



IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Aspergillus* EM GRÃOS DE SOJA E MILHO ARMAZENADOS EM COOPERATIVAS DE MARINGÁ E REGIÃO

*Amanda dos Santos Luiz*¹, *Lígia Carla Balin*², *Lilian Capelari Soares*³, *Adriana Fiorini*⁴

RESUMO: A agricultura é um dos fatores mais rentáveis no Brasil, além de ser uma das maneiras de sustento das famílias rurais e urbanas. As culturas mais cultivadas no Brasil são soja, milho e arroz. Fungos do gênero *Aspergillus* podem contaminar grãos de soja e milho durante seu armazenamento e pode produzir micotoxinas, como as aflatoxinas, prejudiciais a saúde de quem os consome. O objetivo desse trabalho foi identificar, através de técnicas moleculares, fungos da espécie *Aspergillus flavus* e estabelecer uma correlação do tempo de armazenamento dos grãos com a contaminação fúngica. Foram coletadas sementes de milho e soja em diferentes silos da região de Maringá-PR, e posteriormente realizada cultura para fungos em meio de cultivo específico. Após o isolamento e caracterização dos fungos em meio de cultura, foi realizada a extração do DNA genômico e amplificação, pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), das regiões IGS e β -tubulina. Os produtos de amplificação da região IGS foram submetidos a clivagem com a enzima de restrição *Bgl*II, para a confirmação da espécie, pela técnica de PCR-RFLP. Das amostras coletadas 68,75% estavam contaminadas por *Aspergillus spp.*, seguindo análises microbiológicas. Destas, 31,25% resultou positivo para a espécie *Aspergillus flavus*. Os outros 37,5% foram dadas como negativas, por vários fatores, um deles a sensibilidade da técnica de PCR. Foi possível concluir que um pouco menos da metade das amostras encontrava-se contaminada por *Aspergillus spp.*

PALAVRAS-CHAVE: Alimento; Contaminação; Fungo.

1 INTRODUÇÃO

Um dos aspectos mais importantes dos grãos para a saúde humana está em completar uma alimentação equilibrada, além de beneficiar a saúde. Dentre os grãos mais consumidos está a soja, que, segundo a Embrapa Soja (2002), é considerada um alimento funcional, pois fornece nutrientes ao organismo, tem ação na prevenção de doenças crônico-degenerativa e também é uma excelente fonte de minerais como ferro, potássio, fósforo, cálcio e vitaminas do complexo B. O milho, por sua vez, também é de suma importância para a alimentação humana, pois é um alimento energético, digestível e com alto teor de amido.

O processo realizado durante o cultivo até a distribuição as sementes destes grãos está condicionado à contaminação por fungos, isso acontece porque os grãos apresentam componentes alimentares destes microrganismos, além de vários outros fatores. Os gêneros mais frequentemente encontrados são *Aspergillus* e *Penicillium*, os chamados fungos de armazenamento (SWEENEY; DOBSON, 1998).

Várias técnicas permitem a identificação de fungos em contaminações de alimentos. Para uma inspeção rápida, pode-se analisar a morfologia dos fungos crescidos em placas com meios de cultura. Porém, há certa dificuldade ao usar esta técnica, devido ao fato de que alguns esporos de fungos possuem morfologia semelhante, assim é inviável a sua identificação em nível de gênero, como pode acontecer durante a diferenciação de *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* ou entre espécies bastante semelhantes como *A. flavus* e *A. parasiticus*, por isso é usada as análises moleculares (MEZZARI *et al.*, 2003).

O marco para o desenvolvimento das técnicas de diagnóstico molecular foi a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), um método de amplificação, *in vitro*, de fragmentos específicos de ácidos nucleicos, proposto por Kary Mullis, em 1987. A PCR permite a amplificação de sequências específicas de ácido desoxirribonucleico (DNA), sendo que a característica principal dessa técnica é amplificar exponencialmente cópias do material genético a partir de pouca quantidade dele, permitindo uma alta especificidade e aplicabilidade com centenas de métodos descritos (MESQUITA *et al.*, 2001).

Adicionalmente à PCR, o DNA amplificado pode ser clivado com uma ou mais enzimas de restrição, o resultado é a presença de diferentes fragmentos de restrição, que podem servir como um *fingerprint* genético de uma determinada espécie. Esta técnica é denominada de PCR-RFLP (Restriction Fragment Length

¹ Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – PR. Bolsista PIBIC/CNPq-UniCesumar. amandinha2@hotmail.com

² Graduada em Ciências Biológicas - Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – PR. ligia_balini@hotmail.com

³ Orientadora e docente do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – PR. licapelaribio@gmail.com

⁴ Doutora em Biologia Celular e Molecular pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá-PR.. drifiorini@gmail.com



Polymorphisms). Vários autores tem usado esta técnica para a diferenciação de espécies fúngicas. As espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, ambas produtoras de aflatoxinas e com morfologia semelhante, podem ser diferenciada através desta técnica (KHOURY *et al.*, 2011). A PCR-RFLP é uma metodologia barata, rápida e segura, comparada com técnicas de sequenciamento de ácidos nucleicos.

Como as aflatoxinas podem ser produzidas tanto por *Aspergillus flavus* quanto por *Aspergillus parasiticus*, os isolados fúngicos, das amostras de grãos de soja e milho, caracterizados inicialmente pertencentes ao gênero *Aspergillus*, foram identificados através da técnica molecular de PCR-RFLP, para confirmação no nível de espécie. Portanto, diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi de confirmar a identidade de *Aspergillus flavus*, presentes ou não em grão de soja e milho, a fim de descobrir em qual dos grãos há a maior prevalência deste fungo produtor de aflatoxina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento do fungo Aspergillus flavus

Foram coletadas amostras de grãos de soja e milho em 8 silos de cooperativas da região de Maringá, a fim de analisar 16 amostras de semente sendo 8 de milho e 8 de soja, em diferentes períodos de armazenamento, onde uma amostra da semente, seja de soja ou milho, com mais tempo armazenada e a outra com menos tempo armazenada, a fim de comparar qual a prevalência dos fungos, seguindo o fator tempo de armazenamento

A coleta foi realizada no período de abril a julho de 2014. Os grãos foram mantidos em embalagens plásticas estéreis e em seguida armazenados a 4°C, para análises posteriores.

O isolamento de *Aspergillus flavus* foi realizado em duplicata primeiramente, onde foram colocados 2 a 3 grãos em placa de Petri com meio Agar *Sabouraud* e cloranfenicol, e mantidos a temperatura ambiente, por aproximadamente 7 dias, como demonstra a Figura 1. Após o crescimento dos fungos existentes em cada grão, foram selecionados apenas aqueles que, cuja morfologia, segundo a literatura, era de *Aspergillus flavus*. A seleção do fungo de interesse foi realizada com o auxílio de uma alça de platina flambada ainda quente e passada sobre os fungos que não fazia parte deste grupo, para o isolamento apenas de *Aspergillus spp.* Fragmentos desse fungo foram transferidos para outra placa de Petri (repique) com o mesmo meio de cultura e mantidos, novamente, por aproximadamente 7 dias, a temperatura ambiente.

Extração de DNA

Após o crescimento do micélio, a colônia do repique foi transferida para um microtubo de 1 mL, para proceder a extração de DNA, de acordo com o protocolo descrito por De Hoog *et al.* (2005), com algumas modificações. Ao tubo com o material fúngico foram acrescentados 400 µL de tampão de lise (Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, EDTA 0,005 M, pH 8,0, NaCl 0,1 M e SDS a 1 %) e a reação mantida por aproximadamente 10 min a -20 °C. Após este período, foram adicionadas pérolas de vidro e os fracos agitados 2x em Vortex por 30 segundos, com intervalo no gelo de 30 segundos, para cada amostra. Para a lise celular, foi adicionado 5µL de Proteinase K (a 20 mg/mL), o tubo homogeneizado e a reação incubada em banho-maria, a 60 °C, por 30 min. Após esta etapa, foi acrescentado 162 µL de tampão CTAB (200 mM Tris-HCl, pH 7,5; 200 mM Na-EDTA, 8,2% NaCl, 2% CTAB), e a reação incubada por 10 min a 65 °C.

Posteriormente foram acrescentados 570 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), o tubo homogeneizado e incubado por 30 min em gelo. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 13.200 rpm, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 10% do volume de solução de acetato de sódio 3M. A solução foi armazenada a 0 °C por 30 min e centrifugada a 13.200 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e adicionado 50% do volume total de líquido de isopropanol gelado, seguido de centrifugação na mesma velocidade, por 5 min. O *pellet* de DNA foi lavado 200 µL de etanol 70% gelado, por centrifugação a 13.200 rpm por 5 min, o sobrenadante desprezado e, após secagem, o DNA foi ressuspendido com 50 µL de tampão TE (Tris-HCl 0,01 M e EDTA 0,001 M). O DNA foi incubado a 65 °C por 60 min, para hidratação. As amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C.

Quantificação do DNA genômico

A quantificação das amostras de DNA extraído foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1%. Foi utilizado tampão de eletroforese TBE 1x (0,089M Tris-base, 0,089M Ácido bórico, 0,002M EDTA). Foi adicionado 0,1 µg/mL de brometo de etídeo ao gel.

Para o preparo das amostras foi utilizado 3µL de *loading dye* (0,25 % de azul de bromofenol + 30 % glicerol), 1µL de água ultrapura e 1µL da amostra de DNA.

Como padrão de peso molecular e de concentração, foi utilizado 5µL do DNA do fago Lambda nas concentrações de uso (5ng, 10ng e 20ng) e 2µL do *loading dye* e foram aplicados em microtubos marcados de acordo com sua concentração final (25ng, 50ng e 100ng, respectivamente).



A eletroforese foi realizada por 60 min a 70 V. O gel foi visualizado sob luz UV, em transiluminador.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A caracterização molecular dos fungos foi realizada através da amplificação de regiões específicas no DNA dos fungos, pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguindo o protocolo de Khoury *et al.* (2011). As amostras de DNA genômico foram primeiramente submetidas à amplificação, por PCR, da região espaçadora dos genes da biossíntese da aflatoxina usando os *primers* IGS-Reverse 5'-GTCCACCGGCAAATCGCCGTGCG-3' e IGS-Forward: 5'-AGGAATTCAGGAATTCTCAATTG-3' (Invitrogen®). Como controle positivo, foi utilizado os *primers* TUB-Reverse: 5'-AAACCCTGGAGGCAGTCGC-3' e TUB-Forward: 5'-CTCGAGCGTATGAACGTCTAC-3', para amplificação da região fúngica que codifica para a β -tubulina.

As reações de PCR, para ambas as regiões IGS e β -tubulina foram realizadas em um volume total de 25 μ L, contendo 25 ng de DNA genômico, tampão de PCR 1x, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,8 mM de mix de dNTPs, 1 μ M de cada *primer reverse* e *forward*, e 1,5 unidades da *Taq* DNA Polimerase, Promega®. A reação foi realizada em termociclador Bioer e as condições de ciclagem foram: 94 °C por 4 min seguido de 35 ciclos de 94 °C por 40 segundos, 58 °C por 40 segundos e 72 °C por 1 min, com extensão final de 1 ciclo de 72 °C por 10 min.

Para a eletroforese, um total de 5 μ L das reações de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão TBE 1x, utilizando o mesmo procedimento da quantificação já realizado. A voltagem utilizada foi de aproximadamente 8 Volts/cm de gel.

PCR-RFLP (PCR seguida de clivagem com enzima de restrição).

Para confirmar a identidade de *Aspergillus flavus* ou *A. parasiticus*, os produtos amplificados da região IGS foram submetidos à clivagem com uma enzima de restrição *Bgl*I de acordo com Khoury *et al.* (2011). De acordo com o padrão de clivagem é possível diferenciar as espécies de *A. flavus* e *A. parasiticus*. Para a reação, um total de 7,5 μ L do produto da PCR foi adicionado a reação de clivagem, contendo 0,75 μ L da enzima *Bgl*I (a 10U/ μ L) New England Biolabs (NEB), tampão da enzima (1x) e água Milli-Q para um volume final de 20 μ L. A reação foi incubada por 3 horas a 37 °C e analisada através de eletroforese em gel de agarose a 2%, com as mesmas condições descritas anteriormente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Coleta das amostras

Os resultados apresentados são referentes ao isolamento e caracterização morfológica e molecular de 16 isolados fúngicos de amostras de soja e milho, sendo oito amostras de cada semente, enumeradas de 1 a 16, as 8 primeiras provenientes de soja e o restante provenientes de milho, coletadas em oito cooperativas distintas, da região de Maringá. O fator levado em consideração foi o tempo de armazenamento de cada amostra, a fim de comparar amostras com tempo de armazenagem maior e menor.

Segundo Pinheiro (2004), a armazenagem de alimentos envolve vários fatores que influenciam na proliferação de fungos, como aeração, atividade da água, temperatura e o próprio alimento em si, interações microbianas, infestações por insetos, concentração do inóculo e danos mecânicos.

Após o crescimento do fungo de interesse, foram analisadas quais amostras foram positivas para *Aspergillus flavus* e quais foram negativas, observando a morfologia das culturas. Segundo relatado por Monteiro (2012), para a diferenciação da morfologia macroscópica entre os fungos da seção *flavi*, a cor das colônias é um fator importante. Portanto, foram repicadas colônias cuja morfologia era de acordo com a descrita na literatura. Como resultado, somente as amostras 6, 7, 9, 15 e 16 foram negativas para *Aspergillus spp.*, de acordo com a análise morfológica.

Amplificação, por PCR, das regiões IGS e β -tubulina

Após a extração, quantificação e diluição, O DNA genômico dos isolados foi submetido à amplificação, por PCR, primeiramente utilizando os *primers* para a β -tubulina, como controle positivo para DNA fúngico. O produto de amplificação apresenta um tamanho de 340 pb (KHOURY *et al.*, 2011).

O resultado da amplificação é mostrado na Figura 2. As amostras 2, 4, 5 e 13 não apresentaram amplificação. Comparando-se com o aspecto do DNA genômico após a extração (dados não mostrados), foi possível observar que o material genético apresentava-se provavelmente degradado, o que justifica algumas amostras não amplificadas ou houve a presença de inibidores da PCR.

A segunda reação de PCR consistiu na amplificação da região IGS que compreende a região do espaçador intergênico dos genes responsáveis pela biossíntese da aflatoxina. Como mostra a Figura 3, as amostras 1, 2, 4, 5 e 13 foram negativas para a amplificação. Podemos concluir que essas amostras podem não



pertencer à espécie *Aspergillus flavus* ou *Aspergillus parasiticus*, visto que a região IGS é altamente variável e pode ser usada para diferenciar fungos em nível de espécie incluindo ambas em um mesmo espaçador intergênico (GARCIA, 2011). O DNA genômico das amostras 4, 5 e 13 se encontravam degradadas, o que pode ter contribuído pela não amplificação.

Análise do padrão de fragmentos de restrição (PCR-RFLP)

As enzimas de restrição reconhecem e atuam sobre sequências específicas de DNA, catalisando ligações fosfodiéster entre dois nucleotídeos consecutivos ligados a determinadas bases nitrogenadas (SWEENEY e DOBSON, 1998).

Os produtos de amplificação da região IGS, dos fungos que apresentaram resultado positivo na reação de PCR, foram submetidos à clivagem com a enzima de restrição *Bgl*II e os produtos de clivagem foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% (Figura 4).

Foi possível observar que todas as amostras apresentaram três fragmentos de restrição, com bandas esperadas de 362, 210 e 102 pb, como pertencentes a *A. flavus*, de acordo com a literatura (KANA *et al.*, 2013), exceto a amostra de número 3, que apresentou material insuficiente para a observação por eletroforese em gel.

Utilizando a mesma enzima de restrição, a espécie de *A. parasiticus* apresenta dois fragmentos de 363 e 311 pb (KHOURY *et al.*, 2011). Portanto as amostras 8, 10, 11, 12 e 14 são pertencentes à espécie *Aspergillus flavus*.

A relação tempo/armazenagem não foi possível ser observada e relacionada com os resultados obtidos, uma vez que as amostras que foram significativas para *A. flavus* persistiram em ambos os tempos de armazenamento, porém pode-se destacar que houve uma maior prevalência da espécie nas amostras de milho, indicando uma possível preferência de contaminação deste fungo em um dos maiores cultivares do Brasil.

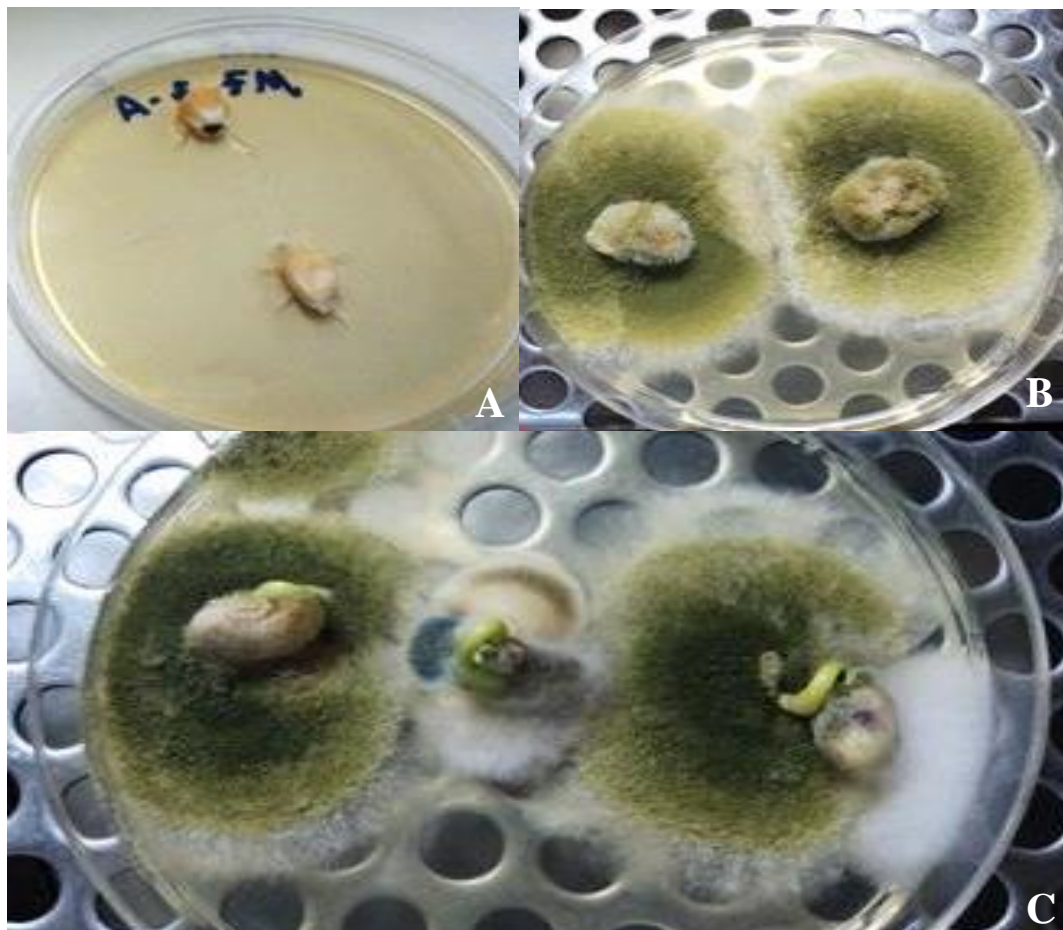


Figura 1. Isolamento do fungo *Aspergillus flavus*. (A) Semeadura do milho em placa de Petri, em meio *Sabouraud*. (B) Aspecto do fungo após 7 dias a temperatura ambiente em grão de milho e (C) grão de soja semeado a 7 dias.

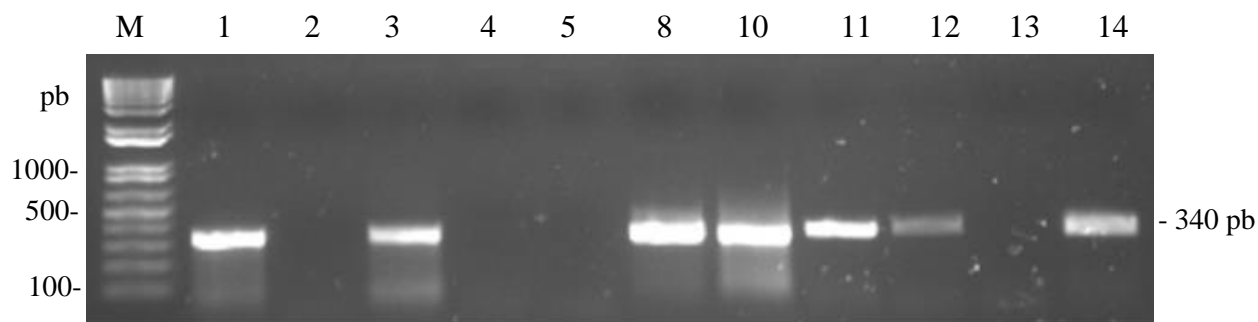


Figura 2. Resultado da amplificação da região da β -tubulina (340 pb). **M.** Marcador de tamanho molecular com 1Kb ladder Plus (Invitrogen®). Amostras 1, 3 e 8, perfil dos fungos obtidos de grãos de soja. Amostras 2, 4, 5 e 13, amostras negativas para amplificação. Amostras 10, 11, 12 e 14, amostras provenientes de grãos de milho.

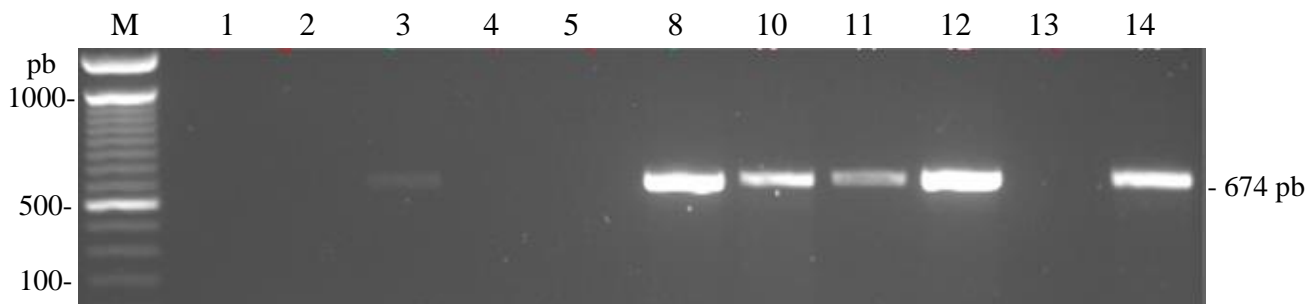


Figura 3. Resultado da amplificação da região IGS (674 pb). **M.** Marcador de tamanho molecular 100pb (Promega®). Amostras 1, 2, 4, 5 e 13, amostras negativas para amplificação. Amostras 3 e 8, perfil dos fungos obtidos de grãos de soja. Amostras 10, 11, 12 e 14, amostras provenientes de grãos de milho.

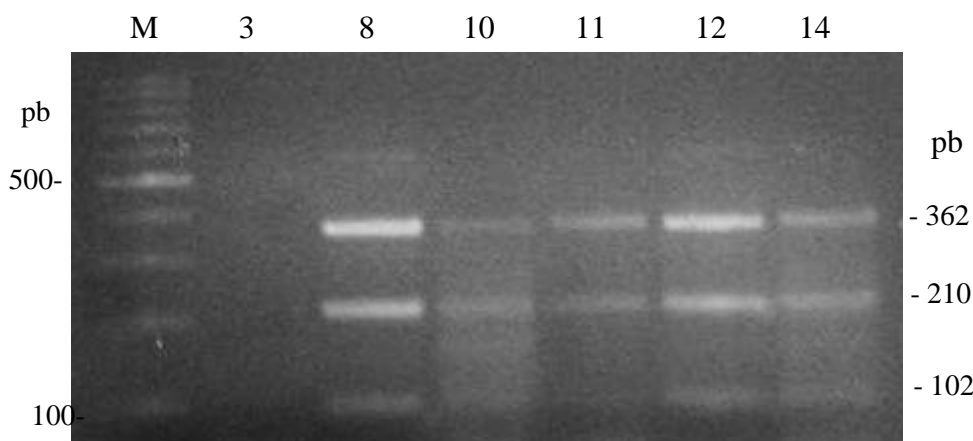


Figura 4. Padrão de clivagem, com a enzima de restrição *Bgl*I, do produto de amplificação da região IGS, gerando 3 fragmentos 362pb, 210pb e 102pb. **M.** Marcador de tamanho molecular 100pb (Promega®). Amostra 3, resultado negativo. Amostra 8, perfil de fungos provenientes de soja. Amostras 10, 11, 12 e 14, amostras provenientes de milho.

4 CONCLUSÃO

O presente trabalho trouxe conhecimentos a serem adicionados no âmbito da ciência agrônômica e biotecnológica, uma vez que enfatiza o consumo de alimentos contaminados por diversos tipos de organismos,



principalmente os fungos devido ao fácil e propício acesso. A soja e o milho, que são alimentos diariamente consumidos em várias de suas formas, podem estar suscetíveis a contaminação por fungos de armazenamento como *Aspergillus flavus*.

Existem no mercado inúmeras técnicas disponíveis para detectar e identificar a contaminação destes parasitas, mas nem sempre estas técnicas são confiáveis e eficazes, podendo estes grãos chegarem à mesa do consumidor inoculados com micotoxinas potencialmente tóxicas à saúde humana. Por este motivo, este trabalho foi desenvolvido, afim identificar a principal espécie contaminante de grãos de soja e milho, evidenciando assim que mais da metade das amostras estudadas estavam infectadas por *Aspergillus*, o que nos leva a concluir a ineficácia das técnicas utilizadas no campo e no armazenamento desses grãos.

Também foi possível detectar espécies de *Aspergillus* em diferentes culturas de soja e milho através de técnicas de biologia molecular, garantindo a efetividade da metodologia utilizada, não necessitando realizar modificações no protocolo. Este fato também corrobora com a certeza dos resultados, uma vez que podemos afirmar com garantia que os grãos estavam contaminados por *Aspergillus flavus*, o principal fungo produtor da aflatoxina B1.

REFERÊNCIAS

ACOMPANHAMENTO DE SAFRA BRASILEIRA: grãos, décimo primeiro levantamento. Brasília: Conab, ago. 2013. Mensal. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_09_10_43_44_boletim_portuges_agosto_2013_port.pdf>.

DE HOOG, G. S.; GÖTTLICH, E.; PLATAS, G.; GENILLOU, O.; LEOTTA, G.; BRUMMELEN, J. V. Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antarctica. **Studies in Mycology**, v. 51, p. 33-76, 2005.

GARCIA, A. K. **Avaliação da atividade lipolítica de fungos filamentosos da costa brasileira.** 2011. 56 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2011.

KANA, J. R.; GNONLONFIN, B. G. J.; HARVEY, J.; WAINAINA, J.; WANJUKI, I.; SKILTON, R. A.; TEGUIA, A. Mycobiota and toxigenicity profile of *Aspergillus flavus* recovered from food and poultry feed mixtures in cameroon. **Journal of Animal and Poultry Sciences - Japsc.** p. 98-107, 2013.

KHOURY, A. E.; ATOUI, A.; RIZK, T.; LTEIF, R.; KALLASSY, M.; LEBRIHI, A. Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from pure culture and aflatoxin-contaminated grapes using PCR-RFLP analysis of aflR-aflJ intergenic spacer. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 4, p. M247-M253, 2011.

MESQUITA, R. A.; ANZAI, E. K.; OLIVEIRA, R. N.; NUNES, F. D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo, v. 15, n. 4, p.314-319, 2001.

MEZZARI, A.; PERIN, C.; JÚNIOR, S. A. S.; BERND, A. G.; GESU, G. D. Os fungos anemófilos e sensibilização em indivíduos atópicos em Porto Alegre, RS. **Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 49, n. 3, p.1-10, 2003.

MONTEIRO, M. C. P. **Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado.** 2012. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

PINHEIRO, M. R. R. **Estudo de variabilidade genética de *Aspergillus flavus* como base para o desenvolvimento de PCR multiplex para a detecção de fungos produtores de aflatoxinas em castanha-do-Brasil e Castanha de Caju.** 2004. 149 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2004.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.43, p141-158, 1998.