



# MÉTODOS DE DETEÇÃO DA INFESTAÇÃO OCULTA NOS GRÃOS DE ARROZ

A infestação oculta nos grãos de arroz é um problema de elevada importância para a indústria alimentar, pois existem pragas de insetos que passam a maior parte do seu ciclo de vida dentro dos grãos, provocando perdas de quantidade e qualidade. Assim, é necessário monitorizar a infestação oculta e desenvolver métodos de deteção eficazes para que a indústria possa implementar os meios de controle mais adequados.

Inês Sousa<sup>1,2</sup>, Ana Campos<sup>1</sup>, Carina Almeida<sup>1,3,4</sup>, Carla Brites<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária



<sup>2</sup> Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food (LEAF) Research Group, ISA, Universidade de Lisboa



<sup>3</sup> LEPABE – Laboratory for Process Engineering, Environment, Biotechnology and Energy, Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto



<sup>4</sup> ALiCE – Associate Laboratory in Chemical Engineering, Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto



<sup>5</sup> Green-IT Bioresources for Sustainability, ITQB NOVA



## Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais consumidos em todo o mundo (FAO, 2019) e a infestação por insetos é uma das principais razões de perda de quantidade e qualidade dos grãos durante o seu armazenamento (He *et al.*, 2022). Existem algumas espécies de insetos que estão especialmente adaptadas para atacar grãos de arroz inteiros e normalmente passam uma parte considerável do seu ciclo de vida no interior dos mesmos. Outras espécies, na sua fase de larva, criam um orifício de entrada no interior do grão, cobrindo-o após a entrada no mesmo. Mais tarde, após a fase de pupa, criam um orifício de saída do qual emerge o inseto adulto. Estes insetos constituem o que é designado por infestação oculta, cuja inspeção visual não consegue detetar. *Sitophilus oryzae* e *Sitophilus zeamais* são consideradas as espécies infestantes de insetos mais relevantes para o arroz armazenado e importantes de estudar nesta área. Estes insetos são pragas primárias (Mason & McDonough, 2012) que apresentam infestação cruzada (capacidade de infestar os grãos tanto no campo como no armazenamento) e se desenvolvem dentro do grão de arroz (Figura 1).



**Figura 1** – Pupa de *Sitophilus* spp. dentro do grão de arroz. Fonte: USDA Agricultural Research Center, Stored Insect Images Database (Download a 06/06/2022) <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=15651>.

Existem vários métodos convencionais para detectar infestação oculta nos grãos de arroz (ISO 6639:4:1987), contudo, utilizam técnicas morosas, obsoletas e não permitem identificar objetivamente a espécie infestante. Desta forma, a melhoria dos métodos disponíveis e o desenvolvimento de técnicas rápidas de detecção e de monitorização de infestação oculta é de maior relevância para todas as partes interessadas na cadeia de valor do arroz.

### Métodos convencionais

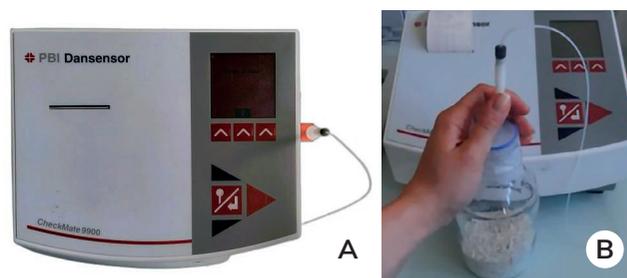
As técnicas mais convencionais são descritas na norma ISO 6639-4 de 1987 e incluem os seguintes métodos: determinação da produção de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), método da ninidrina, método da flotação de grãos, imagens de raio X e método acústico (Tabela 1).

### Determinação da produção de CO<sub>2</sub>

Este método baseia-se no facto de a concentração de CO<sub>2</sub> estar correlacionada com a existência de infestação oculta, como resultado da respiração dos insetos (Howe & Oxley, sem data). Neste caso, arroz infestado terá maior concentração de CO<sub>2</sub> e menor concentração de O<sub>2</sub>, comparativamente ao arroz não infestado. No entanto, o crescimento de fungos nos grãos de arroz, tais como *Aspergillus* spp., também pode fazer aumentar a produção de

quantidades significativas de CO<sub>2</sub>, levando a que este método não seja tão específico como outros já disponíveis. Porém, é possível estabelecer uma escala de concentração de CO<sub>2</sub> indicativa do nível de infestação, sendo um método de apoio à tomada de decisão para a indústria acionar meios de controle durante o armazenamento do arroz.

A otimização do método e a definição da escala utilizando um sensor moderno com capacidade de detectar a concentração de CO<sub>2</sub> (Figura 2) são objetivos dos estudos em curso. Tendo à disponibilidade equipamentos como o sensor PBI Dansensor, CheckMate 9900, a determinação da concentração de CO<sub>2</sub> poderá ser um método a ser implementado pela indústria alimentar.



**Figura 2** – A) Sensor de medição das concentrações de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (PBI Dansensor, CheckMate 9900 O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, Ringsted, Denmark). B) Medição das concentrações de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> numa amostra de arroz infestado por *Sitophilus* spp.

**Tabela 1 – Métodos convencionais para detecção de infestação oculta por insetos em cereais, de acordo com a norma ISO 6639-4 de 1987**

#### Métodos convencionais de detecção de infestação oculta

Método	Descrição	Eficácia da detecção		
		ovo	larva	pupa
Determinação da Produção de CO <sub>2</sub>	Concentração de CO <sub>2</sub> é correlacionada com a infestação por insetos (resultado da taxa de respiração dos insetos)	-	+++	+++
Método da Ninidrina	Reação colorimétrica da ninidrina com grupo α-amino livre de aminoácidos dos insetos produz corante de cor púrpura (púrpura de Ruhemann)	+	++	++
Método da Flotação de Grãos	Infestação oculta reduz a massa dos grãos, fazendo-os flutuar	-	+	+
Imagens de Raio X	Exposição de uma camada de arroz a raios X, seguida de inspeção para identificação visual de insetos nos grãos	+ / ++	+++	+++
Método Acústico	Identificação de padrões sonoros de movimentação e alimentação dos insetos	-	+++	-

Escala de eficácia: - nula, + razoável, ++ boa, +++ muito boa

### Método da ninidrina

O método da ninidrina baseia-se numa reação colorimétrica deste composto químico (cor amarela) com as proteínas dos insetos infestantes e que produz um corante de cor púrpura conhecido como púrpura de Ruhemann. Em termos práticos, quando um grão de arroz infestado é esmagado, os aminoácidos do fluido corporal do inseto reagem com a ninidrina que se encontra numa superfície de papel, dando origem a uma mancha de cor púrpura. Nesta técnica, os aminoácidos do grão de arroz não são libertados e não reagem, por isso, o número de manchas indica exatamente o nível de infestação oculta (ISO 6639-4, 1987).

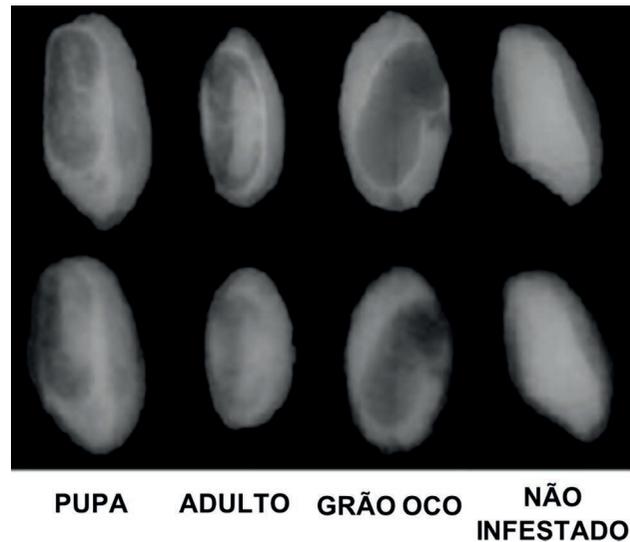
### Método da flotação de grãos

O método de flotação de grãos inteiros baseia-se no facto de a infestação oculta reduzir a massa dos grãos, fazendo-os flutuar. Na verdade, os insetos que provocam infestação oculta destroem o interior dos grãos. O inseto perfura o grão e destrói o seu interior, tapando de seguida o orifício de entrada com os detritos do grão. Desta forma, os grãos de arroz ficam ocos e conseqüentemente mais leves. Nesta técnica, quando se mergulham grãos sãos e infestados em água, os sãos afundam-se, enquanto os infestados flutuam à superfície. No entanto, este método é moroso e não é tão eficiente quanto outros métodos disponíveis para detetar a infestação oculta do arroz, principalmente porque é muito provável que o método produza uma estimativa significativamente abaixo do verdadeiro nível de infestação presente na amostra.

### Imagens de raio X

As técnicas de imagiologia por raios X baseiam-se na exposição dos grãos a raios X suaves, seguida de uma inspeção para identificar os insetos no interior dos grãos. A utilização de imagens de raios X para deteção interna de insetos tem muitas vantagens, pois é uma técnica rápida, não destrutiva e precisa, independentemente da fase de vida do inseto, sendo possível identificar a presença de larvas e pupas (Figura 3). Além disso, com os avanços de tecnologias e melhorias constantes, é possível obter ima-

gens que podem ser lidas e interpretadas com uma elevada precisão (Shah & Khan, 2014; Srivastava et al., 2020).



**Figura 3** – Imagem de raio X digital para os vários estádios larvares de *Sitophilus* spp., em grãos de trigo (Haff & Toyofuku, 2008).

### Método acústico

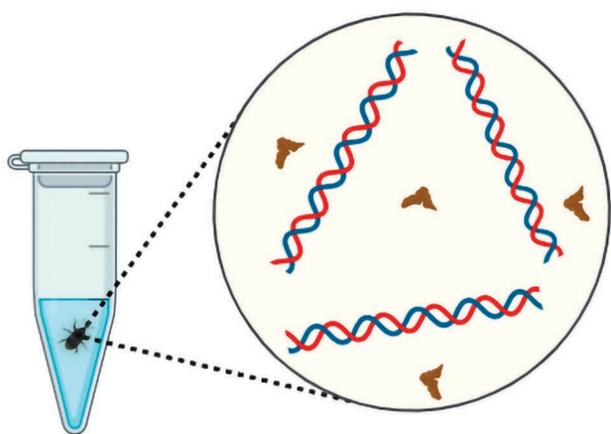
O método acústico para deteção de infestações de insetos baseia-se na identificação dos padrões sonoros das espécies de insetos que se pretende identificar. Um sensor de vibração acústica, ligado a um sistema de amplificação, transmitirá o ruído causado pela atividade alimentar e movimento dos insetos escondidos. A estimativa do grau aproximado de infestação oculta determina-se a partir do nível de ruído transmitido. A utilização desta tecnologia para aplicações de controlo de pragas de insetos aumentou significativamente entre 1980 e 2010 (Mankin et al., 2021).

Para além do interesse em melhorar e modernizar os métodos convencionais, surge a necessidade de desenvolver e testar novas técnicas moleculares mais específicas, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR em tempo real ou a PCR quantitativa (qPCR) que permitem identificar, geneticamente, a espécie de inseto infestante.

## Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O interesse em utilizar as técnicas de base molecular, que detetam regiões genéticas específicas de uma espécie, surge devido à sua exatidão, sensibilidade, especificidade e rapidez na obtenção de resultados.

No entanto, a utilização de PCR para detetar a presença de insetos encontra-se ainda numa fase de otimização. A maior parte dos trabalhos de investigação utilizam a PCR para identificar e amplificar regiões de ADN específicas de espécies de insetos (Figura 4), podendo vir a ser validada para detetar com precisão e mesmo quantificar a infestação precoce (Negi *et al.*, 2021).



**Figura 4** – Representação de amplificação de regiões específicas do ADN de insetos.

Estas técnicas poderiam ser facilmente implementadas como técnicas de rotina, tal como acontece nos sistemas de autocontrolo em segurança alimentar ou nos testes de adulteração. Todo o processo de análise da amostra, incluindo a preparação da mesma, a extração de ADN, a preparação da PCR, a amplificação e a análise dos resultados, pode normalmente ser concluído em poucas horas. Alguns laboratórios podem fornecer resultados no mesmo dia ou no dia seguinte para análises de rotina, processo este que se pode ajustar à dinâmica das empresas. Para os planos de controlo da segurança alimentar, podem ainda ser implementados esquemas de amostragem para recolher amostras representativas, tendo em consideração a avaliação

de risco de cada empresa. No entanto, estas técnicas requerem uma configuração laboratorial, pelo que não substituem os métodos de deteção *in situ*; mas podem certamente complementar com informações relevantes e altamente precisas.

## Conclusões

O arroz é um alimento básico para cerca de metade da população mundial, por isso, é importante procurar soluções que minimizem as perdas e garantam a qualidade e a segurança dos alimentos para os consumidores. As alterações climáticas perspetivam um aumento do risco de infestação no arroz, devido aos aumentos de temperatura e ao desenvolvimento nos insetos de mecanismos de resistência às substâncias ativas aplicadas nos tratamentos de fumigação. A melhoria dos métodos de deteção e monitorização de infestações ocultas está a ser investigada através do projeto TRACE-RICE e é útil para a adoção de medidas de gestão e controlo de qualidade e interessa a todos os atores da fileira do arroz. 🌾

## Agradecimento

TRACE-RICE with Grant Number 1934 (2020-2024), is part of the PRIMA Programme supported by the European Union. C. Brites agradece os projetos UIDB/04551/2020 e UIDP/04551/2020. C. Almeida agradece ainda o apoio financeiro dos projetos LA/P/0045/2020 (ALiCE), UIDB/00511/2020 e UIDP/00511/2020 (LEPABE), financiados por fundos nacionais através de FCT/MCTES (PIDDAC).



### Referências Bibliográficas

- FAO (2019). Food Balances (2010-). Food and Agriculture Organization. Available in <https://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS> (acedido a 10 abril 2023).
- Haff, R.P. & Toyofuku, N. (2008). X-ray detection of defects and contaminants in the food industry. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, 2(4): 262–273. <https://doi.org/10.1007/s11694-008-9059-8>.
- He, P.; Yang, W.; Ali, S.; Lin, H.; Jiang, H.; Shi, Z.; Li, H.; Chen, Q. (2022). A solid-phase porphyrin and boron-dipyrromethene sensing platform for the infestation detection of two main hidden pests in rice. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 364. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.131843>.
- Howe, R.W. & Oxley, T.A. (sem data). *The use of carbon dioxide production as a measure of infestation of grain by insects* (pp. 11–22). Pest Infestation Laboratory.
- ISO 6639-4. (1987). Cereals and pulses – Determination of hidden insect infestation – Part 4: Rapid methods. *International Organization for Standardization* (1.ª ed.).
- Mankin, R.; Hagstrum, D.; Guo, M.; Eliopoulos, P.; Njorge, A. (2021). Automated Applications of Acoustics for Stored Product Insect Detection, Monitoring, and Management. *Insects*, 12(3):259. <https://doi.org/10.3390/insects12030259>.
- Mason, L.J. & McDonough, M. (2012). Biology, Behavior, and Ecology of Stored Grain and Legume Insects. In: D.W. Hagstrum, T.W. Phillips & G.W. Cuperus (Eds.), *Stored product protection* (pp. 7–12). K-State Research and Extension.
- Negi, A.; Anandharaj, A.; Kalakandan, S.; Rajamani, M. (2021). A Molecular Approach for the Detection and Quantification of *Tribolium castaneum* (Herbst) Infestation in Stored Wheat Flour. *Food Technology and Biotechnology*, 59(1):112–121. <https://doi.org/10.17113/ftb.59.01.21.6902>.
- Shah, M.A. & Khan, A.A. (2014). Imaging techniques for the detection of stored product pests. *Applied Entomology and Zoology*, 49(2):201–212. Springer Japan. <https://doi.org/10.1007/s13355-014-0254-2>.
- Srivastava, S.; Mishra, G.; Mishra, H.N. (2020). Application of an expert system of X- ray micro computed tomography imaging for identification of *Sitophilus oryzae* infestation in stored rice grains. *Pest Management Science*, 76(3):952–960. <https://doi.org/10.1002/ps.5603>.



## A PLATAFORMA DE COMUNICAÇÃO DOS PROFISSIONAIS DE AGRONEGÓCIOS

### ASSINE A VIDA RURAL

Conteúdos exclusivos

Edição impressa e digital

App disponível em IOS ou Android

Leitura online e offline

Acesso a números antigos na App

Acesso a conteúdos premium

Organização de conteúdos por área de interesse

[www.vidarural.pt](http://www.vidarural.pt)