



## IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE POLIMORFISMO GENÉTICO DE FUNGOS *ASPERGILLUS NIGER* E *ASPERGILLUS CARBONARIUS* EM CASTANHA DO PARÁ E AMENDOIM VENDIDOS NO COMÉRCIO DE MARINGÁ- PR

Jéssica Hellen da Silva<sup>1</sup>, Janaina Nicolau de Oliveira<sup>2</sup>, Fabiana Alves Calderani<sup>2</sup>,  
Cintia Corteccioni Nuñez Del Prado<sup>2</sup>, Alessandra Valéria de Oliveira<sup>3</sup>.

**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). A ocratoxina A, porém, é a toxina mais frequentemente encontrada em alimentos e também a mais tóxica, pois pode causar efeitos nefrotóxicos, imunossupressores, carcinogênicos e teratogênicos. A OTA pode ser encontrada em diversos alimentos, porém está mais presente em cereais e grãos, devido à contaminação prévia por fungos como *A. niger* e *A. carbonarius*. Portanto o objetivo deste trabalho consiste em avaliar a presença dos fungos *A. niger* e *A. carbonarius* em amostras de castanha do pára e amendoim obtidas a partir do comércio de Maringá-PR, e realizar análise comparativa de variabilidade genética entre as duas espécies, a fim de estimar se a população da região pode estar exposta à contaminação fúngica e conseqüentemente às toxinas. Para realizar esta análise, as amostras serão coletadas de pontos de venda aleatórios de Maringá -PR, e serão submetidas à cultura em meio SDA com cloranfenicol, seguida de extração de DNA, e amplificação com *primers* aleatórios para identificação e estudo de variabilidade genética. Portanto espera-se com este trabalho encontrar os fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* em amostras de castanha do pára e amendoim vendidas no comércio de Maringá-PR e realizar amplificação via RAPD para comparação dos fragmentos gerados a fim de se avaliar polimorfismo genético entre as duas espécies.

**PALAVRAS-CHAVE:** Micotoxinas, OTA, PCR, RAPD.

### 1. INTRODUÇÃO

Micotoxinas são moléculas tóxicas produzidas por fungos, classificadas também como metabólitos secundários (VOGEL & JIMÉNEZ, 2006; WELKE *et al.* 2009), já que não são essenciais à sua sobrevivência. Estas moléculas são principalmente encontradas em alimentos produzidos na agricultura (FUNGARO & SARTORI, 2009; PERRONE *et al.* 2007) devido à contaminação prévia por determinadas espécies fúngicas.

<sup>1</sup> Acadêmico do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – Paraná. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica e Tecnológica (PROBIC) jessicahellen\_16@hotmail.com.br

<sup>2</sup> Acadêmicos do Curso Biomedicina do Centro Universitário de Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – Paraná.

<sup>4</sup> Orientadora, Professora Doutora do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Cesumar – UNICESUMAR. alessandra.oliveira@unicesumar.edu.br

Segundo Vogel e Jiménez (2006), fungos do gênero *Aspergillus spp.* são responsáveis pela produção de duas das principais micotoxinas presentes em alimentos, as aflatoxinas e a ocratoxina A (OTA). Ambas as toxinas estão bastante descritas na literatura devido ao seu potencial tóxico em humanos e animais (FUNGARO & SARTORI, 2009). Peraica *et al.* (1999) afirma que as aflatoxinas podem ocasionar toxicidade em diversos sistemas orgânicos, sendo o fígado o mais atingido, observando-se carcinogenicidade. A ocratoxina A, porém, é a toxina mais frequentemente encontrada em alimentos e também a mais tóxica, pois pode causar efeitos nefrotóxicos, imunossupressores, carcinogênicos e teratogênicos (PERAICA *et al.* 1999; MATEO *et al.* 2007; CHIOTTA *et al.* 2009).

Esta toxina consiste em um metabólito dos fungos *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. tubingensis* e *A. ochraceus* (PEREYRA *et al.* 2010), que podem contaminar o alimento nos processos de amadurecimento, estocagem, transporte, até o consumo do material final (LUGAUSKAS *et al.* 2007; FONSECA 1976 apud CALDAS *et al.* 2002).

Considerando que cereais e grãos constituem a principal fonte de OTA na dieta humana e ainda que fatores climáticos influenciam na contaminação fúngica e produção de micotoxinas, a pesquisa micológica destes alimentos se faz necessária, a fim de avaliar se os grãos vendidos e consumidos na região de Maringá especificamente, estão contaminados com fungos produtores de micotoxinas, como o *A. niger* e *A. carbonarius*, que apresentam destaque nesta produção.

Os fungos *Aspergillus niger* e *A. carbonarius* fazem parte de um grupo denominado "*the black aspergilli*" pois representam um grupo de fungos que se assemelham morfológicamente, apresentando coloração negra (PERRONE *et al.* 2007; FERRACIN *et al.* 2009). Alguns pertencem ainda ao agregado niger, sendo ainda mais difícil identificá-los visualmente. Portanto torna-se necessário utilizar métodos mais específicos para sua identificação do que a avaliação macroscópica e microscópica, como a reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*), que utiliza primers específicos para a identificação de cada espécie presente no alimento.

Sendo assim este trabalho objetivou avaliar a presença dos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* em amostras de castanha e amendoim obtidas a partir do comércio de Maringá-PR e realizar análise comparativa de variabilidade genética entre as duas espécies.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas 47 amostras, sendo 25 de amendoim e 22 de castanhas do Pará, a partir de vários pontos de venda escolhidos aleatoriamente na cidade de Maringá -PR.

Estas amostras foram inoculadas em meio Sabourand Dextrose Agar (SDA), com clorfenicol, um antibiótico que impede a proliferação de bactérias. Este procedimento foi realizado em condições assépticas, e o aspecto do crescimento fúngico foi avaliado a partir do quinto dia de cultura.

Foram identificadas como positivas as placas que apresentaram crescimento fúngico com aspecto granuloso (pimenta-do-reino), e coloração negra, com reverso de cor creme com ou sem pregas. (COOK & FISHER 2001)

Parte do micélio foi transferido para microtubo contendo 500uL de meio de cultura dextrose-batata, por 7 dias. Após o crescimento, o processo de extração teve início, e o tampão de extração utilizado é composto de 200 mM Tris HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA e 0.5% SDS. Ao final da extração, o pellet foi ressuspenso em tampão TE e congelado, de acordo com o protocolo de Cenis (1992), com adaptações.

A quantificação do DNA extraído foi realizada em gel de agarose 1% com brometo de etídio, e a visualização efetuada em aparelho transluminador.

A metodologia para amplificação de ácidos nucléicos está baseada em Muller *et al.* (1998), porém com adaptações. Os reagentes utilizados para a reação de PCR serão o tampão 10X PCR Buffer (1,3uL), água ultra-pura (6,48uL), magnésio (0,52uL), nucleotídeos (1,0uL), primers (1,0uL), Taq Polimerase (0,3uL) e o DNA (1,0uL).

Serão utilizados *primers* específicos para *A.niger* e para *A. carbonarius*, conforme Fungaro & Sartori (2009), e um *primer* aleatório para a técnica de RAPD, baseada em Müller *et al.* (1998).

O ciclo de PCR utilizado será composto por 1 ciclo inicial de 94°C por 5 minutos, e 45 ciclos de 94°C por 1 minuto, 35°C por 2 minutos e 72°C por 3 minutos, de acordo com Lourenço (2007)

A visualização dos resultados de amplificação será realizada através de gel de agarose 1,4% corado com brometo de etídio.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas coletas e análises de 47 amostras. Dessas, 28 foram positivas para a presença de agregado Níger, conforme a Figura 1.

A extração e quantificação de DNA foi realizada em todas as amostras, que posteriormente serão amplificadas por reação em cadeia de polimerase (PCR), para a obtenção dos fragmentos específicos de cada espécie e que serão úteis para análise de variabilidade genética.



**Figura 1:** Amostra considerada positiva devido ao aspecto morfológico visualizado (agregado niger)

Neste trabalho espera-se encontrar cepas dos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* em amostras de castanha e amendoim vendidas no comércio de Maringá-PR e realizar amplificação via RAPD para comparação dos fragmentos gerados a fim de se avaliar polimorfismo genético entre as duas espécies.

### 4. REFERÊNCIAS

CENIS, J. L. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, v. 20, n. 9, p. 2380, 1992.

CHIOTTA, M. L.; PONSONE, M. L.; COMBINA, M.; TORRES, A. M.; CHULZE, S. N. *Aspergillus* section nigri isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. *International Journal of food microbiology*, vol. 136, p. 137-141, 2009.

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.

, M. H. P.; SARTORI, D. An overview on molecular markers for detection of ochratoxigenic fungi in coffee beans. *Brazilian archives of biology and technology*, vol.52, p.1-9, novembro 2009.

LUGAUSKAS, A.; RAILA, A.; ZVICEVICIUS, E.; RAILIENE, M.; NOVOSINSKAS, H. Factors determining accumulation of mycotoxin producers in cereal grain during harvesting. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, v. 14, p. 173-186, 2007.

PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of world health organization*, vol. 77, n. 9, 1999.

PEREYRA, C. M.; CAVAGLIERI, L. R.; CHIACCHIERA, S. M.; DALCERO, A. M. Fungi and mycotoxins in feed intended for sows at different reproductive stages in Argentina. *Veterinary medicine international*, 2010.

PERRONE, G.; SUSCA, A.; COZZI, G.; EHRLICH, K.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; MEIJER, M.; NOONIM, P.; MAHAKAMCHANAKUL, W.; SAMSON, R. A. Biodiversity of aspergillus spp. in some important agricultural products. *Studies in mycology*, vol.59, n.1, p.53-66, 2007.

VOGEL, S. D.; JIMÉNEZ, L. C. V. Micotoxinas en la salud pública. *Revista salud pública*, vol. 8, n. 1, p. 129-135, 2006.

WELKE, J. E.; HOELTZ, M.; NOLL, I. B. Aspectos relacionados à presença de fungos toxigênicos em uvas e ocratoxina A em vinhos. *Ciência rural*, vol.39, n.8, p.2567-2575, novembro 2009.