



Identificação de polimorfismo genético em fungos do gênero *Aspergillus*, através de sequenciamento de DNA

Valber D'Angelo Favaro¹; Jéssica Hellen da Silva¹; Alessandra Valéria de Oliveira²

RESUMO: O amendoim é uma planta cultivada em todo o mundo como uma fonte de óleo comestível e também de proteínas. Por ser uma leguminosa de germoplasma estreito resulta em um alimento bastante susceptível a contaminações por patógenos, tais como fungos e micotoxinas. Dentre os principais fungos que contaminam este grão encontra-se os do gênero *Aspergillus*, onde as espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* são de maior importância à saúde pública, pois os mesmos produzem aflatoxinas, que são metabólitos secundários capazes de provocar doenças tanto em humanos quanto em animais, quando este alimento é destinado ao consumo. Diversas técnicas tem sido elaboradas com a finalidade de um diagnóstico mais rápido e específicos destes patógenos. O objetivo deste trabalho foi identificar amostras de amendoim contaminadas com estes fungos com potencial toxigênico, capaz de provocar danos à saúde dos consumidores e avaliar o polimorfismo genético do mesmo. As amostras que se encontraram positivas para as características morfológicas de *Aspergillus*, passaram por processo de extração e após isso, foi realizada amplificação das amostras através da técnica de PCR, utilizando *primers* com sequências específicas dos genes que participam da via biossintética da aflatoxina. Por fim as amostras foram submetidas a corte com enzimas para avaliação do polimorfismo.

PALAVRAS-CHAVE: aflatoxinas, fungos, micotoxinas.

1 INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) adapta-se a uma larga faixa climática dentro das regiões tropicais e subtropicais (FAGUNDES, 2002) e é um alimento muito susceptível a infestações por fungos e contaminação por micotoxinas (GONÇALEZ, et al., 2008).

O clima tropical do Brasil propicia condições favoráveis para a proliferação dos fungos responsáveis pela produção das aflatoxinas. (NEVES, et.al., 2009). E nos países tropicais, as perdas causadas por fungos são em torno de 4%, podendo chegar até 30% em alguns países, principalmente devido às temperaturas e umidades relativas altas (LOPES et. al., 2005).

Linhagens de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* produzem como metabólitos tóxicos as aflatoxinas e estas causam problemas à saúde dos animais, as chamadas micotoxinas (alterações patológicas ou funcionais). As aflatoxinas são metabólitos fúngicos secundários produzidos por algumas linhagens das espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e, mais raramente, *Aspergillus nomius*. (SANTUARIO; FERNANDO; ROSA, 2006). Existem diversos tipos de aflatoxinas onde a maioria delas são capazes de causar doenças em humanos e animais. Elas podem afetar uma ampla gama de mercadorias, tais como cereais, nozes, carne, frutas secas, sendo uma das principais fonte de exposição o amendoim, que é um alimento mais susceptível e consumido em grande quantidade (MAGNUSSEM, PARSI., 2013).

¹ Acadêmicos do Curso de Biomedicina da UNICESUMAR - Centro Universitário de Maringá, Maringá – PR. Programa de Bolsas de Iniciação Científica da UniCesumar (PROBIC). jessicahellen_16@hotmail.com.br, businessvalber@gmail.com

² Orientadora, Doutora, Docente do Curso de Biomedicina da UNICESUMAR – Centro Universitário de Maringá. alessandra.oliveira@unicesumar.edu.br



Há mais de 100 fungos que são considerados toxigênicos e aproximadamente 300 substâncias já foram identificadas como micotoxinas, porém o número de pessoas afetadas por micotoxinas ainda é desconhecida (MURAY, et.al., 2006). Entre os gêneros fúngicos envolvidos na produção de micotoxinas destaca-se *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* e *Fusarium sp.* As espécies de *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* costumam contaminar alimentos durante a secagem e armazenamento. (HERMANN, et.al., 2006)

Segundo o Centro Nacional de Pesquisa Agroindustrial Tropical (CNPAT), nos últimos anos foi confirmada a presença de diversos fungos, incluindo *Aspergillus flavus*, associado à deterioração de grãos. E no Brasil ainda vivemos com condições inadequadas de plantio, colheita, secagem, transporte e armazenamento de produtos agrícolas favorecendo assim a contaminação por fungos toxigênicos (LOPES, et.al., 2005).

O uso de técnicas moleculares e marcadores bioquímicos, de proteínas e isoenzimas tem possibilitado o desenvolvimento de diversas metodologias, que são rápidos, sensíveis e específicos para o diagnóstico de patógenos de plantas, que permite aos agricultores e produtores de sementes a garantia de um insumo de alta qualidade, livre de agentes causadores de doenças de importância epidêmica (SILVA-MANN et al., 2001).

Para diferenciação de alguns fungos que se assemelham na morfologia macroscópica, pode ser realizada técnicas moleculares tais como corte com enzimas, onde a diferenciação é feita através da visualização em gel de agarose, fragmentos de DNA separados por tamanho.

Diversos pesquisadores tem descrito a utilização de técnicas fundamentadas em PCR e sequenciamento de DNA na detecção direta de microrganismos em alimentos (GANDRA, 2008; ROSSEN, et.al., 1991; JESEN, et.al., 1994; DESTRO, 1995; GANDRA, 2006;). Diversas variações têm sido desenvolvidas, para tornar a PCR um sistema de triagem epidemiológica. Diversos estudos utilizando essas técnicas moleculares para a diferenciação de fungos micotoxigênicos têm sido relatado na literatura (YODER & CRISTIANSON, 1998).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram analisadas 50 amostras de amendoim (*Arachis hypogaea L.*) *in natura* que são destinadas ao consumo humano, coletadas de forma aleatória em diversos pontos de venda do comércio de Maringá, Paraná no período de abril de 2013 a junho de 2013. Foram coletados 500 g de cada amostra, na qual até a análise foram mantidas sob refrigeração a -20°C.

2.2 PREPARAÇÃO DE CULTURA PARA ISOLAMENTO DE *ASPERGILLUS*

Para o isolamento de colônias do *Aspergillus*, fragmentos das amostras foram colocados em placas de petri contendo meio sabouraud, e após o surgimento das colônias, foi realizado o repique onde os isolados foram transferidos para uma cultura pura em placas petri contendo o mesmo meio. Após a obtenção das culturas puras uma parcela foi transferida para um *ependorff* contendo meio batata líquido, para que pudesse ocorrer o desenvolvimento do micélio por uma semana.



2.3 EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS

A extração de DNA seguiu o protocolo de Cenis (1992) com adaptações. As amostras foram centrifugadas para obtenção do pellet, e adicionado tampão TE e uma nova centrifugação foi feita. A cada 10mg do micélio foram utilizados 0,2mL do tampão de extração (3% SDS; 0.5mM EDTA; 1.0M NaCl; 0.1mM Tris-HCl pH 8.0), o micélio foi “esmagado” para lisar as células e liberar o DNA no meio, em seguida adicionou-se acetato de sódio pH 5,2 e a amostra descansou por 10 minutos a -20°C . Uma nova centrifugação foi feita e o sobrenadante foi armazenado em outro *ependorff* e uma mesma proporção de isopropanol foi adicionada. Após essa etapa foram adicionadas aos tubos álcool 70%, e depois da evaporação do álcool, 50 uL de tampão TE foi adicionado e o pellet foi então ressuscitado. Por fim, as amostras foram congeladas até que pudesse ser feita a quantificação do DNA extraído.

2.4 AMPLIFICAÇÃO POR PCR E CORTE COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Para o diagnóstico molecular das espécies de *Aspergillus* foi usada a técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) que amplificou segmentos de DNA usando *primers* específicos. O resultado da PCR foi observado por eletroforese em gel de agarose, onde os produtos da PCR foram separados por tamanho, a visualização dos fragmentos de DNA foi feita sob luz ultravioleta. Posteriormente a região amplificada foi clivada com enzimas de restrição para verificação do polimorfismo genético.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho, passou por modificações durante sua realização. Após as ampliações por técnica de PCR, as amostras seriam submetidas a seqüenciamento para identificação de polimorfismos genéticos. Esta ultima fase seria realizado em outra instituição de ensino, que possuía um seqüenciador, porém, o mesmo se encontrou em desuso durante todo o percurso do projeto, pois não estava funcionando, e passava por manutenção. Diante disso, ficou impossibilitado de se realizar esta etapa, e então, adicionou a técnica molecular com corte com enzima.

Neste trabalho analisou-se 50 amostras de amendoim sendo 30 amostras *in natura* e 20 amostras á vácuo, coletadas de forma aleatória no comércio varejista de Maringá-PR. Das 50 amostras analisadas, 49 apresentaram crescimento fúngico, com características morfológicas para *Aspergillus flavus* e/ou *Aspergillus parasiticus*.

As amostras com positividade foram então submetidas a extração e depois amplificação por técnica de PCR, utilizando um espaçador intergênico *afIR-afIJ*, que está diretamente relacionado com os genes da biossíntese da aflatoxina. Estas técnicas moleculares, vem sendo muito utilizadas na identificação destes patógenos, por estarem se tornando mais rápidas e sensíveis, sendo assim, é um importante passo para a prevenção da presença de micotoxinas no substrato, garantindo a qualidade do produto, tanto para a comercialização *in natura* quanto já processado. Um estudo feito por Amorim *et al.* realizado em Alagoas com amendoins *in natura* e processados destaca-se a contaminação maciça por este gênero de fungo, nos dois tipos de amostras, porém com maior incidência nas amostras *in natura*.



Destas 49 amostras, 36 amplificaram usando o espaçador intergênico *aflR-aflJ*. Estas amostras que foram amplificadas, estão sendo cortadas com enzimas de restrição, para identificação de polimorfismo genético.

4 CONCLUSÃO

O presente trabalho, ainda encontra-se me fase de finalização, mas o que se pode concluir, é que as técnicas moleculares utilizadas permitem um diagnóstico preciso do fungo em estudo, onde o mesmo possui propriedades toxigênicas capazes de provocar danos a saúde do consumidor. Por este motivo, a identificação e caracterização deste tipo de fungo, evita a presença de micotoxinas nos produtos, e permite uma melhor qualidade aos que forem destinado a comercialização.

REFERÊNCIAS

AMORIM, E. P.R. et al . Qualidade sanitária de grãos e frutos de amendoim comercializados no estado de Alagoas e identificação através de características culturais de espécies do gênero *Aspergillus*. **Summa phytopathol.**, Botucatu , v. 36, n. 4, Dec. 2010 .

DESTRO, M.T. *Listeriamonocytogenes* em camarão (*Penaeus brasiliensis*): marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação em uma unidade processadora de pescado. **Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)**–Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

FAGUNDES, M. H. Sementes de amendoim: alguns comentários. **Conab. Brasília**, 02 out. 2002.

GANDRA, E.A. Multiplex PCR para detecção de *S. aureus*, *S.intermedius* e *S. hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado. **Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial)**–Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

GANDRA, E.A. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Sci. Technol.** Maringá, v.30, n.1, p.109-118. 2008.

GONÇALEZ, E. et al. Avaliação da micoflora e ocorrência de micotoxinas em cascas de amendoim em diferentes estágios de maturação da vagem. **Ciência e Agrotecnologia. Lavras**, p.1380-1386. 2008

HERMANN, G. et.al. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos.** Campinas, v.26,n.1, jan/mar.2006.

JENSEN, M.A. et al. The application of a PCR-based assay for the detection of *Salmonella*. In: GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. Las Vegas. Abstracts. Las Vegas: **ASM**, p. 369, 1994.



LOPES, P.R.S. et.al. Crescimento e alteração no fígado e na carcaça de alevinos de Jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.40, n.10, out.2005.

MOLLER, E.M. et.al. Species-specific PCR assays for the fungal pathogens *Fusariummoniliforme* and *Fusariumsubglutinans* and their application to diagnose maize ear rot disease. **Journal of Phytopathology**. v.147, p. 497-508. 1999.

MURRAY, et.al. **Microbiologia Médica**. 5 ed. Rio de Janeiro: editora Elsevier, 2006.

NEVES, J.A. et.al. Determinação de presença de aflatoxinas em castanhas de caju. **UEPG Ci. Exatas Terra**. Ponta Grossa, v.15, n.1, p. 39-44, abr. 2009.

SANTURIO, Janio M.; FERNANDES, Adriano; ROSA, Alexandre Pires. **Desempenho de pintos de corte oriundos de matrizes de corte alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de aflatoxina**. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA: Chapecó, 2006.

SILVA-MANN, R; SALGADO, K. C.C; VIEIRA, M.G.G.C; MACHADO, J.C. Variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília. 2002.

YODER, W.T.; CRISTIANSO, L.M. Species-specific primers resolve members of *Fusarium* section *fusarium*. Taxonomic status of the edible "Quom" fungus reevaluated. **Fungal Genetics and Biology**, v.23, n.1, p. 68-80. 1998.