5	1
A3	5	0	3	2
A4	2	0	0	2
A6	2	0	2	0
A7	4	1	3	0
A15	25	12	13	0
A20	3	1	2	0
A30	2	1	1	0

*09 positive samples positivas in 30 analyzed.

** UFC: Colony forming units

Pontes (2012) analyzed mycobiota samples on cassava flour from Sao Paulo, Brazil and identified fungal contamination in 66.8% of samples, higher than our results. The presence of filamentous fungi in cassava flour can be explained by two main factors: influence of the environment, since the Amazon region has favorable conditions for their growth, with an RH>80% and temperature>30°C (Oliveira and Rebouças, 2008); and processing, which occurs rudimentary and often without knowledge of good hygiene practices (Chisté et al., 2006), as well as inappropriate storage and possible prolonged exposure of food to atmospheric air (Ferreira Neto et al, 2004). Alhadas et al. (2004) reported that *Aspergillus* and *Penicillium* genera are predominantly found in warehouses, mills and places where agricultural products are processed. Values found in this study do not exceed those established by Brazilian legislation for yeasts and molds, with a maximum of 104 CFU.g⁻¹.

However, the presence of filamentous fungi is of concern since they can potentially produce mycotoxins (Pitt and Hocking, 2009). Our findings support data found in literature regarding the investigation on the mycoflora of cassava flour, which identified *Penicillium* and *Aspergillus* as the predominant genera (Kremer and Stussi, 1998; Lemos et al., 2001; Gomes et al., 2007). Lemos et al. (2001) report that these genera are more likely to be found in cassava flour as they are considered xerophilic.

When performing the identification of the fungal species present in the flour samples by traditional taxonomy, the following results were obtained in decreasing order of frequency: *Penicillium waksmanii* 14 (25.9%), *Aspergillus flavus* 13 (24.2%), *P. citrinum* 11 (20.5%), *P. melinii* 3 (5.6%), *P. bilaii* 2 (3.7%), *P. janthinelum* 1 (1.8%), *P. janczewskii* 1 (1.8%), *P. miczynskii* 1 (1.8%), *P. variabile* 1 (1.8%), *A. japonicus* 1 (1.8%), *Aspergillus* sp. 1 (1.8%) and other 5 (9.3%) (Table 2).

Table 2

Relative frequency (%) of the main fungi isolated from samples of cassava flour produced in Coari, Amazonas, Brazil.

Samples flour	Fungal Species								
	A. <i>flavus</i>	A. <i>amoenus</i>	<i>P. Bilai</i>	<i>P.</i> <i>waksmanii</i>	<i>P.</i> <i>miczynskii</i>	<i>P.</i> <i>citrinum</i>	<i>P.</i> <i>variable</i>	<i>P.</i> <i>melini</i>	<i>P.</i> <i>janthinelum</i>
*S1	0	0	0	60	0	20	20	0	0
S2	0	0	0	0	0	25	0	25	50
S3	0	0	0	33	0	67	0	0	0
S4	0	0	0	0	0	100	0	0	0
S6	0	0	50	50	0	0	0	0	0
S7	0	0	0	0	33	33	0	33	0
S15	46	4	0	42	4	4	0	0	0
S20	50	0	0	0	0	50	0	0	0
S30	67	0	0	0	0	33	0	0	0

* S = Sample

Lemos et al. (2001) identified the presence of *A. flavus* in 10% of cassava flour samples collected from Goiás, Brazil, which also had the presence of *A. niger*, *A. fumigatus* and *A. earthy*. Gnonlonfin (2012) analyzed 60 samples of cassava chips and found *A. flavus* in 54. Among the fungal isolates, 10 (18.5%) were classified as toxigenic and identified by molecular biology and the species *A. flavus* 2 (20%), *A. amoenus* 1 (10%) and *P. citrinum* 7 (70%) (Table 3) were observed. Our findings are similar to those described by Lemos et al. (2001) since *A. flavus* was also found. However, the number of studies involving this type of food and its mycobiota are scarce.

Table 3

Species identified by traditional taxonomy and molecular biology

Sample number	Traditional taxonomy	Identification by B tubulin	Number in Genbank
F1510	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	KJ136090.1
F1520	<i>Apergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	KJ136096.1
F1501	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Aspergillus amoenus</i>	JN853944.1
F103	<i>Penicillium Citrinium</i>	<i>Penicillium Citrinium</i>	KC345003.1
F107	<i>Penicillium Citrinium</i>	<i>Penicillium Citrinium</i>	KC345001.1
F462	<i>Penicillium Citrinium</i>	<i>Penicillium Citrinium</i>	JX141014.1
F261	<i>Penicillium Citrinium</i>	<i>Penicillium Citrinium</i>	JX141013.1
F2050	<i>Penicillium Citrinium</i>	<i>Penicillium Citrinium</i>	KC345001.1
F309	<i>Penicillium Citrinium</i>	<i>Penicillium Citrinium</i>	KC345003.1
F3011	<i>Penicillium Citrinium</i>	<i>Penicillium Citrinium</i>	JX141012.1

Images of morphological structures were obtained by scanning electron microscopy (SEM). Figure 2 shows details of *Aspergillus flavus*, *A. amoenus* and *P. citrinum* structures, three fungi considered toxigenic. Among species identified by traditional taxonomy, one of the genus *Aspergillus* could not be identified since its morphological structure did not showed the visibility required. In SEM, morphological structures such as conidiophores, metula and conidias are more evident, facilitating fungi characterization. This technique is considered as an important adjunct in the identification of fungi by traditional taxonomy (Martinelli and Santos, 2010).

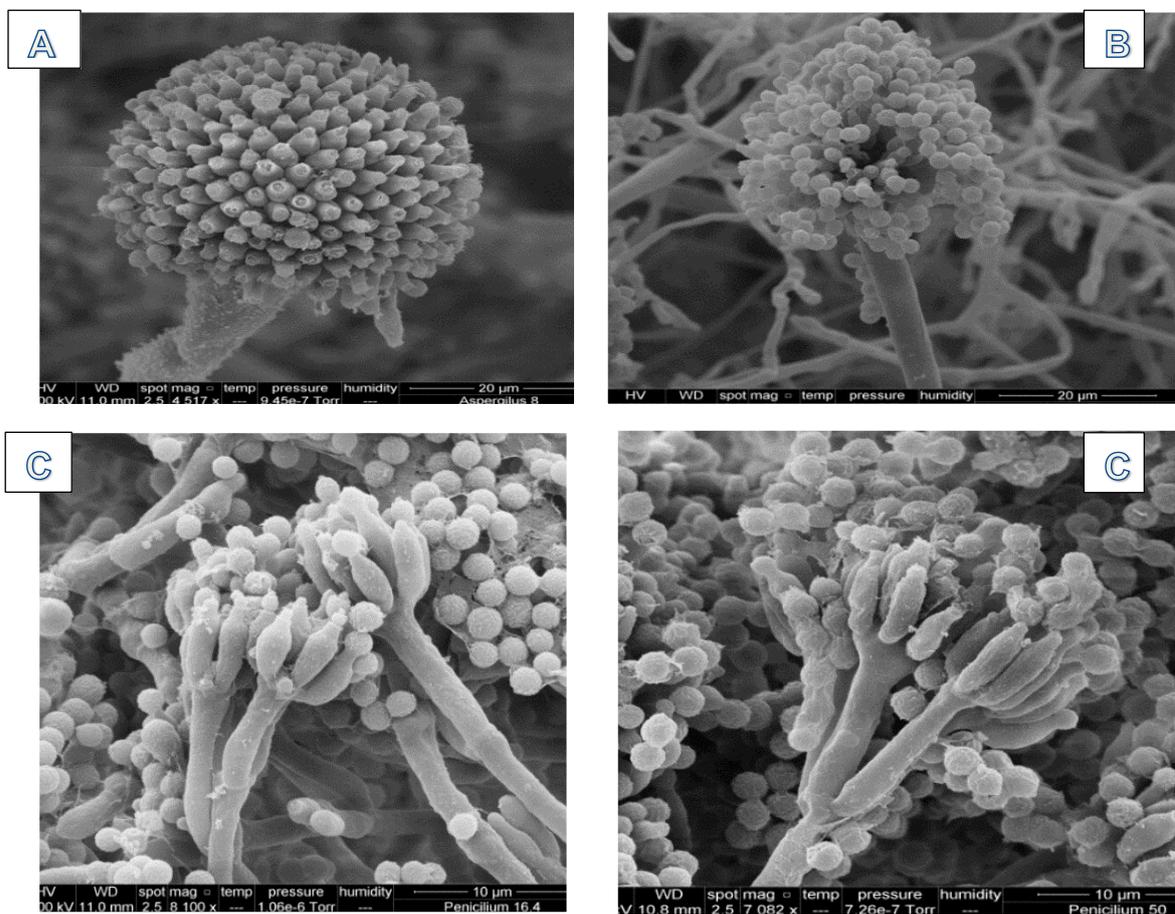


Figure 2. Morphological structures evidenced by Scanning Electron Microscopy A) *A. flavus* B) *A. amoenos* C) *P. citrinum*

As for fungi identified as mycotoxigenic, among the 15 *Aspergillus* species isolated, only 3 (20%) were potentially toxigenic. Between 34 isolates of *Penicillium*, 7 (20.6%) had the same potential for the analyzed methodologies (Coconut-agar medium and YES). Kremer and Stussi (1998) studied toxigenic *Aspergillus* species through the coconut-agar and identified that 14.9% were positive.

3.3. Detection of mycotoxins

Spectra of m/z related to mycotoxins were detected, with its protonated values (mycotoxin mass + H^+) and the cationization with Na^+ ($m/z=32$) and K^+ ($m/z=39$) forming ion called adducts. The m/z were identified for the following mycotoxins: Patulin (m/z $154+23=177$; Figure 3), Citrinin (m/z $250+39=289$), $AFLB_1$ (m/z $312+23=335$) $AFLB_2$ (m/z $314+23=337$) and $AFLG_1$ (m/z $330+39=368$).

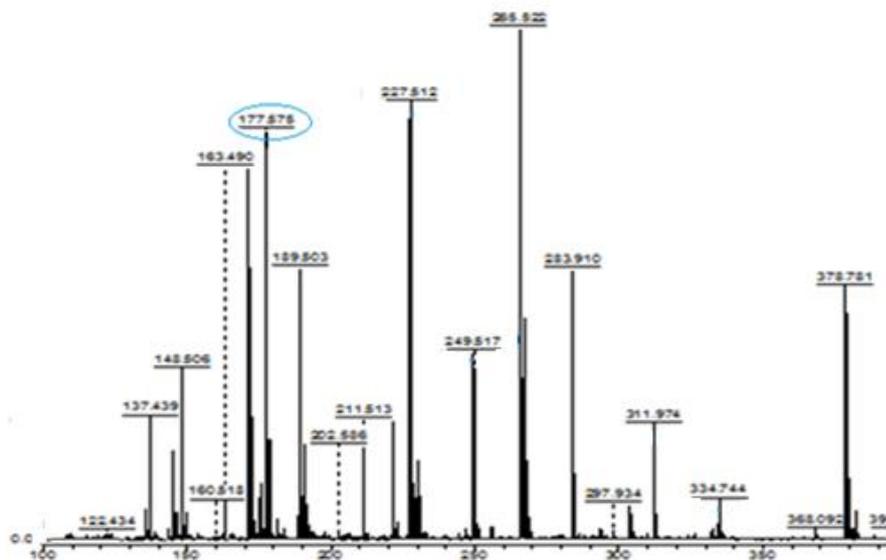


Figure 3: Example of mass spectra obtained by MALDI-TOF MS, indicating molecule weight related to Patulin molecule with the addition of an a Na^+ ion (177.979).

In the analyzed samples, the most frequent mycotoxins were Patulin, $AFLB_1$ and Citrinin (Table 4). Ibeh et al. (1991), using chromatographic analysis for the presence of AFLs in cassava flour acquired in different areas in Benin (Nigeria), found that 40% of samples were contaminated with $AFLB_1$ and $AFLG_1$. Ediage et al. (2011) investigated mycotoxins in samples of cassava flour by LC-MS/MS method and verified the presence of $AFLB_1$ and $AFLB_2$, zearalenone, diacetoxyscirpenol and beauvericin. Our results are similar to those cited only by the presence of AFLs B_1 and B_2 , present in 86.7% and 3.3% of samples respectively. This is an important finding, since $AFLB_1$ is considered the most potent natural hepatocarcinogenic (IARC, 1993), combined to the fact that cassava flour is one of the most consumed foods in the Amazon and can be associated as a cause of liver cancer in the region.

Santos and Silva (2010) reported that, among mycotoxins, AFLB₁ is the most common in food. AFLs are considered the most dangerous by the frequency in which they are found, potentially causing severe liver damage, including hemorrhagic necrosis (Volkler et al. 2011). Brazil's North Region has a high consumption of cassava flour, which, if contaminated by mycotoxins, could influence the rates of liver cancer population of the region.

Table 4

Mycotoxins identified in samples of cassava flour, according to the spectra generated in MALDI TOF.

Amostras	Micotoxinas					
	Citrinina	Patulina	AFL B1	AFL B2	AFL G1	AFL G2
S1	X	X	X	ND	X	ND
S2	X	ND	ND	ND	X	ND
S3	X	X	X	ND	ND	ND
S4	X	X	X	X	X	X
S5	X	X	X	ND	ND	ND
S6	X	X	ND	ND	ND	ND
S7	X	X	X	ND	ND	ND
S8	X	X	X	ND	ND	ND
S9	X	X	X	ND	ND	ND
S10	ND	X	X	ND	ND	ND
S11	ND	X	X	ND	ND	ND
S12	X	X	X	ND	ND	ND
S13	X	X	X	ND	ND	ND
S14	X	X	X	ND	ND	ND
S15	X	X	X	ND	ND	ND
S16	X	X	X	ND	ND	ND
S17	X	X	X	ND	ND	ND
S18	X	X	X	ND	ND	ND
S19	ND	X	X	ND	ND	ND
S20	X	X	X	ND	ND	ND
S21	X	X	X	ND	ND	ND
S22	X	X	X	ND	ND	ND
S23	X	X	X	ND	ND	ND
S24	X	ND	X	ND	ND	ND
S25	X	ND	X	ND	ND	ND
S26	X	X	X	ND	ND	ND
S27	X	X	X	ND	ND	ND
S28	X	X	X	ND	ND	X
S29	X	X	ND	ND	ND	ND
S30	X	ND	ND	ND	ND	ND

X = Presence of mycotoxin; ND: not detected

5. Conclusion

Mycobiota samples of cassava flour produced in Coari, Amazonas, Brazil were composed mainly by fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* and, between toxigenic species, *P. citrinum*, *A. flavus* and *A. amoenus* were found. Among factors related to these results, we highlight an inadequate and/or prolonged storage of the product, associated with the fact that the Amazon region has favorable environmental conditions (humidity and temperature) for the development of toxigenic fungi and mycotoxin production in cassava flour produced in the region.

Compounds equivalent to AFLB1, Patulin and Citrinin were observed with greater frequency; however, further studies are necessary to quantify these mycotoxins in order to provide a better understanding of the risk associated with cassava flour consumption. It will also be necessary to relate the presence of mycotoxins in cassava flour with indices of hepatic pathologies in the population of Brazil's North Region, thus suggesting preventive mechanisms for public health.

6. Acknowledgements

Authors thank Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) for financial support; Instituto Leônidas and Maria Deane/Fiocruz for technical support; Programa de Ciências de Alimentos from Universidade Federal do Amazonas-UFAM and Centro e Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) for their support during analyzes.

7. Referências

- Alhadas, R.V., Stuart, R.M., Beux, M.R., Pimentel, I.C., 2004. Contagem de Bolores e Leveduras em Fubá e identificação de gêneros potencialmente toxigênicos. *Visão Acadêmica* 5, 79-82.
- ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil), 2001. Resolução - RDC n° 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Disponível: <http://www.anvisa.org.br> (Acesso em 10/05/ 2014).
- AOAC. Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists. 2005.
- Ardic, M., Karakaya, Y., Atasever, M., Durmaz, H., 2008. Determination of aflatoxin B1 levels in deep-red ground pepper using immunoaffinity column combined with elisa. *Food and chemical toxicology* 46, 1596-1599.

- Belli, N., 2004. Influence of water activity and temperature on growth isolates of *Aspergillus* section *Niger* obtained from grapes. *International Journal of Food Microbiology* 31, 19-27.
- Bordini, J.G., Rossi, C.N., Hirooka, E.Y., Ono, E.Y.S., 2013. Impacto das Fumonisin, Aflatoxinas e Ocratoxina A na avicultura, *Biochemistry and Biotechnology Reports* 2, 68-88.
- Calderari, T.T., Lamanaka, B.T., Frisvad, J.C., Pitt, J.I., Sartori, D., Pereira, J. L., Fungaro, M.H.P. Taniwaki, M.H., 2013. The biodiversity of *Aspergillus* section *flavi* in Brazil nuts: From rainforest to consumer. *International Journal of Food Microbiology* 160, 267-272.
- Cardoso, E.M.R., 2005. Tradição da produção de farinha de mandioca no Amazonas. *Processamento e utilização da mandioca*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. p. 142-155.
- Chisté, R.C., Cohen, K.O., Mathias, E.A., Ramoa, A.G.A., 2006. Qualidade da farinha de mandioca do grupo seca. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26, 861-864.
- Ediage, E.N., Mavungu D.D., Monbaliu, S., Peteghem, C.V., Saeger, S.A., 2011. Validated Multianalyte LC-MS/MS Method for Quantification of 25 Mycotoxins in Cassava Flour, Peanut Cake and Maize Samples. *Journal Agricultural Food Chemistry* 59, 5173-5180.
- Essono G., Ayodele, M., Akoa, A., Foko. J., Olembo, S., Gockowski, J., 2007. *Aspergillus* species on cassava chips in storage in rural áreas of Southern Cameroon: Thier relationship with sotrage duration, moisture contente and processing methods. *African Journal of Microbiology Research* 1, 1-8.
- Ferreira Neto, C.J., Figueiredo, R.M.F., Queiroz, A.J.M., 2005. Avaliação sensorial e da atividade de água em farinhas de mandioca temperadas. *Ciências Agrotécnicas* 29, 795-802.
- Ferreira Neto, C., Nascimento, E.M., Figueiredo, R.M., Queiroz A.J.M., 2004. Microbiologia de farinhas de mandioca (*Minihot esculenta* Crantz) durante o armazenamento. *Ciência Rural de Santa Maria* 34, 551-555.
- Gnonlonfin, G.J.B, Adjovi, C.J.G., Katerere, D.R., Shephard, G.S., Sanni, A., Brimer, L., 2012, Myclofora and abstinence of aflatoxin contamination of commercialized cassava chips in Benin, West Africa “*Food Control*, 23, 333-337.

- Gomes, L.P., Silva, L.J.G., Fernandes, G.S.T., 2007. Identificação dos principais gêneros fúngicos nas farinhas de mandioca comercializadas nos principais mercados de Manaus. *Revista Igapó, Manaus* 1, 60 - 64.
- Hubka, V., Kolarik, M., 2012. β -tubulin paralogue tubC is frequently misidentified as the ben A gene in *Aspergillus* section Nigri taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences. *Personia* 29, 1-10.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 1993. In Some Naturally O Substances: Food items and constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and mycotixins. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans, vol. 56. IARC Press, Lyon.
- Ibeh, I.N., Uraih, N., Ogonor, J.I., 1991. Dietary exposure to aflatoxin in Benin city, Nigéria: a possible public health concern. *International Journal of Food Microbiology*, 14, 171-174.
- IBGE (Instituto Nacional de Geografia e Estatística - Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009, Brasil), 2010. Análise de consumo alimentar pessoal no Brasil. http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_analise_consumo/pofanalise_2008_2009.pdf (Acesso 1 juny 2014).
- INCA (Instituto Nacional do Cancer José Alencar Gomes da Silva, Brasil), 2012. Magnitude do Câncer no Brasil: Incidência, Mortalidade e Tendência. INCA Informativo Vigilância do Câncer. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/controle_cancer (Acessed 15/04/2014).
- Klich, M.A., Pitt, J.I., 1988. A laboratory guideto common *Aspergillus* species and their telemorphs. Common wealth Scientific and industrial Research Organization, Sydney.
- Kraemer, F.B.; Stussi, J.S.P., 1998. Avaliação Micológica de farinha de mandioca (*Manihot utilissima*): Incidência de *Aspergillus* e *Penicillium* com potencial micotoxigênico. *Revista Higiene Alimentar* 12, 38-40.
- Lemos, J.A., Costa, M., Lemos, A.A., Silva, M.R.R., 2001. Isolamento e identificação de fungos em farinhas de milho e mandioca em Goiania. *Revista Higiene Alimentar* 30, 31-36.
- Lin, M.T., Dianese, J.C., 1976. A coconut agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. *Phytopathology Journal* 66, 1466-1469.
- Martinelli, P.R.P., Santos, J.M., 2010. Microscopia eletrônica de varredura de fungos nematófagos associados a *Tylenchulus semipenetrans* e *Pratylenchus jaehni*. *Bioscience Journal* 26, 809-816.

- May de Mio, L.L., Novaes, Q.S., Alves E., 2006. Methodologies processed of some rusts fungi by scanning electron microscopy. *Summa Phytopathologica* 32, 267-273.
- Oliveira, L.L., Rebouças, T.N.H., 2008. Perfil Higiênico Sanitário das unidades de processamento da farinha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) Na região sudoeste da Bahia. *Alimentação e nutrição* 19, 393-399.
- Pitt, J.I., 2000. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Sidney.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. 2009. *Fungi and Food Spoilage*, 3 rd ed. Springer, New York.
- Pontes, C.G.C., 2012. Identificação de fungos contaminantes em farinha de mandioca. Trabalho de Conclusão de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Estadual da Paraíba.
- Raper, K.B., Fennell, D.I., 1977. *The Genus Aspergillus*. Williams and Wilkins Company, Florida.
- Saito, M., Machida, S., 1999. A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. *Mycoscience* 40, 205-208.
- Sambrook J, Fritsch E.F., and Maniatis T., 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 5.3-5.14.
- Samson, R.A., Pitt, J.I. 1985. *Advances Penicillium and Aspergillus systematics*, Plenum Publishers. New York. 483 p.
- Santos, M.R., Silva, J.O., 2010. Impacto da presença de aflatoxinas em alimentos destinados ao consumo humano e animal. *Revista Multidisciplinar da Saúde* 4, 49-60.
- Santos, T.T., Souza, E.X.N., Silva, L.C., Cazzeta, M.L., 2012. Avaliação microbiológica e físico-química da farinha de mandioca comercializada no mercado municipal de Cruz das Almas – BA. *Magistra* 24, 34-41.
- Singh, N.D., Sharma, A.K., Dwivedi, P., Patil, R.D., Kumar, M., 2007. Citrinin and endosulfan induced teratogenic effects in Wistar rats. [Journal of Applied Toxicology](#) 27, 143–151.
- Souza, J.M.L., Álvares, V.S., Leite, F.M.N., Reis, F.S., Flelisberto, F.A.V., 2008. Caracterização físico-química de farinhas oriundas de variedades de mandioca utilizadas no vale do Juruá, Acre. *Acta Amazônica* 38, 761-766.
- Volkel, I., Schroer-Merker, E.; Czerny, C., 2011. The Carry-Over of Mycotoxins in Products of Animal Origin with Special Regard to Its Implications for the European Food Safety Legislation. *Food*

