



IDENTIFICAÇÃO E PESQUISA DE ESPÉCIES DE FUNGOS *ASPERGILLUS NIGER* E *ASPERGILLUS CARBONARIUS* ENCONTRADAS EM FRUTAS SECAS VENDIDAS NO COMÉRCIO DE MARINGÁ-PR

Eline Ramos Meneghello¹; Jéssica Raynne de Moura Jorge¹; Alessandra Valéria de Oliveira²

RESUMO: A presença de fungos em alimentos vem causando uma grande preocupação com a saúde pública, pois estes são responsáveis pela produção de micotoxinas. Estas são metabólitos secundários dos fungos e quando presente nos alimentos e ingeridas com grande frequência podem levar a efeitos teratogênicos, neurotóxicos, imunossupressores e nefrotóxicos. As principais micotoxinas produzidas são as ocratoxinas A, e estas são produzidas com grande frequência por *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius*. Um dos alimentos com maior incidência de ocratoxina A são os frutos secos e a contaminação destes ocorre durante o processamento dos mesmos. Como as características destes fungos são insuficientes para distinguir espécies próximas, é preciso o uso de técnicas moleculares para uma segura distinção. Neste estudo, foram coletadas 26 amostras de frutas secas a partir vários pontos de venda escolhidos aleatoriamente no comércio de Maringá - Paraná. Nas amostras analisadas verificou-se o desenvolvimento de vários gêneros, entre os quais foram considerados somente os pertencentes ao agregado Níger. De todas as amostras analisadas, 38,46% apresentaram aspecto morfológico de agregado Níger, onde uvas passas escuras obtiveram o maior número de amostras infectadas e amostras de uvas passas claras e damascos apresentaram baixa incidência ou ausência de fungos. Com o uso de técnicas moleculares verificou-se que nenhuma das amostras estavam infectadas com as espécies pesquisadas.

PALAVRAS-CHAVE: *Aspergillus*; frutas secas; Ocratoxina A.

1 INTRODUÇÃO

A presença de fungos em alimentos gera uma grande preocupação para a saúde pública, pois sabe-se que os mesmos são responsáveis pela produção de micotoxinas. As micotoxinas são metabólitos secundários de fungos e podem estar presentes em alimentos e vegetais. Sua toxicidade atinge seres humanos e animais, e inclui efeitos teratogênicos, neurotóxicos, imunossupressores e nefrotóxicos (PERRONE *et al.* 2006).

As micotoxinas ocorrem em pequenas quantidades nos alimentos, no entanto a sua ingestão contínua, mesmo que em microdosagem, pode resultar em acumulação no organismo (KOVACS, 2011). As principais micotoxinas descritas são produzidas por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (WELKE *et al.* 2009).

¹ Acadêmicas do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Maringá (CESUMAR), Maringá – Paraná. Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Cesumar (PROBIC). eline_meneghello@hotmail.com, jehraynne_mj@hotmail.com

² Orientadora, Professora Doutora do Centro Universitário de Maringá (CESUMAR). alessoli@cesumar.br



A ocratoxina A (OTA) foi uma das primeiras micotoxinas a ser descoberta, sendo isolada e identificada a partir de uma cultura de *Aspergillus ochraceus* por VAN DER MERWE (1965). Esta aparece com grande frequência na natureza sendo a mais tóxica dentre as ocratoxinas. Dentre as espécies de *Aspergillus*, as principais espécies produtoras de ocratoxina A são *A. ochraceus*, *A. niger* e *A. carbonarius* (PEREYRA *et al.* 2010). Esta toxina recebe destaque devido ao seu elevado efeito nefrotóxico e sua classificação B2 quanto à efeitos carcinogênicos pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (FUNGARO & SARTORI, 2009). A contaminação dos alimentos pode ocorrer no campo, antes e após a colheita, e durante o transporte e armazenamento do produto (CALDAS *et al.*, 2002), visto também que a contaminação depende de fatores climáticos. As fontes alimentares com maior incidência de ocratoxina A são os cereais, mas níveis significativos de contaminação podem ser encontrados em uvas e vinho tinto, café, cacau, nozes, especiarias e frutos secos (WALKER, 2011). Segundo IAMANAKA (2004), o Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de frutas secas. Este motivo associado à alta toxicidade da ocratoxina A, direciona esta pesquisa para a busca de *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* em frutas secas consumidas na região de Maringá, com o objetivo de estimar a contaminação deste alimento com as respectivas espécies fúngicas, pois sabe-se que estes são os principais produtores da micotoxina.

As frutas secas são produtos obtidos a partir da perda parcial da água da fruta madura onde o processo é feito por técnicas de secagem. Por serem produtos naturais e apresentarem alto teor de açúcar e baixa atividade de água, acabam favorecendo o crescimento de fungos. Além disso, *A. niger* e *A. carbonarius* por produzirem esporos, garantem a resistência aos raios solares e acabam persistindo nas frutas durante a secagem ao sol (IAMANAKA, 2004).

As técnicas tradicionais para identificação dos fungos produtores de micotoxinas são demoradas e, normalmente, as características morfológicas são insuficientes para distinguir espécies próximas (MORELLO *et al.*, 2007). Outro fator que dificulta esta identificação macroscópica é a presença de um agregado Níger, onde uma vasta gama de espécies, deste mesmo gênero, são descritas como semelhantes morfológicamente. Portanto para a correta identificação se fazem necessárias análises moleculares (FERRACIN *et al.* 2009). O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular para a diferenciação genética das espécies resultou em avanços significativos na taxonomia, devido à sua sensibilidade e especificidade (MAGNANI *et al.*, 2005).



2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta das amostras:

Foram coletadas amostras de frutas secas a partir vários pontos de venda escolhidos aleatoriamente no comércio de Maringá, Paraná. Ao serem coletadas as frutas foram transferidas para sacos plásticos estéreis a fim de se evitar qualquer tipo de contaminação fora do local de compra.

Preparação das amostras:

As amostras foram plaqueadas diretamente em meio de cultura Ágar Sabourand suplementado com Cloranfenicol, após foram mantidas à temperatura ambiente por média de 5 - 7 dias para o crescimento fúngico. Posterior ao crescimento analisou-se as características morfológicas das culturas e as que apresentam características desejadas (Figura 1) foram inoculadas em microtubos contendo 500 µl de meio dextrose-batata por 72 horas a 25° C.



Figura 1: Colônias com aspecto de agregado níger.



Extração de DNA:

Este processo só é possível após a inoculação das amostras em meio dextrose-batata (Figura 2). Após o crescimento centrifugou-se os microtubos a 13.000 rpm até obter um pellet a partir do micélio. Em seguida, lavou-se o sedimento com 500 µl de tampão TE e peletizou novamente através de centrifugação. O TE foi decantado e 300 µl de tampão de extração foi adicionado; (200 mM Tris HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS). O micélio foi "esmagado" completamente com auxílio de um objeto e em seguida o tubo pode ser homogeneizado a 200 rpm por alguns minutos. Esta etapa deve ser seguida rigorosamente a fim de se obter uma extração satisfatória.



Figura 2: Colônias de agregado níger inoculadas em meio Dextrose-Batata.

Posteriormente, adicionou-se 150 µl de 3M acetato de sódio pH 5,2 e manteve-se o tubo por 10 minutos à -20°C, este então foi centrifugado e o sobrenadante transferido para outro tubo. Um volume semelhante de isopropanol foi adicionado e o tubo foi deixado 5 minutos à temperatura ambiente, sendo centrifugado após para obtenção do pellet. Em seguida o tubo foi lavado com etanol 70% e secado bem, finalmente o pellet foi ressuspenso em 30 µl de TE.

Quantificação e amplificação de ácidos nucleicos:

A quantificação das amostras extraídas foi feita por eletroforese em gel de agarose 1%. A partir desta quantificação as amostras de DNA foram diluídas para a concentração desejada e então foram amplificadas. O DNA extraído foi amplificado por PCR com Taq polimerase utilizando o protocolo descrito por MULLER *et al.* (1998). Os produtos de PCR foram então submetidos à eletroforese de gel de agarose 1,4% e visualizados sob luz UV.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o estudo, 26 amostras de frutas secas de diferentes pontos de venda na cidade de Maringá, Paraná, foram coletadas e analisadas quanto à presença de fungos do gênero *Aspergillus*. Nas amostras analisadas verificou-se o desenvolvimento de vários gêneros, entre as quais foram considerados somente os pertencentes ao agregado níger. Das 26 amostras analisadas (figura 3), 7 eram uvas passas escuras (26,92%), 7 uvas passas claras (26,92%), 3 damascos (11,53%), 6 ameixas (23,07%), e 3 tâmaras (11,53%).

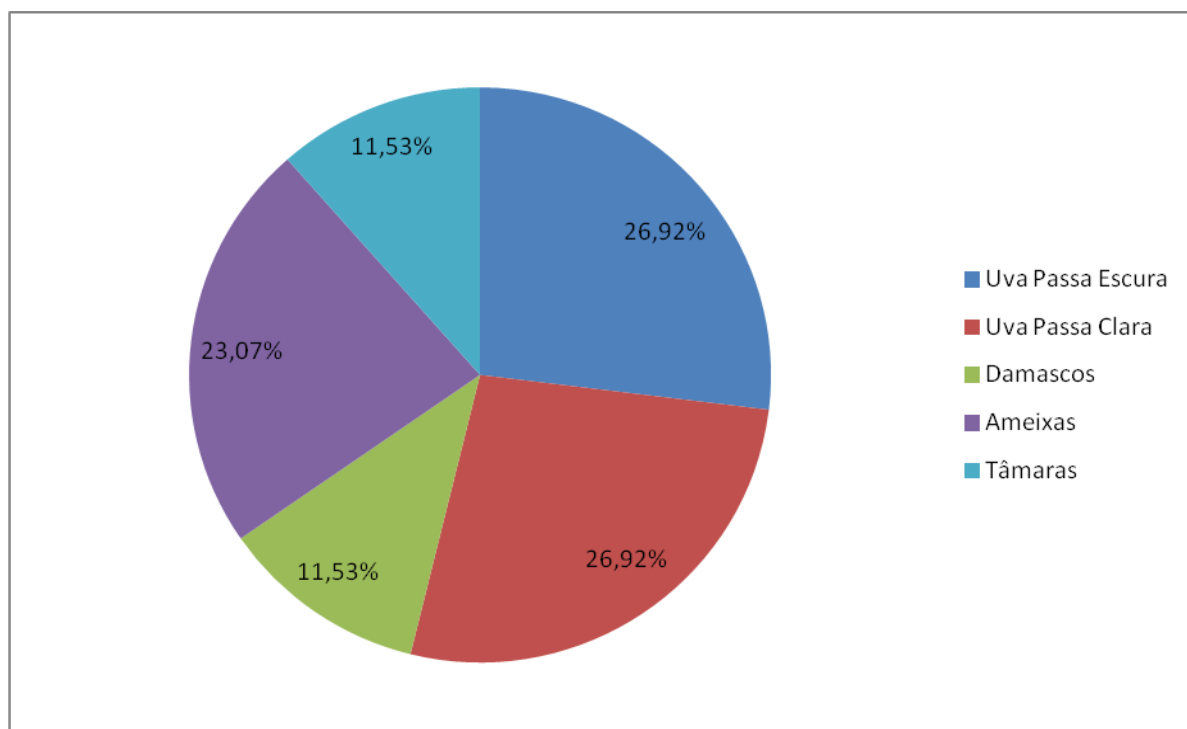


Figura 3: Variedades de frutas secas coletadas no município de Maringá – PR.



De todas as amostras analisadas (26), 38,46% apresentaram aspecto morfológico de agregado níger. Deste total de amostras positivas, 60% foram em uvas passas escuras, 20% em tâmaras, 10% em uvas passas claras e 10% em ameixas, sendo que nenhuma das amostras de damasco apresentou infecção com qualquer tipo de fungo, resultados quais apresentaram correlações com outras pesquisas (Figura 4). Segundo IAMANAKA (2004), de 119 amostras de frutas secas estudadas, também foi observado baixa incidência ou ausência de fungos em uvas passas claras e damascos, uvas passas escuras obtiveram o maior número de amostras infectadas e tâmaras e ameixas apresentaram baixa porcentagem de infecção.

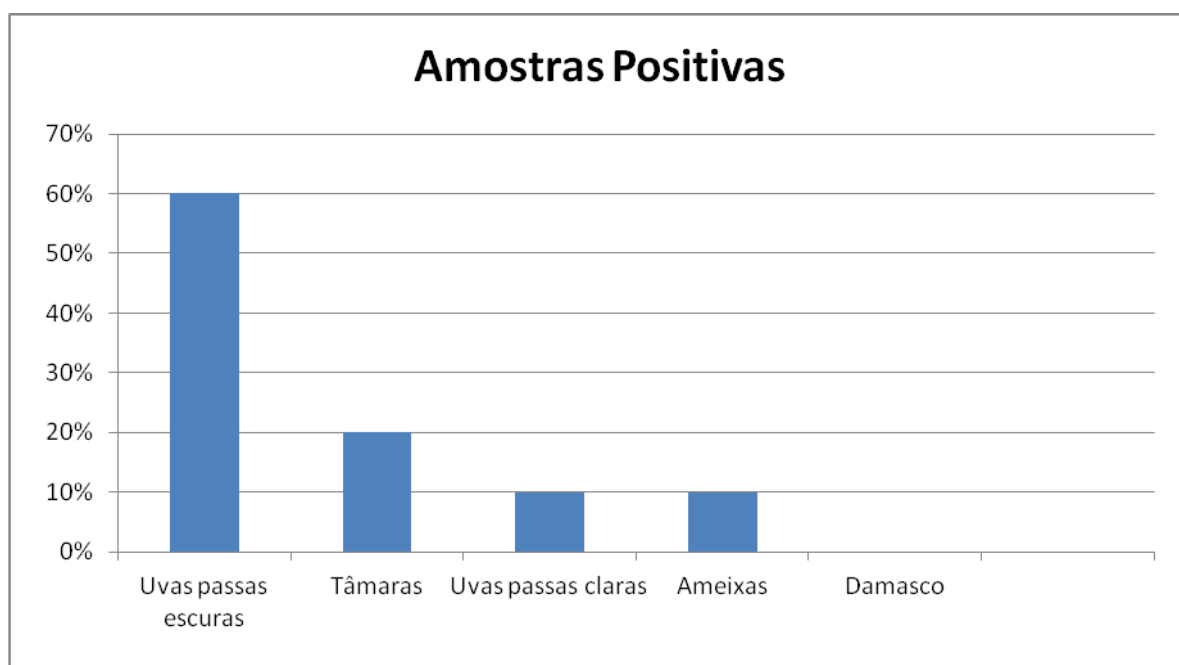


Figura 4: Relação entre variedade de frutas secas e presença de contaminação fúngica.

O fato da ausência de infecção em damascos e baixa incidência em uvas passas claras pode ser explicado pelo tratamento com dióxido de enxofre ao qual essas frutas são submetidas. Esse tratamento é realizado para impedir reações indesejáveis decorrente da reação de *Maillard* que provoca escurecimento dessas frutas. Esse tratamento acaba auxiliando também na prevenção do crescimento de fungos (PITTI E & HOCKING, 1997).

Devido ao fato da existência do agregado níger não se pode fazer a identificação isolada de cada espécie de *Aspergillus*, portanto se fez necessário a utilização de



técnicas moleculares para a identificação das espécies desejadas. Neste estudo utilizou-se *primers* específicos para *A. niger* e *A. carbonarius*, era preciso o aparecimento de uma banda de 372 pb para confirmação de *A. niger* e uma banda de 809 pb para confirmar a presença de *A. carbonarius*. Das 10 amostras pertencentes ao agregado, nenhuma foi identificada molecularmente como *A. niger* ou *A. carbonarius*, mas 1 destas (10%) apresentou amplificação de bandas inespecíficas quando utilizado os *primers* específicos para cada espécie, portanto pode-se concluir que esta amostra estava infectada com alguma outra espécie de *Aspergillus* pertencente ao agregado níger.

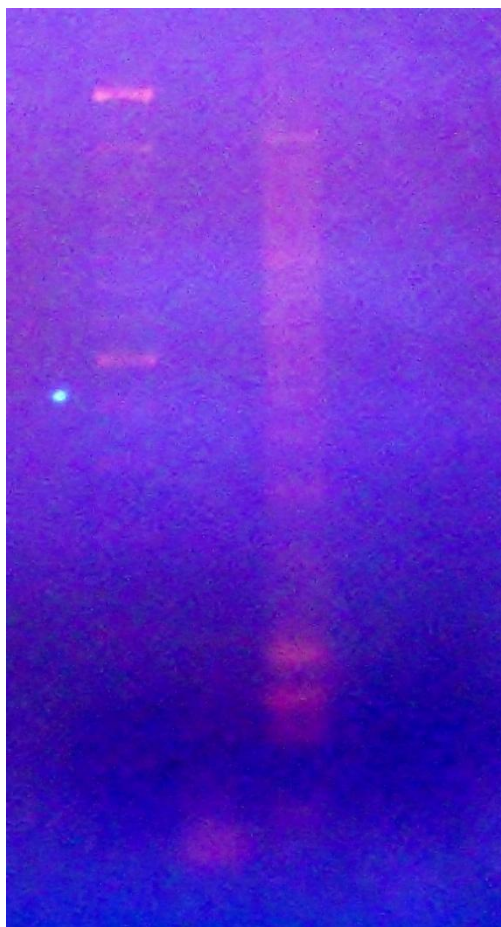


Figura 5: Amplificação de bandas inespecíficas indicando outras espécies de *Aspergillus*.

ABARCCA *et al.* (2003) analisando uvas passas da Espanha, detectou a presença de *A. niger* e *A. carbonarius* em 98% e 58% das amostras analisadas respectivamente. Dados bem diferentes dos encontrados na atual pesquisa.

Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que as frutas secas, mesmo apresentando baixos valores de atividade de água, não estão isentas de desenvolvimento



fúngico e indicou ainda a alta incidência de infecção em frutas secas. De acordo com Pitt & Hocking (1997), essas espécies são comuns em frutas secas devido às características de seus esporos. Por serem pretos e apresentarem alta resistência aos raios solares ultravioletas do sol, sobrevivem ao processo de secagem.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo permitiu concluir que não é remota a presença de fungos nas frutas secas consumidas no Brasil, principalmente em uvas passas escuras, os resultados sugerem a necessidade de mais análises moleculares a fim de confirmar e melhor identificar as espécies presentes nas amostras. Apesar de trabalhos isolados, em todos se observam a presença de fungos em frutas secas, e por estas serem consumidas em grande frequência pela população, sugere-se a implementação de técnicas e medidas para a redução desse número e maior segurança dos consumidores. Cabe a cada país estabelecer medidas que garantam o controle da qualidade sanitária desses produtos consumidos por sua população.

REFERÊNCIAS

ABARCA, M. L. et al. **Journal of Food Protection**, London, v.66, n.3, p.504-506, 2003.

CALDAS, Eloisa Dutra; SILVA, Saulo Cardoso; OLIVEIRA, João Nascimento. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 33, n. 3, p.319-323, 2002.

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.

IAMANAKA, Beatriz Thie. **Fungos toxigênicos e micotoxinas em frutas secas e produção de ocratoxina A em uvas passas em condições de abuso**. 2004. 90 f.



Dissertação (Mestrado) - Departamento de Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

KOVACS, M. **Nutritional health aspects of mycotoxins. Orvosi Hetilap**, Budapest, p.1739-1746, 22 ago. 2004. Disponível em: <<http://pesquisa.bvsalud.org/regional/resources/mdl-15493122>>. Acesso em: 05 maio 2011

MAGNANI, Marciane; FERNANDES, Thiago; PRETE, Cássio Egidio Cavenaghi; HOMECHIM, Martin; ONO, Elisabete Yurie Sataque; VILAS-BOAS, Laurival Antonio; SARTORI Daniele; FURLANETO, Márcia Cristina; FUNGARO, Maria Helena Pelegrinelli. Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 1, p.45-49, 2005.

MORELLO, L. G.; SARTORI, D.; MARTINEZ A. L. O.; VIEIRA, M. L. C.; TANIWAKI, M. H.; FUNGARO, M. H. P. Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee beans based on selective amplification of B-tubulin gene by using real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, Califórnia, v. 119, p. 270-276, 2007.

MULLER F.C. et al. Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi by high speed cell disruption. **Journal of Clinical Microbiology**, 1998.

PEREYRA, Carina Maricel; CAVAGLIERI, Lilia Renée; CHIACCHIERA, Stella Maris; DALCERO, Ana Maria. 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.

PITTI, J. L.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**. London: Blackie Academic & professional, 1997. 593p

WALKER, R. Risk assessment of ochratoxin: current views of the European Scientific Committee on Food, the JECFA and the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, New York, p.249-255, 2002. Disponível em: <<http://pesquisa.bvsalud.org/regional/resources/resources/mdl-11922092>>. Acesso em: 05 maio 2011.

WELKE, Juliane Elisa; HOELTZ, Michele; NOLL, Isa Beatriz. Aspectos relacionados à presença de fungos toxigênicos em uvas e ocratoxina A em vinhos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 8, p.2567-2575, 09 out. 2009.