

Fermentação Fúngica: Enriquecimento Protéico e Degradação de Micotoxinas em Farelo de Cereal Contaminado com Aflatoxina B₁ e Ocratoxina A

Fungal Fermentation: Proteic Enrichement and Mycotoxins Degradation in Cereal Bran Contaminated by Aflatoxin B₁ and Ochratoxin A

AUTORES

AUTHORS

✉ **Eliana Badiale FURLONG**

Fundação Universidade Federal do Rio Grande
Departamento de Química
Rua Engenheiro Alfredo Huch, 475
CEP: 96201-900
Rio Grande/RS - Brasil
e-mail: dqmebf@furg.br

Jackson Luis Martins CACCIAMANI

Fundação Universidade Federal do Rio Grande
Departamento de Química
e-mail: cacciamani@ibest.com.br

Jaqueline Garda BUFFON

Fundação Universidade Federal do Rio Grande
Departamento de Química
e-mail: jaquelinegarda@yahoo.com.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi testar a capacidade de fungos GRAS (*Generally Regarded as Safe*) para diminuir os níveis de contaminação por micotoxinas e aumentar os teores protéicos em farelo de arroz desengordurado e farelo de trigo. Os farelos foram artificialmente contaminados com aflatoxina B₁ (12 e 25 ng.g⁻¹) e ocratoxina A (48 e 95 ng.g⁻¹) simultaneamente. A fermentação em estado sólido foi realizada com *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* spp., em reatores de bandeja a 30 °C em estufa com aeração. Os níveis de proteína e de micotoxinas foram determinados nos produtos fermentados a cada 24 h durante 72 h. As duas espécies fúngicas aumentaram os níveis de proteína em até 17% e diminuíram os de micotoxinas em até 80%. O aumento nos teores protéicos se mostrou inversamente relacionado com os níveis de contaminação. O *Rhizopus* spp. foi mais eficiente para diminuir os níveis de ocratoxina A (OTA), que atingiu valores em torno de 35% dos níveis iniciais. O *Aspergillus oryzae* diminuiu os níveis de aflatoxina B₁ (AFA B₁) para 20% do inicial após 48 h de fermentação. Os resultados indicaram que os sistemas sólidos de fermentação com fungos GRAS são promissores para disponibilizar proteínas e produzir ingredientes alimentícios com menores níveis de contaminação.

SUMMARY

The objective of this work was to test the capability of GRAS (*Generally Regarded as Safe*) moulds to decrease the level of mycotoxin contamination and improve the protein levels in defatted rice bran and wheat bran. Bran was artificially and simultaneously contaminated with aflatoxin B₁ (12 and 25 ng.g⁻¹) and ochratoxin A (48 and 95 ng.g⁻¹). Solid-state fermentation was carried out by *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus* spp. in tray reactors at 30 °C in a forced ventilation incubator. The mycotoxin and protein levels were determined in the fermented products every 24 for 72 h. Both moulds increased the protein value of the bran by up to 17% and decreased the mycotoxin contamination by up to 80%. The increase in protein value was inversely related to the contamination levels. The mould *Rhizopus* spp. was more efficient in decreasing the ochratoxin A (OTA), reaching 35% of the initial concentration, whilst *Aspergillus oryzae* decreased the aflatoxin B₁ (AFA B₁) to 20% of the initial contamination level after 48 h. The results showed that solid-state fermentation with GRAS moulds was a promising way to increase the protein content and produce food ingredients with lower levels of contamination.

PALAVRAS-CHAVE

KEY WORDS

Micotoxinas; *Aspergillus oryzae*; *Rhizopus* spp.;
Descontaminação; Biomassa fúngica; Farelo cereal.

Mycotoxins; *Aspergillus oryzae*; *Rhizopus* spp.;
Decontamination; Fungal biomass; Cereal bran.

✉ Autor Correspondente

✉ Corresponding Author

1. INTRODUÇÃO

Os farelos cereais constituem fontes de fibras, carboidratos digeríveis, proteínas e outros compostos funcionais. Esta composição motiva o seu emprego como ingrediente na panificação, nas formulações de misturas alimentícias funcionais, no substrato para produção de enzimas e nas rações para animais de criação (CHANDI e SOGI, 2006; PARRADO et al., 2006; ZHOU et al., 2004; BRAND et al., 2000).

Apesar do valor nutricional, o emprego de farelos na rotina alimentar ainda é limitado pelas características sensoriais, pela presença de fatores antinutricionais e pelo perigo de contaminação por micotoxinas. Estas propriedades controversas resultam em poucos cuidados durante o manuseio industrial e em baixos valores comerciais destes subprodutos, que não atingem classificação para o consumo humano (MURPHY et al., 2006; ZHOU et al., 2004).

Os fungos são comuns no campo e nas porções superficiais de vegetais cultivados, armazenados e processados em diferentes regiões. As espécies toxigênicas de fungos produzem micotoxinas em função de variáveis que se relacionam de maneira complexa, o que dificulta a prevenção de sua ocorrência em matérias-primas, subprodutos e alimentos. Aflatoxina B₁, ocratoxina A, zearalenona, deoxinivalenol e fumonisinas são freqüentemente detectadas em cereais, especialmente em farelos (MURPHY et al., 2006; SUGIURA, 2001; BADIALE FURLONG et al., 1999; UENO, 1986). Na legislação brasileira estão estabelecidos níveis de contaminação aceitáveis apenas para as aflatoxinas de 20 ng.g⁻¹, mesmo estando disponíveis relatos de ocorrência de outras micotoxinas em diferentes alimentos (www.micotoxinas.com.br).

O consumo destas toxinas na alimentação pode ocasionar danos agudos, tais como: diarreias, vômito e dor de cabeça, bem como danos crônicos como: alterações no sistema digestivo, neurológico e imunológico, atraso de crescimento, efeito estrogênico e câncer (MURPHY et al., 2006; YOSHIZAWA, 2001). Em vista deste fator, os órgãos responsáveis pela saúde pública e distribuição de alimentos em diferentes regiões vêm incentivando o desenvolvimento de procedimentos para prevenção e inativação destas toxinas, que podem permanecer nos alimentos mesmo após a destruição dos fungos. Além disso, os processos convencionais de preparação de alimentos nem sempre inativam as micotoxinas diminuindo seus efeitos efetivamente (SINHA, 1998).

Os métodos físico-químicos e biológicos estudados, quanto ao seu potencial de descontaminar matérias-primas e insumos alimentícios, são pouco adequados para aplicação rotineira. Os tratamentos térmicos e o uso de agentes químicos de caráter fortemente ácido, alcalino ou oxidante não são de fácil aplicação industrial; além de caras, as condições drásticas podem diminuir a qualidade nutricional e tornar o alimento desagradável para o consumo (MENDEZ-ALBORES et al., 2004; MENDEZ-ALBORES e VILLA, 2004; HUWIG et al., 2001).

Os métodos biológicos de descontaminação, que empregam bactérias lácticas, fungos e leveduras, são amplamente investigados quanto às melhores condições na produção de alimentos, e aliam a diminuição dos níveis de micotoxinas à agregação de características funcionais e tecnológicas a matérias-primas (NIDERKORN et al., 2006; BLUMENTHAL, 2004; SELVI, 2003; ABRUNHOSA et al., 2002; VARGA et al., 2000; BATA e LASZTITY, 1999; WESTBY, 1997).

A atividade de água, a composição química e as características físicas dos farelos cereais os tornam adequados para

o emprego em processos de fermentação sólida destinados à produção industrial de enzimas e outras biomoléculas de interesse comercial. (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003; TANIWAKI, 2001; BRAND, 2000; SANZO et al., 2001). Os estudos relacionados à produção de insumos alimentícios empregando fermentação fúngica de substratos contaminados por micotoxinas, no que se refere aos níveis de insumos produzidos, e das próprias toxinas ao longo do processo, são escassos. A investigação da possibilidade de eliminar micotoxinas ou reduzir os seus níveis a valores aceitáveis poderia abrir a perspectiva de ampliar o uso de farelos em produção de alimentos e insumos destinados ao consumo humano e de diminuir descartes de materiais em condições inadequadas para emprego industrial.

Estas considerações nortearam o objetivo deste trabalho, que foi o de testar a capacidade de fungos GRAS, *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* spp., para diminuir os níveis de contaminação por micotoxinas e aumentar os teores protéicos em farelo de arroz desengordurado e farelo de trigo, ambos contaminados simultaneamente com aflatoxina B₁ (AFA B₁) e ocratoxina A (OTA). Foi testada a fermentação em estado sólido e realizada em bandeja, acompanhando os níveis residuais das micotoxinas e de proteínas produzidas a cada 24 h por um período de 72 h.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micotoxinas

Aflatoxina B₁ e ocratoxina A foram adquiridas da Sigma Aldrich Chemie, Ltda. Para uso analítico as micotoxinas foram dissolvidas em volumes exatos de benzeno:acetoneitrila (98:2). A concentração das soluções estoque e padrão foi confirmada espectrofotometricamente, de acordo com a recomendação da AOAC (2000).

2.2 Preparo do inóculo

Culturas puras de *Aspergillus oryzae* CCT 3940 e *Rhizopus* spp. foram fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia da Fundação Universidade Federal do Rio Grande. Os esporos dos fungos foram inoculados e desenvolvidos por 10 dias em ágar batata-dextrose a 30 °C. Esporos da superfície de cultura foram suspensos em água peptonada estéril contendo Tween 80 a 0,1%. Suspensões de esporos ajustadas a 5.10⁷ conídios.mL⁻¹ mediante contagem em câmara de Neubauer foram empregadas como inóculo para as fermentações em estado sólido (SANZO et al., 2001).

2.3 Preparo dos substratos

Foram coletadas 12 amostras de farelo de arroz desengordurado e 12 amostras de farelo de trigo em agroindústrias de cereais da região sul do Brasil. Cada uma delas foi avaliada quanto à ocorrência de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, ocratoxina A e zearalenona pelo multimétodo descrito por Soares e Amaya (1989). Os tricotecnos deoxinivalenol e toxina T2 foram triados pelo multimétodo descrito por Nunes et al. (2003). Nos dois casos os procedimentos foram testados quanto aos indicativos de mérito para os farelos.

Amostras de farelo, de cada cereal, não contaminadas foram misturadas, homogeneizadas e peneiradas. As frações dos farelos com partículas de 32 mesh foram separadas em 8 porções

de cada farelo para serem contaminadas com níveis combinados de AFA B₁ e OTA, definidos pelo planejamento experimental descrito na Tabela 1.

2.4 Fermentação sólida dos farelos

A fermentação dos farelos de arroz desengordurado e de trigo, ambos artificialmente contaminados, foi realizada em estufa a 30 °C, usando fermentador de bandeja preenchido com uma camada uniforme de 1 cm de substrato. Para cada experimento do planejamento, os fermentadores continham 50 g de farelo e 7,5 g de casca de arroz com umidade corrigida para 50% com solução salina contendo KH₂PO₄, MgSO₄ e NH₂CONH₂, respectivamente na proporção de 2:1:1.8 g.L⁻¹. As oito combinações das variáveis previstas foram preparadas para 24, 48 e 72 h de experimento. Nos fermentados, foram determinados os níveis de proteína e das micotoxinas, respectivamente, pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2000) e procedimento de Soares e Amaya (1989), incluindo os procedimentos de confirmação por co-cromatografia e derivação química com ácido trifluoracético. A quantificação foi realizada por comparação da fluorescência com padrões de AFA B₁ e OTA sob luz UV. Cada condição de fermentação foi realizada em duplicata. Os farelos fermentados também foram caracterizados quanto ao teor de umidade, pH e acidez, seguindo a recomendação da AOAC (2000).

TABELA 1. Planejamento experimental das variáveis farelo, microrganismo e concentração das micotoxinas AFA B₁ e OTA.

| Experimento | Farelo | Microrganismo | Nível de contaminação ng.g ⁻¹ |
|-------------|--------|---------------------------|--|
| 1 (-1) | FAD | <i>Aspergillus oryzae</i> | AFA B ₁ (12) OTA (48) |
| 2 (1) | FT | <i>Aspergillus oryzae</i> | AFA B ₁ (12) OTA (48) |
| 3 (-1) | FAD | <i>Rhizopus spp.</i> | AFA B ₁ (12) OTA (48) |
| 4 (1) | FT | <i>Rhizopus spp.</i> | AFA B ₁ (12) OTA (48) |
| 5 (-1) | FAD | <i>Aspergillus oryzae</i> | AFA B ₁ (25) OTA (95) |
| 6 (1) | FT | <i>Aspergillus oryzae</i> | AFA B ₁ (25) OTA (95) |
| 7 (-1) | FAD | <i>Rhizopus spp.</i> | AFA B ₁ (25) OTA (95) |
| 8 (1) | FT | <i>Rhizopus spp.</i> | AFA B ₁ (25) OTA (95) |

FAD (farelo de arroz desengordurado), FT (farelo de trigo).

2.5 Análise estatística

Os efeitos das variáveis níveis de contaminação, tipo de farelo e microrganismo nos teores de proteína e de micotoxinas foram avaliados para cada intervalo de fermentação usando o Software Statistica 6.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação de micotoxinas nos farelos

Os farelos coletados foram submetidos à triagem de ocorrência das micotoxinas, estas freqüentemente são encontradas em levantamentos feitos em amostras de cereais que vêm sendo realizados no Laboratório de Micotoxinas da FURG (NUNES et al., 2003; VIEIRA et al., 1999; BADIALE-FURLONG et al., 1999). Isto permitiria utilizar no estudo farelos isentos de contaminação micotoxicológica natural, que por ser aleatória e não homogênea dificultaria a realização do planejamento experimental para identificar a condição fermentativa mais promissora para diminuir a contaminação e aumentar o teor protéico.

Os métodos empregados para avaliar a ocorrência de micotoxinas foram escolhidos pela simplicidade, facilidade de execução e performance adequada, também para acompanhamento dos níveis residuais de AFA B₁ e OTA após os experimentos de fermentação. Na Tabela 2 estão as recuperações, o limite de quantificação e a repetibilidade dos procedimentos para determinação de aflatoxina B₁, ocratoxina A, zearalenona, deoxivalenol e toxina T2.

O multimétodo de Soares e Amaya (1989) foi avaliado também quanto à sua performance para determinação de AFA B₁ e OTA em farelos fermentados. A média de recuperação para OTA em 3 níveis de contaminação (10 a 75 ng.g⁻¹) foi de 78% (CV = 8,5%) e o limite de quantificação de 8,6 ng.g⁻¹ (± 0,4). Estes valores diferiram dos encontrados para os farelos não fermentados, mas não impossibilitam o acompanhamento da variação dos níveis de OTA durante a fermentação, pois a repetibilidade, o limite de quantificação, a simplicidade e o custo da metodologia permanecem adequados à proposta inicial do trabalho. Para a AFA B₁ os indicativos de mérito não diferiram significativamente dos encontrados nos farelos não fermentados.

3.2 Caracterização físico-química dos farelos fermentados

Os farelos contaminados foram caracterizados durante os experimentos para acompanhar a evolução dos processos fermentativos. Os resultados médios e as faixas de variação dos índices físico-químicos das amostras fermentadas durante 24, 48 e 72 h estão apresentados na Tabela 3, como média de todos os experimentos. Nesta tabela os valores mínimos e máximos para cada propriedade ilustram as grandezas das variações.

TABELA 2. Performance dos multimétodos para a determinação de micotoxinas em farelos cereais.

| Indicativos | DON/ T2 toxina* | Zearalenona* | AFA B ₁ ** | OTA** |
|---|-----------------|--------------|-----------------------|-------|
| Recuperação (%) | 91 | 94 | 89 | 92 |
| Limite de quantificação (ng.g ⁻¹) | 40/53 | 35 | 2.5 | 6.5 |
| Repetibilidade n CV (%) | 14 | 11 | 9.2 | 6.7 |

n = 6 repetições. *Nunes et al. (2003). **Soares e Amaya (1989).

TABELA 3. Propriedades físico-químicas dos farelos fermentados.

| Variáveis | Média | Valor mínimo | Valor máximo |
|---------------------------------|-------|--------------|--------------|
| Umidade % (p.p ⁻¹) | 47,8 | 33,0 | 55,0 |
| Proteína % (p.p ⁻¹) | 28,9 | 19,8 | 35,5 |
| Acidez (mg.g ⁻¹) | 0,4 | 0,3 | 0,5 |
| pH | 6,0 | 5,5 | 6,7 |

A variação dos percentuais protéicos ao longo do tempo de fermentação vem sendo utilizada como um dos indicativos de desenvolvimento fúngico, e foi a que apresentou a maior amplitude ao longo dos experimentos de fermentação. No entanto, os teores protéicos foram inferiores aos encontrados por outros autores, que mencionam aumento de até 45% de proteína durante fermentação em estado sólido para enriquecer farelo de arroz (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003; SANZO et al., 2001; MORAES, 1999). Nos experimentos 5, 6, 7 e 8, cujas concentrações das micotoxinas foram maiores, ocorreram menores variações, em média 5,3%, na síntese protéica do que nos experimentos cujas contaminações foram mais baixas. A possibilidade da diminuição da síntese protéica em presença de AFA B₁ e OTA tem sido mencionada por autores como Ueno (1986), Kieseling (1986) e Yoshizawa (2001).

A Figura 1 representa as variações percentuais entre os teores protéicos dos fermentados, estimados em base seca entre 0 e 24 h, 24 e 48 h, 48 e 72 h e a variação total (0 e 72 h), nesta ordem, nas oito condições experimentais testadas, além de

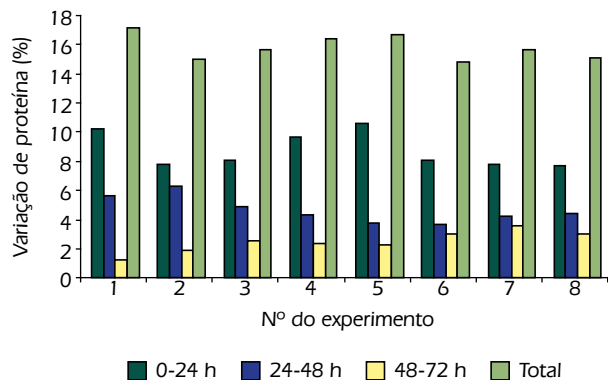


FIGURA 1. Variação do percentual protéico entre intervalos de fermentação 0-24, 24-48, 48-72 e 0-72.

permitir visualizar o comportamento cinético de desenvolvimento fúngico em farelos contaminados. Nas primeiras 24 h ocorreram as maiores variações nos teores protéicos, sempre mais marcantes nos experimentos onde o *Aspergillus oryzae* se desenvolvia em farelo de arroz desengordurado (experimentos 1 e 5). O *Rhizopus* spp. (experimentos 3, 4, 7 e 8) mostrou uma variação mais constante dos teores protéicos ao longo das 72 h de fermentação.

Os resultados da análise estatística, apresentados na Tabela 4, mostram que as concentrações de micotoxinas interferiram significativamente na produção de proteína ($p = 0,0180$) ao longo de 72 h de fermentação. As interações entre os efeitos farelo/microrganismo e farelo/contaminação mostraram que o microrganismo *Aspergillus oryzae* se desenvolveu melhor no farelo de arroz. O *Rhizopus* spp. apresentou os maiores teores protéicos quando o substrato foi o farelo de trigo com menores níveis de contaminação.

As micotoxinas AFA B₁ e OTA presentes no substrato dificultaram a produção de biomassa fúngica por *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* spp. em qualquer tipo de substrato, o que sugere a necessidade de se avaliar previamente o material a ser empregado em sistemas de fermentação sólida, para evitar alterações no rendimento do processo ao longo do tempo necessário para a produção de biocompostos de interesse.

3.3 Efeito da fermentação nos níveis de contaminação

A presença das micotoxinas AFA B₁ e OTA foi triada, confirmada por derivação química e quantificada nos farelos provenientes dos 8 experimentos nos tempos de 24, 48 e 72 h de fermentação. Os cromatogramas dos extratos de farelo de trigo fermentados por *Aspergillus oryzae* mostravam a presença de manchas azuladas com valores de R_f médios de 0,54, maiores que os da AFA B₁, valores médios de 0,39. Nos cromatogramas dos extratos de farelo de arroz desengordurado fermentado por *Rhizopus* spp. ocorreram manchas esverdeadas com R_fs médios de 0,76, estes superiores aos médios da OTA, 0,62. A confirmação química mostrou que estes compostos não eram as micotoxinas em estudo.

Westby, Reilly e Bainbridge (1997) relataram que durante a fermentação microbiana por *Rhizopus oryzae* ou *Rhizopus oligosporus* ocorria uma redução nos níveis de AFA B₁, acompanhada da formação de aflatoxicol. Considerando o sistema cromatográfico empregado para a determinação das micotoxinas neste trabalho e as estruturas da AFA B₁ e do aflatoxicol, a proba-

TABELA 4. Análise estatística dos efeitos das variáveis farelo, microrganismo e contaminação no percentual protéico dos farelos fermentados.

| Fatores | Proteína | | | | | | | |
|-------------------|----------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|
| | 0 h | | 24 h | | 48 h | | 72 h | |
| | Efeitos | p | Efeitos | p | Efeitos | p | Efeitos | p |
| Média/interação | 6,8500 | 0,0376 | 26,0000 | 0,0355 | 31,7750 | 0,0055 | 32,5750 | 0,0015 |
| (A) Farelo | -1,7000 | 0,6387 | -2,2000 | 0,5868 | -2,5500 | 0,1352 | -1,1500 | 0,0826 |
| (B) Microrganismo | 0,0000 | 1,0000 | 0,0000 | 1,0000 | 5,4500 | 0,0640 | 3,7000 | 0,0258 |
| (C) Contaminação | 0,1000 | 0,5674 | 3,9000 | 0,4070 | -1,4500 | 0,2308 | -5,3000 | 0,0180 |
| AB | 0,0000 | 0,8354 | -1,4000 | 0,7137 | 2,5500 | 0,1352 | 3,8000 | 0,0251 |
| AC | -0,1000 | 0,6708 | -4,3000 | 0,3777 | -2,5500 | 0,1352 | -5,2000 | 0,0184 |
| BC | 0,0000 | 1,0000 | -2,1000 | 0,6010 | 2,4500 | 0,1406 | 0,1500 | 0,5000 |

bilidade seria que caso este último houvesse se formado durante a fermentação seria detectado um Rf superior ao da toxina.

Varga, Rigo e Téren (2000) mencionaram que alguns microrganismos decompõem a OTA pela ação de carboxipeptidases. A diminuição nos níveis desta toxina e o aparecimento de compostos não identificados nas condições do acompanhamento sugerem que estas transformações possam ter ocorrido também neste estudo.

Os percentuais de diminuição das concentrações das micotoxinas propiciadas pelas condições do planejamento experimental foram calculados a partir da diferença entre os níveis das micotoxinas no tempo zero de fermentação e os quantificados nos produtos fermentados nos tempos do estudo. Os resultados destas estimativas estão apresentados na Tabela 5.

Na Tabela 6 estão os resultados da análise estatística dos efeitos das variáveis: tipo de farelo (A), tipo de microrganismo (B) e nível de contaminação (C) nos percentuais de diminuição da contaminação.

Após 24 h de fermentação não houve diferença significativa ocasionada pelos efeitos substrato ($p = 0,8595$) e níveis iniciais de contaminação ($p = 0,5745$) nas concentrações residuais de AFA B₁.

Para a OTA, neste mesmo intervalo, houve diferença significativa nos níveis residuais explicada pelo microrganismo ($p = 0,0098$). O *Rhizopus* spp. reduziu em torno de 19,5% a mais que outro microrganismo.

A espécie do microrganismo ($p = 0,021$) e os níveis de contaminação de micotoxinas ($p = 0,0300$) influenciaram significativamente os níveis residuais de AFA B₁ após 48 h de fermentação. No mesmo intervalo os níveis residuais de OTA não foram afetados significativamente pelo tipo de farelo ($p = 0,3069$), microrganismo e teores iniciais dos contaminantes ($p = 0,2256$). Os farelos fermentados por 72 h não tiveram os níveis finais de AFA e OTA afetados pelos fatores estudados no planejamento.

Às 72 h de fermentação os níveis de residuais da AFA B₁ e da OTA foram maiores que nos intervalos menores, sugerindo que possivelmente as toxinas tenham se formado durante a fermentação, o que não é provável, pois não há relatos na literatura de toxigenicidade em *Aspergillus oryzae*. (MURPHY et al., 2006; BLUMENTHAL, 2003; SWEENEY e DOBSON, 1998).

Abrunhosa, Serra e Venâncio (2002) relataram a degradação da OTA por várias espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e

TABELA 5. percentuais médios de redução dos níveis de AFA B₁ e OTA durante a fermentação.

| Exp | 24 h | | 48 h | | 72 h | |
|--------|----------------------|-------|----------------------|-------|----------------------|-------|
| | AFA B ₁ % | OTA % | AFA B ₁ % | OTA % | AFA B ₁ % | OTA % |
| 1 (-1) | 65,7 | 57,4 | 68,1 | 59,7 | 67,3 | Nd |
| 2 (1) | 54,6 | 48,6 | 56,1 | 59,7 | 58,6 | 61,1 |
| 3 (-1) | 54,8 | 61,2 | 58,3 | 62,6 | 55,2 | 65,2 |
| 4 (1) | 43,4 | 48,1 | 45,5 | 65,2 | 43,4 | 48,6 |
| 5 (-1) | 44,3 | 34,1 | 82,9 | 44,1 | 38,6 | 64,1 |
| 6 (1) | 62,9 | 38,8 | 82,3 | 41,8 | 68,6 | 39,2 |
| 7 (-1) | 71,4 | 78,5 | 74,6 | 65,2 | 69,8 | 82,3 |
| 8 (1) | 65,4 | 78,0 | 67,6 | 80,6 | 66,1 | 73,8 |

Experimento - FAD (1, 3, 5, 7); FT (2, 4, 6, 8); *Aspergillus oryzae* (1, 2, 5, 6); *Rhizopus* spp. (3, 4, 7, 8); AFA B₁ (12 ng.g⁻¹); OTA (48 ng.g⁻¹) (1, 2, 3, 4); AFA B₁ (25 ng.g⁻¹) e OTA (95 ng.g⁻¹) (5, 6, 7, 8). Nd (não detectado).

TABELA 6. Análise estatística do efeito das variáveis farelo, microrganismo e contaminação nos níveis residuais de AFA B₁ e OTA.

| Fatores | AFA | | | | | |
|-------------------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|
| | 24 h | | 48 h | | 72 h | |
| | Efeitos | p | Efeitos | p | Efeitos | p |
| Média/interação | 60,7250 | 0,0559 | 65,3250 | 0,0007 | 52,1500 | 0,0207 |
| (A) Farelo | 2,4000 | 0,8595 | -6,6000 | 0,0145 | -10,4500 | 0,2003 |
| (B) Microrganismo | -2,8500 | 0,8343 | -12,5000 | 0,0076 | 12,6500 | 0,1672 |
| (C) Contaminação | 8,4500 | 0,5745 | 19,0500 | 0,0050 | 2,1000 | 0,6478 |
| AB | -12,6000 | 0,4482 | -3,7500 | 0,0255 | 1,2000 | 0,7840 |
| AC | 12,0000 | 0,4636 | 3,3000 | 0,0289 | 8,2500 | 0,2489 |
| BC | 6,4500 | 0,6546 | -1,4000 | 0,0680 | 13,7500 | 0,1543 |
| OTA | | | | | | |
| Média/interação | 56,6250 | 0,0017 | 58,0375 | 0,0138 | 61,4875 | 0,0410 |
| (A) Farelo | -6,0000 | 0,0318 | 4,8250 | 0,3069 | -15,3250 | 0,3038 |
| (B) Microrganismo | 19,5000 | 0,0098 | 18,5750 | 0,0860 | 4,6750 | 0,6607 |
| (C) Contaminação | 2,4000 | 0,0792 | -6,8250 | 0,2256 | -11,4250 | 0,3861 |
| AB | -3,0500 | 0,0624 | 2,3250 | 0,5262 | 3,8750 | 0,7105 |
| AC | 6,5500 | 0,0291 | 5,0250 | 0,2964 | 12,8750 | 0,3513 |
| BC | 19,4500 | 0,0098 | 15,6750 | 0,1017 | 30,2750 | 0,1630 |

Cladosporium, também salientando a formação de dois compostos por ação de carboxipeptidase A. Um dos compostos foi a ocratoxina α , que possuía baixa estabilidade e se convertia novamente em OTA. Este comportamento poderia justificar a menor descontaminação após 72 h de fermentação observada também neste trabalho.

Os dois fungos estudados vêm sendo empregados para o aumento da massa protéica em farelos para formulação de ração ou para a produção de insumos, como enzimas proteolíticas, amilolíticas, lipolíticas e compostos biossurfactantes (TANIWAKI, 2001; MORAES, 1999; HASAN et al., 2001). Os resultados deste trabalho mostraram que a presença de AFA B₁ e OTA dificultou a produção de biomassa fúngica, e possivelmente interferiria na produção de enzimas e de outros compostos de interesse tecnológico, sugerindo a necessidade de monitorar micotoxinas antes de processos fermentativos. Por outro lado, os efeitos de degradação de micotoxinas observados abrem uma perspectiva interessante para uso destes subprodutos para fins mais nobres, agregando valor e diminuindo o volume de descarte de material contaminado no meio ambiente.

4. CONCLUSÕES

A contaminação de farelos cereais por AFA B₁ ou OTA influenciou negativamente o desenvolvimento de *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* spp. em sistemas de fermentação sólida, quando esses foram avaliados pelos teores de proteínas no meio.

Após 48 h de fermentação em reatores de bandeja a 30 °C ocorreu uma queda de 80% nos níveis de AFA B₁ e 70% nos de OTA, respectivamente, pela ação de *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* spp.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à FAPERGS.

REFERÊNCIAS

ABRUNHOSA, L.; SERRA, R.; VENÂNCIO, A. Biodegradations of Ochratoxin A by Fungi Isolated from Grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 25, p. 7493-7496, 2002.

A.O.A.C. Association Of Official Analytical Chemists. Official Analysis of the A.O.A.C. Interantional. 17 ed. Washington D.C, USA, 2000.

BADIALE-FURLONG, E.; Dadalt, G.; Souza-Soares, L. A. Aflatoxinas, Ocratoxina A e Zearalenona em alimentos da Região Sul do Rio Grande do Sul. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 58, n. 2, p. 105-111, 1999.

BATA, A.; LASZTITY, R. Detoxification of Mycotoxin – Contaminated Food and Feed by Microorganisms. **Food Science and Technology**, Mysore, v. 10, n. 6-7, p. 223-228, 1999.

BLUMENTHAL, C. Production of Toxic Metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* and *Trichoderma reesei*: Justification of Mycotoxin Testing in Food Grade Enzyme Preparations derived from the Three Fungi. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. San Diego, v. 39, n. 1, p. 214-228, 2004.

BRAND, D. Biological Detoxification of Coffee Husk by Filamentous Fungi Using a solid State Fermentation System. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam. v. 27, n. 1, p. 127-133, 2000.

CHANDI, G. K.; SOGI, D. S. Functional properties of rice bran protein concentrates. **Journal of Food Engineering**, Davis, v. 79, n. 2, p.114-120, 2007.

HUWIG, A.; FREIMUND, S.; KAPPELI, O.; DUTLER, H. Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 122, n. 2, p. 179-188, 2001.

KIESELING, K. H. Biochemical Mechanism of Action of Mycotoxins. **Pure and Applied Chemistry**, NC/USA, v. 28, n. 2, p. 327-338, 1986.

MENDEZ ALBORES, A.; FLORES, F.; CASTANEDA-ROLDAN, E. The effect of roasting and boiling on the fats of B aflatoxins during pinole preparation. **Journal of Food Engineering**, Davis, v. 65, n. 4, p. 585-589, 2004.

MENDEZ-ALBORES, A.; VILLA, G. A. Aflatoxin detoxification achieved with Mexican traditional nixtamalization process (MTNP) is reversible. **Journal of the Science and Food Agriculture**, Washington, v. 84, n. 2, p. 1611-1614, 2004.

MORAES, A. F. **Enriquecimento Protéico do Farelo de Arroz por Fermentação Semi-Sólida em Biorreator de Coluna com Leito Fixo**. Rio Grande, 1999. 89 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

MURPHY, P. A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C. M. Food mycotoxins An update. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 71, n. 5, p. 51-65, 2006.

NIDERKORN, V.; BOUDRA, H.; MORGAVI, D. P. Binding of Fusarium mycotoxins by fermentative bacteria in vitro. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 101, n. 4, p. 849-856, 2006.

NUNES, I. L.; MAGAGNI, G.; BADIALE FURLONG, E. Arroz comercializado na região sul do Brasil: Aspectos Micotoxicológicos e Microscópicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 190-194, 2003.

PARRADO, J.; MIRAMONTES, E.; JOVER, M.; GUTIERREZ, J. F.; TERAN, L. C.; BAUTISTA, J. preparation of rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. **Food Chemistry**, London, v. 98, n. 4, p. 742-748, 2006.

SANZO, A. V. L.; HASAN, S. D. M.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E. Enhanced glucoamylase production in semi-continuous solid state cultivation of *Aspergillus niger* NRRL 3122. **Ciência & Engenharia**, São Paulo, v. 10, n. 2, p. 59-62, 2001.

SELVI, A .T. Inhibition of Growth and Aflatoxin Production in *Aspergillus flavus* by *Garcinia indica* Extract and Its Antioxidant Activity. **Food Microbiology**. Washington, v. 20, n.1, p. 455-460, 2003.

SINHA, K. K. Detoxification of Mycotoxins and Food Safety. In: **Mycotoxins in Agriculture and Food Safety**. New York: Eds. Marcel Dekker, 1998. p. 381-406.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal Association of the Official Analytical Chemists**, Washington, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, New York, v. 13, n. 2, p. 205-218, 2003.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Mycotoxin Production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* Species. **International Journal**

of Food Microbiology. Copenhagen, v. 43, n. 3, p. 141-158, 1998.

SUGIURA, Y. Introduction to Fungi. In: **Textbook for Country Focused Training Course: mycotoxin analysis for Federative Republic of Brazil**. Hyogo: International Centre Japan Interantional Cooperation Agency, 2001. 1-16 p.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. **Fungos em Alimentos – Ocorrência e Detecção**. Campinas, SP: Núcleo de Microbiologia - Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2001. 82 p.

UENO, Y. Toxicology of Microbial Toxins. **Pure and Applied Chemistry**, NC/USA, v. 58. n. 2, p. 339-350, 1986.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÉREN, J. Degradation of Ochratoxin A by *Aspergillus* Species. **International Journal of Food Microbiology**, Copenhagen, v.59, n. 1-2, p. 1-7, 2000.

VIEIRA, A. P.; BADIALE-FURLONG, E.; OLIVEIRA, M. L. M. Ocorrência de micotoxinas e características físico-químicas em farinhas

comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 221-225, 1999.

WEGST, W.; LINGENS, F. Bacterial Degradation of Ochratoxin A. **Microbiology Letters**, Amsterdam, v.17, p.341-344, 1983.

WESTBY, A.; REILLY, A.; BAINBRIDGE, Z. Rewiew of The Effect of Fermentation on Naturally Occurring Toxins. **Food Control**, Reading, v. 8, n. 5/6, p. 329-339, 1997.

YOSHIZAWA, T. General View on Mycotoxins. In: **Textbook for Country Focused Training Course: mycotoxin analysis for Federative Republic of Brazil**. Hyogo: International Centre Japan Interantional Cooperation Agency, 2001. 40 p.

ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. The distribution of phenolic acids in rice. **Food Chemistry**, London, v. 87, n. 3, p. 401- 406, 2004.