



DETECÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS COM POTENCIAL TOXIGÊNICO EM AMOSTRAS DE AMENDOIM VENDIDAS NO COMÉRCIO VAREJISTA DE MARINGÁ/PR, BRASIL

Nathan Gomes Modesto¹; Cintia Corteccioni Nunez Del Prado²; Alessandra Valéria de Oliveira³

RESUMO: Muitos alimentos são susceptíveis a contaminação por fungos. Os grãos, como o amendoim, são largamente acometidos, tendo como consequências o comprometimento de sua integridade e inviabilidade para o consumo humano e animal. Além disso, representam riscos à saúde, principalmente pela produção de micotoxinas. Dentre elas, as aflatoxinas, produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, produzem diversos efeitos tóxicos carcinogênicos, teratogênicos, imunossupressores, hepatóxicos e nefrotóxicos. Técnicas moleculares têm sido utilizadas para identificação e discriminação de espécies de fungos em alimentos. O objetivo deste trabalho foi realizar a detecção molecular de espécies de *Aspergillus* em amostras de amendoim coletadas no comércio varejista de Maringá-PR, através da amplificação do material genético fúngico com *primers* específicos para o espaçador intergênico *afIR-afIJ* e posterior corte com enzimas de restrição. Das 50 amostras de amendoim analisadas, 27 foram positivas em relação à presença do espaçador intergênico *afIR-afIJ*, sendo que destas sete foram identificadas como *Aspergillus flavus*. Dessa forma, verifica-se a presença de amostras de amendoim contaminadas com fungos com potencial toxigênico no comércio varejista de Maringá/PR.

PALAVRAS-CHAVE: Aflatoxinas; Grãos; PCR.

1 INTRODUÇÃO

No ecossistema os fungos são organismos decompositores, na saúde são importantes parasitas facultativos, podendo obter nutrientes a partir de matéria orgânica morta ou de organismos vivos (BLACK, 2002).

Pela grande carga de nutrientes, os alimentos são facilmente propensos à contaminação por esses micro-organismos, além disso, as variações ambientais principalmente em relação à umidade e temperatura facilitam o desenvolvimento dos fungos, tornando muitas vezes o alimento impróprio ao consumo. Os fungos são encontrados em todas as regiões do mundo, sendo que os alimentos estão sujeitos à contaminação no campo durante e após a colheita, no processamento, no transporte e na estocagem, uma vez que o principal motivo está relacionado ao manejo inadequado (TANIWAKI; SILVA, 2001).

As micotoxinas são derivadas do metabolismo secundário de diferentes fungos filamentosos, dentre eles os pertencentes ao gênero *Aspergillus*, que se destacam não apenas pela possibilidade de causar danos por invasão tecidual e colonização das vias

¹ Acadêmico do Curso Biomedicina do Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR, Maringá – PR. Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq-Cesumar). nathangomes@hotmail.com

² Biomédica. Graduada pelo Curso Biomedicina do Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR. Ex-Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq-Cesumar). cintiadelprado@hotmail.com

³ Orientadora, Professora Doutora do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR. alessandra.oliveira@unicesumar.edu.br



aéreas, mas também pela capacidade de produzir substâncias altamente tóxicas que causam consequências patogênicas em humanos e animais (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

O desenvolvimento dessas toxinas depende de muitos fatores como: composição do substrato, umidade relativa do ar e temperatura. Além disso, nem todos os fungos de um gênero ou espécie produzem as micotoxinas, e mesmo na presença de fungos produtores não significa que a toxina estará presente, já que isso depende de condições biológicas e ambientais favoráveis, vale lembrar que conhecer essas condições é importante para desenvolver medidas de prevenção que evitem o desenvolvimento dos fungos e das toxinas. (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Dentre as distintas micotoxinas já isoladas, as aflatoxinas produzidas pelo gênero *Aspergillus*, sobretudo pelas espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* possuem grande relevância devido seu potencial hepatotóxico, carcinogênico e teratogênico. As aflatoxina mais conhecidas pela sua elevada toxicidade em ordem decrescente são: B1, M1, G1, B2, M2 e G2. As denominações B e G estão relacionadas à cor de fluorescência apresentada perante a luz ultravioleta, na coloração azul (blue) e verde (green) respectivamente (FOODS INGREDIENTS BRASIL, 2009).

O objetivo desse trabalho foi realizar a detecção molecular de fungos do gênero *Aspergillus* com potencial toxigênico em amostras de amendoim vendidas no comércio varejista da cidade de Maringá/PR, Brasil, através da técnica de RFLP/PCR, com amplificação da região intergênica *afIR-afIJ* do DNA fúngico.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas 50 amostras de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) em casas de produtos naturais, feiras do produtor e supermercados do comércio de Maringá-PR. As amostras de grãos foram acondicionadas em sacos estéreis e mantidas sob refrigeração entre 6°C e 8°C, até o momento das análises (3 dias após as coletas).

A análise microbiológica das amostras foi feita pela inoculação em triplicata no meio de cultura Sabourand-dextrose (SDA) com cloranfenicol. As placas com amostras de amendoim foram mantidas em temperatura ambiente (25°C) de 7 a 15 dias e a leitura foi realizada a partir do 5° dia.

As culturas foram analisadas de acordo com os aspectos morfológicos da colônia como cor, textura e reverso. O resultado foi considerado positivo para *A. flavus* e/ou *A. parasiticus* quando as colônias apresentavam coloração amarelo oliva a verde, tornando-se acinzentada com o tempo e reverso de cor creme podendo apresentar pregas (Figura 1) (PITT; HOCKING, 1997).



Figura 1: Aspecto macroscópico da colônia dos fungos *Aspergillus flavus* e/ou *Aspergillus parasiticus*. Amostra considerada positiva devido ao aspecto morfológico visualizado.



Após detecção das amostras positivas pela análise microbiológica foi realizada a separação do fungo de interesse por meio de repiques para uma nova placa de Petri com meio Sabourand-dextrose com cloranfenicol.

Uma parcela do micélio das amostras consideradas positivas foi transferida para microtubo contendo 500 µL de meio de cultura dextrose-batata. Os tubos foram mantidos por sete dias a 25°C e, após o crescimento, o processo de extração do DNA foi realizado, segundo Cenis (1992).

A quantificação do DNA extraído foi realizada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e posterior comparação com DNA lambda de concentração conhecida.

A metodologia para amplificação de ácidos nucleicos foi baseada em Muller et al. (1998). Os reagentes utilizados para a reação de PCR foram tampão 10X PCR Buffer (1,3 µl), água ultra-pura (6,48 µl), magnésio (0,52 µl), nucleotídeos (1,0 µl), *primers* (1,0 µl), Taq Polimerase (0,3 µl) e amostra de DNA (2,0 µl). Os *primers* específicos IGS-F/IGS-R e TubF/TubR foram utilizados de acordo com Khoury et al. (2011), que amplificam a região do espaçador intergênico *afIR-afIJ* (fragmento de 674 pb) e a região do gene da β-tubulina (340 pb), respectivamente. O ciclo de PCR foi composto por desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos seguido de 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 58°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto, seguido de extensão final a 72°C por 10 minutos (KHOURY, 2011).

A análise dos resultados da amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1,4% corado com brometo de etídio. As bandas geradas nas amostras a partir dos *primers* específicos foram comparadas com o padrão de DNA Ladder 100 pb.

2.1 Dosagem de aflatoxinas por Cromatografia de Camada Delgada

A determinação da aflatoxina é feita em triplicata com base no método descrito por Soares e Rodriguez-Amaya (1989).

A separação é feita por cromatografia de camada delgada de sílica gel, para isso é aplicado 10 uL do extrato na placa cromatográfica juntamente com diferentes volumes de padrão de aflatoxina B1, B2, G1 e G2, a placa é colocada em uma cuba contendo tolueno e clorofórmio, sendo desenvolvida até atingir 10 cm.

Após 10 cm de desenvolvimento, coloca-se a placa sob luz UV (360nm) e busca-se observar a presença de manchas fluorescentes com a mesma tonalidade do padrão, se isso ocorrer indicará a presença da aflatoxina, ou seja, resultado positivo. A confirmação do resultado é feita com eluição em éter etílico da mesma placa que passou pela análise anterior, esse procedimento elimina possíveis resultados falso-positivos.

A quantificação das amostras foi feita de acordo com Machinski (2008).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cinquenta amostras de amendoim, coletadas no comércio varejista de Maringá/PR, apresentaram, de acordo com a análise microbiológica, crescimento fúngico e, portanto, foram consideradas como amostras positivas, e seguiram para as próximas análises.

Das 50 amostras, 27 (54%) apresentaram um fragmento de DNA de aproximadamente 674pb (Figura 2), correspondente à região intergênica *afIR-afIJ*, conforme descrito por Khoury et al. (2011) ao analisar espécies de *Aspergillus* aflatoxigênicos em amostras de uva. Todas as 50 amostras que tiveram seu DNA analisado também foram amplificadas com *primers* específicos para o gene da β-tubulina. Todas as amostras apresentaram o fragmento de 340



pb, utilizado como controle positivo da reação, indicando, portanto, a presença de DNA fúngico no meio.

Considerando as amostras positivas para o espaçador intergênico *aflR-aflJ*, e, portanto, contaminadas por fungos do gênero *Aspergillus*, 12 foram encontradas em casas de produtos naturais (66%). Das amostras coletadas em supermercados, seis foram positivas (33%), e em feiras livres nove amostras foram positivas (50%) (Tabela 1).

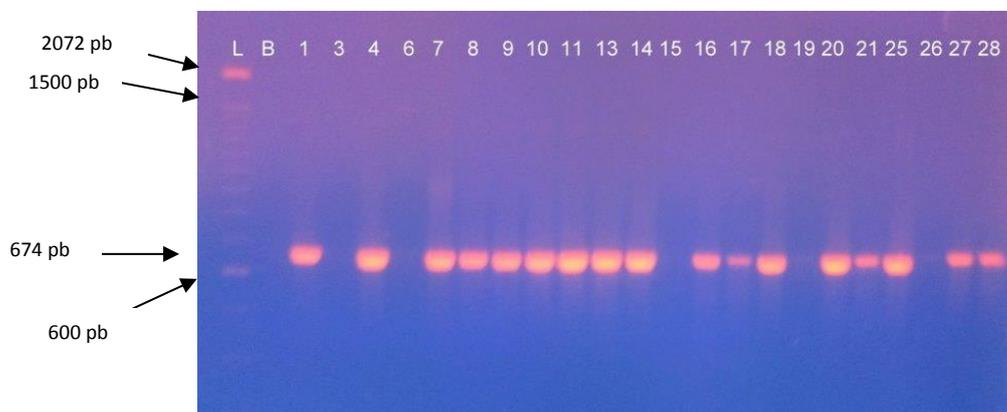


Figura 2: Amplificação de DNA de *Aspergillus* com *primer* específico para espaçador intergênico *aflR-aflJ*. (L) Marcador de peso molecular Ladder 100 pb. (B) Controle negativo da reação. (1, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 25, 27 e 28) Amostras positivas para o espaçador intergênico *aflR-aflJ*.

Tabela 1: Percentual de contaminação de amendoim por fungos do gênero *Aspergillus*, em amostras do comércio varejista de Maringá/PR.

Locais de coleta	Número de amostras coletadas	Número de amostras contaminadas	% de amostras contaminadas
Casas de produtos naturais	18	12	66%
Feiras livres	14	9	50%
Supermercados	18	6	33%
Total	50	27	54%

A maior contaminação percentual de amendoim por fungos do gênero *Aspergillus* apresentada, neste trabalho, em casas de produtos naturais e feiras livres, provavelmente está relacionada ao constante contato e manipulação dos grãos vendidos a granel, muitas vezes também associado ao armazenamento incorreto.

Das 30 amostras analisadas em apenas uma amostra foram detectadas as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, o valor obtido do somatório total das aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) encontradas na amostra positiva, foi 27,74 µg/kg, esse valor está acima dos valores estipulados por lei de no máximo 20,0 µg/kg de alimento (BRASIL, 2011). A única amostra positiva é proveniente de casa de produtos naturais.



REFERÊNCIAS

BLACK, J. G. **Microbiologia**: fundamentos e perspectivas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2002. 829 p.

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

FAO. **Micotoxinas**. 2009. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em <<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/es/>>. Acesso em: 29 março 2013.

FOODS INGREDIENTS BRASIL. **As Micotoxinas**. 2009. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/90.pdf>>. Acesso em: 23 abril 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 *afIR-afIJ* intergenic spacer. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 76, n. 4, p. 247-253, 2011.

MACHINSKI JR, M. Aflatoxinas: análise em amendoim por cromatografia em camada delgada. In: MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., p. 194-199, 2008.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2009. 327 p.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 2008. 677 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 593 p.

SOARES, L. M. V.; RODRIGRES-AMAYA, D. B. Survey of Aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin TLC method. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, v. 72, n.1, p. 22-26, 1989.