



IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES INTERGÊNICAS, ASSOCIADAS A GENES DE AFLATOXINA, EM FUNGOS DO GÊNERO *ASPERGILLUS* PRESENTES EM AMOSTRAS DE AMENDOIM VENDIDAS NO COMÉRCIO VAREJISTA DE MARINGÁ - PR

Gislaine de Lucena¹; Nathan Gomes Modesto²; Alessandra Valéria de Oliveira³

RESUMO: Micotoxinas são moléculas tóxicas produzidas por fungos, sendo que os fungos do gênero *Aspergillus* são responsáveis pela produção de duas das principais micotoxinas presentes em alimentos, as aflatoxinas e a ocratoxina A (OTA), tóxicas para seres humanos e outros animais e responsáveis por causar efeitos fisiopatológicos no organismo, como a ação teratogênica e carcinogênica. Muitos alimentos são susceptíveis a contaminação por fungos. Os grãos como, o amendoim e a castanha, são os mais acometidos. Esse contágio é facilitado, sobretudo, pela umidade do ambiente e pode ocorrer pelo manejo inadequado no transporte e armazenamento. Como existe um considerável consumo desse grão, há uma preocupação com os danos que as aflatoxinas quando presentes podem causar à saúde. Esse projeto tem o objetivo de detectar a presença de regiões intergênicas associadas a genes produtores de aflatoxina em fungos do gênero *Aspergillus* presentes em amostras de amendoim vendidas no comércio varejista de Maringá/PR. Para realizar esta análise, as amostras serão coletadas de pontos de venda aleatórios de Maringá-PR, e serão submetidas à cultura em meio ágar para obtenção do micélio. O DNA será posteriormente extraído das amostras, amplificado e clivado com enzimas de restrição, com o objetivo de se verificar a presença das regiões intergênicas e discriminar as espécies contaminantes.

PALAVRAS-CHAVE: Aflatoxinas; Detecção molecular; Grãos.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem uma grande quantidade de produtos agrícolas contaminados por fungos. A invasão por esses microrganismos pode ocorrer no solo, durante o processo de formação das sementes (ROSSETTO et al., 2003), na colheita, como também nas fases de secagem, beneficiamento e armazenamento (BRUNO et al., 2000, FONSECA, 2002). Um dos fatores primordiais para a contaminação dos grãos por fungos é o elevado teor de água presente nas sementes. De acordo com Moraes & Mariotto (1985), os mais frequentes são *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Fusarium spp.* e *Rhizopus spp.*

Alimentos como grãos são muito susceptíveis a contaminação por fungos produtores de micotoxinas, que constituem produtos metabólicos secundários, os quais pertencem a diferentes classes químicas e possuem diversos efeitos como a ação teratogênica, imunossupressora, nefrotóxica, hepatotóxica e carcinogênica sobre a saúde humana (BULLERMAN, 1979). Essas toxinas são muito estáveis e resistem às altas

¹ Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – Paraná. Bolsista do Programa de Bolsas de Indução (PROIND). gdlucena@hotmail.com

² Acadêmico do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – Paraná. nathangomes@hotmail.com

³ Orientadora, Professora Doutora do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Cesumar – UNICESUMAR. alessoli@cesumar.br

temperaturas. As epidemias causadas por elas são raras, mas o efeito carcinogênico devido à longa exposição a pequenas quantidades constitui um dos maiores riscos. (LUBULWA, DAVIS 1994).

De acordo com Fao (2009), os fungos produtores de micotoxinas são responsáveis por perdas econômicas em diversos produtos agrícolas, além disso, atingem a produtividade animal, e o comércio nacional e internacional e tem seu efeito estendido na cadeia alimentar até o consumidor. Ainda em relação à agricultura as perdas de qualidade se devem à contaminação por fungo e pela toxina produzida por eles, diminuição da produtividade, custos relacionados ao controle e não aceitação do produto pelo mercado importador. Aproximadamente 25% da agricultura mundial é afetada por fungos produtores de micotoxinas o que leva a perda de alimentos em grande escala (MIDORIKAWA, 2009).

As micotoxinas variam em grau de severidade, algumas são letais e outras não causam impactos a saúde humana e animal. Mais de 350 micotoxinas já foram isoladas, dessas 20 são comumente encontradas em diversos alimentos (PERRONE, 2007). As aflatoxinas são produzidas pelo gênero *Aspergillus*, principalmente pelo *A. flavus* e *A. parasiticus* e estão associados principalmente a produtos agrícolas como castanha, amendoim e soja (MIDORIKAWA, 2009). A presença de regiões intergênicas associadas à genes de aflatoxina pode ser verificada em *A. flavus* e *A. parasiticus* através de testes moleculares, que detectam polimorfismos no DNA e discriminam as 2 espécies.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Coleta da amostra

As amostras de amendoim *in natura* serão coletadas a partir de distintos pontos de venda escolhidos de forma aleatória no comércio de Maringá, Paraná.

Preparação de cultura para isolamento de *Aspergillus*

Para o isolamento de colônias do *A. flavus* fragmentos da amostra serão colocados em placas de petri com ágar-ágar (1,5%), mantidos em condições de 12 horas no escuro e 12 horas de luminosidade e com temperatura variando entre 23-28°C. Após o surgimento das colônias, isolados de *A. flavus* serão transferidos para uma cultura pura, cultivados em tubos de ensaio e placa de petri com cultura Czapek (100 ml de água destilada, 30 g de NaNO₃, 5 g de KCl, 5 g MgSO₄ e 0,1 de FeSO₄) e com extrato de levedura (CYA).

Extração de DNA das amostras:

As amostras serão preparadas para a extração de DNA através da cultura em meio ágar, para obtenção do micélio. A cada 10mg do micélio serão utilizados 0,2mL do tampão de extração (3% SDS; 0.5mM EDTA; 1.0M NaCl; 0.1mM Tris-HCl pH 8.0). Essa suspensão será agitada vigorosamente por 15 segundos. Em seguida, 0,2mL de solução clorofórmio-fenol (1:1) serão adicionados lentamente à suspensão e esta será incubada à 65°C por 5 minutos. A mistura deverá ser resfriada naturalmente e centrifugada a 10.000 rpm, 4°C por 5 minutos. O sobrenadante será transferido para um novo micro tubo, no qual será adicionada uma solução gelada de etanol absoluto em volume igual ao existente de sobrenadante. Para a precipitação de DNA a mistura será armazenada por 20 minutos à -20°C. Após a precipitação a mistura será centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos. O

pellet gerado será lavado duas vezes com etanol 75% e centrifugado à 10.000 rpm, 4°C por 5 minutos. O sobrenadante será descartado e o pellet ressuspendido em 0,03mL de água ultrapura e será armazenado a – 80°C.

Amplificação por PCR e corte com enzimas de restrição

Para o diagnóstico molecular das espécies de *Aspergillus* será usada a técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) que irá amplificar segmentos de DNA usando *primers* específicos. O resultado da PCR será observado por eletroforese em gel de agarose, onde os produtos da PCR serão separados por tamanho, a visualização dos fragmentos de DNA será feita sob luz ultravioleta. Posteriormente a região amplificada será clivada com enzimas de restrição para verificação do polimorfismo genético.

3. RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se com este trabalho discriminar espécies de fungos contaminantes de alimentos através da amplificação do gene de aflatoxina e posterior corte com enzimas de restrição.

4. REFERÊNCIAS

BRUNO, R. L. A. et al. **Qualidade fisiológica e microflora de sementes de amendoim cv. Br-1 durante o armazenamento.** Revista de Oleaginosa e Fibrosa, Campina Grande, 2000.

BULLERMANN, L. B. **Significance of micotoxins to food safety and human health.** Journal of food protection, 1979.

FONSECA, H. Estudo da aflatoxina no amendoim, da colheita à industrialização. *Anais ESALQ*, v. 33, p. 365-405, 1976 apud CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.

LUBULWA, A. S. G.; DAVIS, J. S. Estimating the social costs of the impacts of fungi and aflatoxins in maize and peanuts. In: **Stored Product Protection. Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-product Protection.** Highley, E, Wright, E J, Banks, H J and Champ, B R (eds). CAB International, Wallingford, UK, 1994.

MIDORIKAWA, G. E. O. **Desenvolvimento de um método de PCR específico para detecção de *Aspergillus flavus* aflatoxigênico em grãos brasileiros,** 2009. Dissertação de Mestrado.

MORAES, S. A.; MARIOTTO, P. R. Diagnóstico da patologia de sementes de amendoim no Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.7, 1985.

PERRONE, G. et al. Biodiversity of aspergillus spp. in some important agricultural products. **Studies in mycology**, vol.59, n.1, p.53-66, 2007.

ROSSETTO, C. A. V. et al. Contaminação fúngica do amendoim em função das doses de calcário e das épocas de amostragem. **Bragantia**, Campinas, v.62, 2003.