



## IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS *ASPERGILLUS NIGER* E *ASPERGILLUS CARBONARIUS* ENCONTRADOS EM UVAS VENDIDAS NO COMÉRCIO NA CIDADE DE MARINGÁ-PR

Janaina Nicolau de Oliveira<sup>1</sup>, Alessandra Valéria de Oliveira<sup>2</sup>

**RESUMO:** A contaminação de alimentos por fungos pode ocasionar riscos à saúde, principalmente quando são produzidas micotoxinas. Dentre essas toxinas, a ocratoxina A (OTA) tem recebido atenção por produzir diversos efeitos tóxicos carcinogênicos, teratogênicos, imunossupressores e nefrotóxicos. A OTA é principalmente produzida por fungos do gênero *Aspergillus* que podem contaminar uvas em seus diversos estágios de produção. Portanto este trabalho teve como objetivo a pesquisa de *Aspergillus niger* e *A. carbonarius* em amostras de uvas coletadas na cidade de Maringá com posterior análise molecular para confirmação da espécie encontrada. As análises foram realizadas a partir da coleta das amostras de uva com posterior cultura em meio sabouraud com cloranfenicol para obtenção do micélio. Quando considerada positiva, a amostra foi submetida ao processo de extração de DNA, seguido da quantificação e amplificação do material genético com os *primers* específicos. Neste trabalho, 30 amostras foram coletadas, sendo que 25,67% apresentaram crescimento fúngico característico. De acordo com a análise molecular, 25% das amostras pertencem à espécie *Aspergillus niger* e 12,5% amostra pertence à espécie *Aspergillus carbonarius*. As demais amostras apresentaram amplificação de bandas inespecíficas e portanto não puderam ser identificadas. Portanto sugere-se que novos estudos sejam realizados a fim de se aplicar novos *primers* para que um maior número de espécies do "agregado Niger" possam ser identificadas.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Aspergillus* spp.; OTA; uva; agregado Niger.

### 1 INTRODUÇÃO

Os alimentos podem ser contaminados por fungos em seus diversos estágios de produção e maturação, podendo levar à modificação de seu valor nutricional ou ainda trazer riscos à saúde humana e animal devido à produção de micotoxinas (VECCHIA & CASTILHOS-FORTES, 2007).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidas por fungos (PERAICA *et al.* 1999) que apresentam efeito tóxico ao organismo humano e animal ( FUNGARO & SARTORI, 2009).

O gênero *Aspergillus* é responsável pela produção de duas das principais micotoxinas descritas, as aflatoxinas e a ocratoxina A (VOGEL & VILLAMIL-JIMÉNEZ, 2006). PERAICA *et al.* (1999) afirma ainda que a ocratoxina A (OTA) é a toxina mais

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Maringá - CESUMAR, Maringá-Paraná. Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq-Cesumar). janaina.noliveira@hotmail.com

<sup>2</sup> Orientadora, Docente dos Cursos de Ciências Biológicas e Biomedicina e Coordenadora de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. alessoli@hotmail.com



freqüentemente encontrada em alimentos e também a mais tóxica, pois pode causar efeitos nefrotóxicos, imunossupressores, carcinogênicos e teratogênicos.

Em uvas, os principais produtores da toxina são o *A. niger* e *A. carbonarius* (WELKE *et al.* 2009), os quais podem contaminar tais frutas durante todo seu processo de maturação (FAVILLA *et al.* 2008) inclusive durante sua colheita, armazenamento e transporte. Essa contaminação pode ser influenciada por fatores climáticos, como umidade e temperatura, que estando altos contribuirão para uma maior incidência de fungos e de produção de ocratoxina A por estes (CHIOTTA *et al.* 2009).

A presença dos fungos *A. niger* e *A. carbonarius* em uvas colabora para a contaminação por OTA também de produtos derivados da fruta, como suco de uva, uvas passas e vinhos, pois tal toxina pode resistir aos processos industriais sofridos pelo produto (WELKE *et al.* 2009). Ainda segundo WELKE *et al.* (2009) este representa o principal fator responsável pela contaminação de vinhos pela OTA, pois esta é passada ao produto no processo de vinificação através da maceração das uvas. Portanto, de acordo com FAVILLA *et al.* (2008), a pesquisa de OTA em vinhos tem recebido atenção também devido ao alto consumo deste produto.

Considerando a toxicidade da ocratoxina A presente nos alimentos, a pesquisa de fungos produtores desta toxina se faz necessária. Devido também a influência de fatores climáticos na contaminação das uvas, a identificação dos fungos em amostras colhidas no comércio de Maringá, pôde constituir dado importante sobre o nível de contaminação das uvas *in natura* que são consumidas e produzidas nesta região. Portanto, foram pesquisados os fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* nas amostras, que são os principais fungos colonizadores de uvas.

A fim de se identificar corretamente as cepas de *A. niger* e *A. carbonarius*, tornou-se necessária a utilização de técnicas moleculares, já que morfológicamente várias espécies são similares, sendo inclusive classificadas como agregado Niger (FERRACIN *et al.* 2009). Portanto a extração e amplificação de DNA do fungos encontrados nas amostras foram realizadas para sua identificação através de *primers* específicos para cada espécie.



## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 2.1.1 Coleta das amostras

Foram coletadas 30 amostras de uvas sendo que destas, 12 são do tipo niágara, 7 do tipo rubi, 4 do tipo Itália, 3 do tipo Brasil e 4 Benitaka. Os 8 pontos de vendas foram escolhidos aleatoriamente e a qualidade da uva foi obtida de acordo com sua disponibilidade em tais pontos.

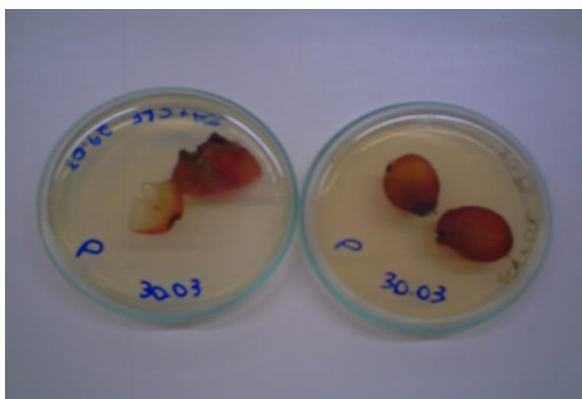
As uvas foram compradas e acondicionadas em sacos plásticos lacrados para o transporte até o Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do Centro Universitário de Maringá. Foram assim armazenadas a 6°C - 8°C em geladeira até o momento da cultura.

#### 2.1.2 Cultura das amostras

Para a cultura das amostras foi utilizado o meio de cultura *Sabourand*-dextrose (SDA) com cloranfenicol a fim de se evitar o crescimento de bactérias. Também para evitar contaminação com demais micro-organismos, todo o procedimento foi executado em capela de fluxo laminar.

Os bagos foram escolhidos aleatoriamente na amostra e fatiados em cadinho autoclavado com lâmina de bisturi. As fatias foram então posicionadas nas placas de Petri contendo o meio de cultura (Figura 1).

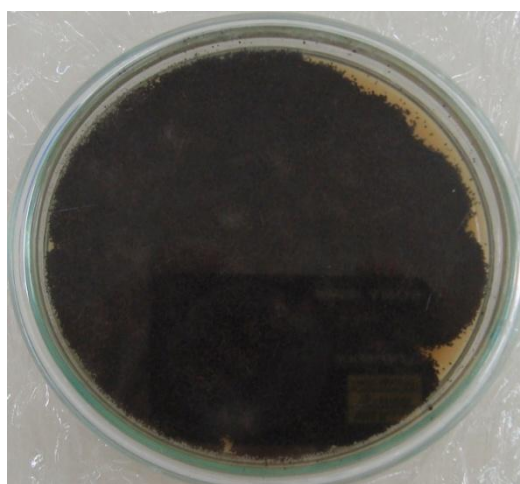
As placas foram mantidas em temperatura ambiente (25°C) de 7 a 15 dias e a leitura era realizada a partir do 7º dia.



**Figura 1.** Cultura das amostras de uva *in natura* em meio SDA.

### 2.1.3 Leitura dos resultados de cultura

O crescimento foi analisado segundo aspectos morfológicos como textura, cor e aspecto do reverso da colônia. O resultado foi considerado positivo para *Aspergillus niger* e *A. carbonarius* quando a cultura apresentava coloração negra com aspecto granulado e o reverso cor creme podendo apresentar pregas (COOK & FISHER, 2001)(Figura 2).



**Figura 2.** Aspecto macroscópico da colônia dos fungos do "agregado Niger"



#### 2.1.4 Extração de DNA

A extração de DNA seguiu o protocolo de Cenis (1992) com adaptações descritas a seguir.

As placas consideradas positivas foram separadas e parte do micélio em desenvolvimento foi transferido para microtubo contendo 500uL de meio de cultura dextrose-batata. Os tubos foram mantidos por cinco dias 25°C para que o crescimento fosse satisfatório. Após o crescimento, o processo de extração foi realizado através do uso do tampão de extração 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 ressuspensionado em tampão TE e congelado para posteriores análises.

#### 2.1.5 Quantificação das amostras

A quantificação do DNA extraído foi realizada em gel de agarose 1% com brometo de etídio e comparação das bandas com DNA lambda, e a visualização efetuada em aparelho transiluminador disponível no laboratório de biologia molecular.

#### 2.1.6 Amplificação do DNA para identificação molecular

A metodologia para amplificação de ácidos nucléicos foi baseada em Muller *et al.* (1998), porém com adaptações. Os reagentes utilizados para a reação de PCR foram 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).

Os primers específicos foram utilizados de acordo com Fungaro & Sartori (2009) cuja seqüência específica para *A. niger* foi 5' CAGTCGTCCAGTACCCTAAC / 3' GAGCGAGGCTGATCTAAGTG enquanto que para *A. carbonarius* utilizamos o par de primers 5' AGGCTAATGTTGATAACGGATGAT / 3' F5'AGGCTAATGTTGATAACGGATGAT.



O ciclo de PCR foi composto por 1 ciclo inicial de 94°C por 5 minutos, em seguida 45 ciclos de 94°C por 1 minuto, 35°C por 2 minutos e 72° C por 3 minutos (LOURENÇO, 2007).

### 2.1.7 Visualização dos resultados e análise molecular

A visualização dos resultados de amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1,4%. As bandas geradas a partir dos *primers* específicos ofereceram os dados para identificação das espécies encontradas através de comparação do padrão de bandas descrito por Fungaro (2004) para *A. carbonarius* e Sartori (2006) para *A. niger*.

### 2.1.8 Análise estatística

A análise estatística foi utilizada para se estimar a quantidade de amostras de uva de variadas qualidades que estavam contaminadas pelos fungos *A. niger* e *A. carbonarius* através de cálculos de porcentagem.

## 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido à produção de micotoxinas de importância médica, os fungos do gênero *Aspergillus spp.* tem sido constantemente foco de pesquisas em vários continentes. Devido à presença da toxina, a contaminação de alimentos naturais dificulta a comercialização também de seus derivados, como ocorre com a uva e o vinho, tornando a pesquisa deste fungo de grande importância.

Neste trabalho foram analisadas 30 amostras de diferentes variedades de uva *in natura*, coletadas em pontos de venda da cidade de Maringá - Paraná. Destas, 8 amostras (26,67%) apresentaram crescimento fúngico correspondente com a característica morfológica dos fungos do "*agregado Niger*" e portanto foram consideradas positivas. Pesquisas anteriores realizadas na Itália encontraram cerca de 56% a 70% de amostras de uva positivas para fungos do "*agregado Niger*" variando com a região

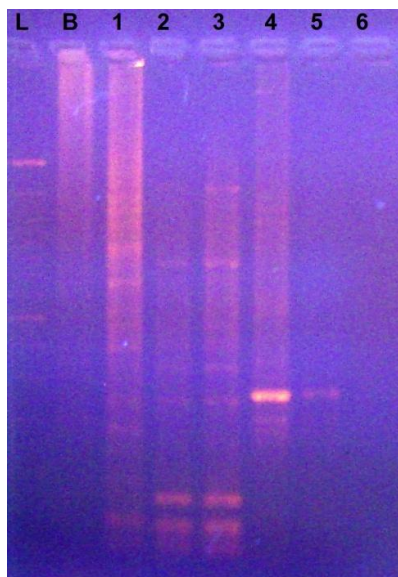


geográfica estudada (LUCCHETTA *et al.* 2010), enquanto que um trabalho realizado na Espanha teve 82% de positividade para fungos do "agregado *Niger*" (MEDINA *et al.* 2005), e na Argentina, 32,5% das amostras de uva coletadas estavam contaminadas (CHIOTTA *et al.* 2009), aproximando-se dos valores encontrados neste trabalho.

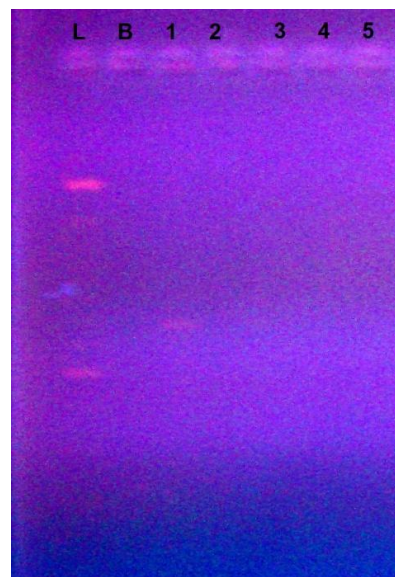
Segundo Varga *et al.* 2003 (apud SARTORI *et al.* 2006) o "agregado *Niger*" é constituído de cerca de nove espécies diferentes de *Aspergillus spp.*, entre elas, *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. niger* e *A. tubingensis*. Portanto a semelhança macroscópica e morfológica entre tais espécies impede a sua identificação correta. Por isso, para identificar se tais espécies encontradas pertenciam às espécies *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius*, foi necessária a realização de PCR (Polymerase Chain Reaction) com *primers* específicos para cada espécie.

Neste trabalho foi utilizado o *primer* descrito por Fungaro (2004) para identificação de *A. carbonarius*, que apresenta amplificação de banda de 809pb, e o *primer* descrito por Sartori (2006) para identificação de *A. niger* através da amplificação de banda de 372pb. Desta forma, foram obtidas 2 amostras (25%) com amplificação de banda com 372pb, consideradas então positivas para *A. niger*, e 1 amostra (12,5%) com amplificação de banda 809pb, considerada então positiva para *A. carbonarius*. A maior ocorrência de *A. niger* encontrada neste trabalho, reflete o resultado de outras pesquisas que afirmam que em uvas, cepas de *A. niger* são mais abundantes do que as de *A. carbonarius* (ABARCA *et al.* 2001 apud WELKE *et al.* 2009)(Figuras 3 e 4).





**Figura 3.** Amplificação das amostras de *Aspergillus* através da técnica RAPD. Coluna L corresponde ao Ladder 100pb Invitrogen. Coluna B corresponde ao controle branco da reação. Colunas 1, 2 e 3: amostras que amplificaram bandas inespecíficas. Colunas 4 e 5 correspondem às amostras que tiveram o fragmento de 372pb amplificado.



**Figura 4.** Amplificação das amostras de *Aspergillus* com *primer* específico para *A. carbonarius*. Coluna L corresponde ao Ladder 100pb Invitrogen. Coluna B corresponde ao controle branco da reação. Coluna 1 corresponde à amostra com amplificação de banda de 809pb. Colunas 2, 3, 4 e 5 amostras que não foram amplificadas.

As demais amostras apresentaram apenas amplificação de bandas inespecíficas podendo indicar outras espécies do "*agregado Niger*", não podendo ser identificadas sem a utilização de outros *primers*.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os testes moleculares utilizados foram eficientes em detectar a presença de espécies de fungos em uvas vendidas em diferentes pontos de venda na cidade de Maringá, refletindo a exposição da população aos fungos pesquisados, *A. niger* e *A. carbonarius*. Além destas espécies, outras pertencentes ao mesmo grupo, foram encontradas, porém não foi possível identificá-las, sendo necessária a realização de testes adicionais para a sua correta identificação.





## REFERÊNCIAS

- ABARCA, M.L. et al. Current importance of Ochratoxin A producing *Aspergillus* spp. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.64, p.903-906, 2001 apud WELKE, Juliane Elisa; HOELTZ, Michele; NOLL, Isa Beatriz. 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.
- CENIS, J. L. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, v. 20, n. 9, 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.
- COOK, N. B.; FISHER, F. *Micologia: fundamentos e diagnóstico*. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.
- FAVILLA, M.; PASCALE, M.; RICELLI, A.; EVIDENTE, A.; AMALFITANO, C.; ALTOMARE, C. Inhibition of species of the *aspergillus* section *nigri* ochratoxin A production in grapes by fusapyrone. *Applied and environmental microbiology*, vol.74, n. 7, p.2248-2253, 2008.
- FERRACIN, L. M.; FRISVAD, J. C.; TANIWAKI, M. H.; IAMANAKA, B. T.; SARTORI, D. SCHAPOVALOFF, M. E.; FUNGARO, M. H. P. Genetic relationships among strains of the *Aspergillus niger* aggregate. *Brazilian archives of biology and technology*, vol. 52, p. 241-248, 2009.
- FUNGARO, Maria Helena Pelegrinelli; SARTORI, Daniele. 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.
- FUNGARO, M. H. P.; VISSOTTO, P. C.; SARTORI, D.; VILAS-BOAS, L. A.; FURLANETO, M. C.; TANIWAKI, M. H. A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* in coffee beans. *Current Microbiology*, v. 49, p. 123-127, 2004.
- LOURENÇO, A.; DURIGON, E. L.; ZANOTTO, P.; MADEIRA, J. E. G. C.; ALMEIDA, A. P.; CORREA, B. Genetic diversity of environmental *Aspergillus flavus* strains in the state of São Paulo, Brazil by random amplified polymorphic DNA. *Memorial instituto Oswaldo Cruz*, vol. 102, n. 6, p.687-692, 2007.



LUCCHETTA, G. BAZZO, I. CORTIVO, G. D.; STRINGHER, L.; BELLOTTO, D.; BORGIO, M.; ANGELINI, E. Occurrence of black aspergilli and ochratoxin A on grapes in Italy. *Toxins*, v. 2, p. 840-855, 2010.

MEDINA, A.; MATEO, R.; OCANA, L. L.; VALLE-ALGARRA, F. M.; JIMENEZ, M. Study of spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingenses* and other members of *Aspergillus* section Nigri. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 8, p. 4696-4702, 2005.

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

SARTORI, D.; FURLANETO, M. C.; MARTINS, M. K.; PAULA, M. R. F.; KLEINER, A. A. P.; TANIWAKI, M. H.; FUNGARO, M. H. P. PCR method for the detection of potencial ochratoxin-producing *Aspergillus* species in coffee beans. *Research in Microbiology*, v.157, p. 350-354, 2006.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÓTH, B.; TÉREN, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. *Food Technology Biotechnology*, v.41, p. 29-36, 2003 apud SARTORI, D.; FURLANETO, M. C.; MARTINS, M. K.; PAULA, M. R. F.; KLEINER, A. A. P.; TANIWAKI, M. H.; FUNGARO, M. H. P. PCR method for the detection of potencial ochratoxin-producing *Aspergillus* species in coffee beans. *Research in Microbiology*, v.157, p. 350-354, 2006.

VECCHIA, Andréia Dalla; CASTILHOS-FORTES, Raquel de. Contaminação fúngica em granola comercial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 27, n. 2, p.324-327, 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, Juliane Elisa; HOELTZ, Michele; NOLL, Isa Beatriz. 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.