



OCORRÊNCIA DE *Aspergillus* spp. E AFLATOXINAS EM PAÇOCAS DE AMENDOIM COMERCIALIZADAS NA CIDADE DE MARINGÁ-PR

Lucas Camillo Rocha¹; Pamela Stéphani Tymniak Rezende²; Marcela Funaki Reis³

¹Acadêmico do curso de Biomedicina, UNICESUMAR, Maringá-PR. Bolsista PIBIC/UniCesumar.

²Pós-graduanda em Análises Clínicas e Toxicológicas, UNICESUMAR, Maringá-PR.

³Orientadora, Profa. Dra. do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UNICESUMAR, Maringá-PR.

RESUMO: Este estudo teve por objetivo identificar por técnica de PCR a ocorrência de *Aspergillus* spp. em paçocas de amendoim comercializada em Maringá-PR. Para tanto foram analisadas 10 amostras de paçocas que foram inoculadas em meio PDA para verificar o crescimento fúngico e destas 4 amostras estavam contaminadas. O micélio e esporos das colônias fúngicas foram utilizadas para extração de DNA e reação em cadeia da polimerase utilizada para a identificação molecular dos fungos. Foi observado que embora 4 amostras tenham sido positivas para crescimento fúngico, estes fungos não se tratam de produtos de aflatoxinas, pois não houve amplificação do *amplicons* IGS. No entanto, por meio deste estudo não é possível assegurar a segurança destes alimentos quanto à presença de aflatoxinas, sendo sugeridos estudos que avaliem a presença de aflatoxinas.

PALAVRAS-CHAVE: Derivados de amendoim, Carcinogênico, Contaminação, Micotoxina, PCR.

1 INTRODUÇÃO

Considera-se contaminante químico de alimento toda substância que não seja um de seus componentes naturais, mas apresente risco a quem os consome (MIDIO, 2000). Dentre essas substâncias estão as aflatoxinas, que são micotoxinas produzidas como metabolito secundário de fungos como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*. O crescimento destes em produtos agrícolas resulta em prejuízos para a economia e riscos tanto para saúde humana como para a dos animais (IARC, 2002; OLIVEIRA et al., 2009; OLIVEIRA e KOLLER, 2011). É apontado que as aflatoxinas são carcinogênicas e por este motivo a ANVISA estabeleceu um limite de contaminação máximo dos alimentos para assegurar a qualidade de produtos comumente contaminados por estas substâncias (IARC, 2002; BRASIL, 2011).

Nesta perspectiva entre os produtos brasileiros frequentemente relatados o amendoim (*Arachis hipogaea*) é sem dúvida o grão mais investigado (SANTOS et al., 2001; OLIVEIRA; CASTILHO; KOLLER, 2011). Por esse entendimento, as paçocas de amendoim comercializadas podem estar contaminadas por *Aspergillus* spp. e o emprego de técnicas de identificação molecular pode contribuir com informações precisas sobre a identificação de fungos de aflatoxinas presente nestes alimentos. Assim, este estudo teve como objetivo identificar por técnica de PCR a ocorrência de *Aspergillus* spp. em paçocas de amendoim comercializadas em Maringá-PR.

2 DESENVOLVIMENTO

Foram analisadas 10 amostras de paçocas oriundas do comercio no município de Maringá-PR coletadas aleatoriamente em 2017. A verificação de contaminação fúngica foi realizada por meio de



semeadura de amostras de 10g de paçoca diluídas em água peptonada e inoculadas em meio PDA por pour plate (SWANSON et al., 1992; MARVIN, 1976). Após 5 dias de incubação à 23°C \pm 2°C foram contadas as colônias e os resultados expressos em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Em seguida foi realizado o isolamento das colônias fúngicas por meio do uso da técnica do ponto central como descrito por Pitt et al. (1997).

Para extração de DNA a partir do micélio e esporos de *Aspergillus* spp. foi utilizada a metodologia proposta por Hui-Yeng (2014), com modificações. Em um tubo Eppendorf foram adicionadas 3 alçadas da colônia filamentosa e misturada junto com 500 μ L do tampão de lise (Tris- HCL 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5%). Em seguida foram adicionados 5 μ L de RNase (10mg/mL) e posteriormente aplicado igual volume (500 μ L) da solução de cloarofane: IAA (24:24: 1). O DNA extraído foi precipitado com isopropanol, desidratado com álcool 70% e ressuscitado com solução TE.

Para visualização da qualidade do DNA extraído foi utilizado à metodologia de Kanbe et al. (2002) com modificações.

A caracterização molecular dos fungos foi realizada através da amplificação da região IGS pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguindo o protocolo de (Khoury et al. 2011). A reação de PCR foi realizada em um volume total de 50 μ L, contendo 25 ng de DNA genômico, tampão de PCR 10x, 5 μ L de MgCl₂, 0,5 μ L de mix de dNTPs, 2 μ L de cada primer reverse (5'-GTCCACCGGCAAATCGCCGTGCG-3') e forward (5'- AGGAATTCAGGAATTCTCAATTG-3'), e 0,4 μ L da Taq DNA Polimerase. A reação foi realizada em termociclador e os resultados visualizados em corrida eletroforética com gel de agarose na concentração de 2,5% e Ladder de 100pb.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foi realizada a análise por identificação molecular de fungos produtores de aflatoxinas em paçocas. Foram analisadas 10 amostras de paçocas de amendoim de diferentes marcas comerciais obtidas no comércio de Maringá-PR em 2017. Inicialmente amostras de cada paçoca foram isoladas em meio de cultura PDA para verificar a ocorrência de crescimento fúngico e contagem de Unidades Formadoras de Colônias - (Tabela 1) e observados que 4 amostras estavam contaminadas por fungos. Embora, as paçocas estivessem devidamente embaladas houve contaminação destes produtos que podem ter ocorrido após a produção das paçocas. É reconhecido que o armazenamento de alimentos envolve vários fatores que influenciam na proliferação de fungos como aeração, atividade de água, temperatura e características do próprio alimento que favorecem interações com fômites de fungos ao alimento (PINHEIRO, 2004).

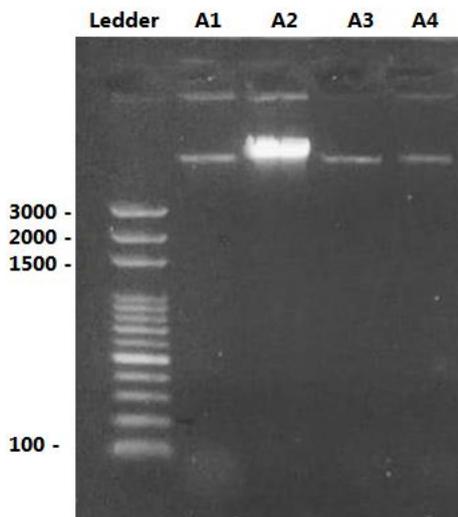
| Amostra | Contaminação Fúngica (%) | Número de Colônias (UFC/mL) |
|---------|--------------------------|-----------------------------|
| 1 | 0 | 0 |
| 2 | 100 | 8 |
| 3 | 100 | 10 |
| 4 | 100 | 8 |
| 5 | 0 | 0 |
| 6 | 17 | 7 |
| 7 | 0 | 0 |
| 8 | 0 | 0 |
| 9 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 0 |

Tabela 1. Análise de amostras de paçoca de amendoim em relação ao percentual de contaminação fúngica.

Após a confirmação de contaminação fúngica as 4 amostras foram utilizadas para análise molecular de identificação do fungo.

Para tanto foi realizada a extração de DNA genômico seguida de eletroforese em gel de agarose a fim de averiguar os resultados e quantificar o DNA para preparação da reação em cadeia da polimerase - PCR (Figura 2).

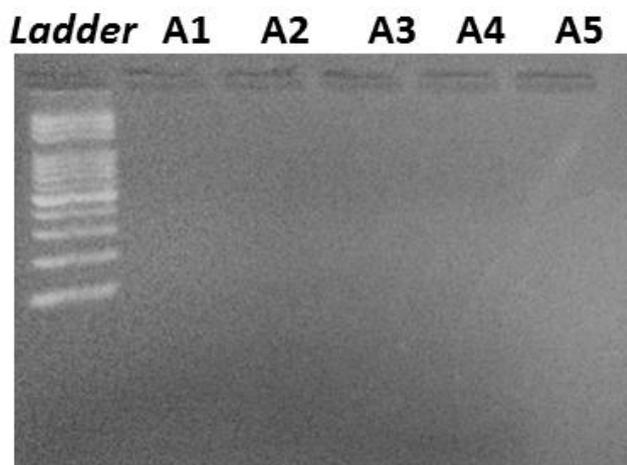
Figura 2. Eletroforese em gel de agarose de amostras de DNA de fungos contaminantes.



Legenda: Gel de agarose à 1%, *Ladder* Amresco 1kb, A1: amostra 2; A2: amostra 3, A3: amostra 4; (A4): amostra 6.

Para amplificação da região responsável pela biossíntese de aflatoxinas que identifica fungos produtores desta micotoxina foi utilizada a PCR com *primers* IGS (Figura 3).

Figura 3: Resultado da PCR dos *primers* IGS.



Legenda: Gel de agarose à 2,5%, *Ladder* LudwigBiotec 100pb, A1: amostra 2; A2: amostra 3, A3: amostra 4; A4: amostra 6; A5: controle negativo (água).

Por meio deste resultado é possível afirmar que embora as paçocas estivessem contaminadas por fungos, os fungos não se tratam de espécies produtoras de aflatoxinas, pois não houve amplificação do *amplicon* esperado. A ampliação da região IGS compreende a região do espaçador intergênico dos genes responsáveis pela biossíntese da aflatoxinas e a técnica molecular utilizada identifica as espécies *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (GARCIA, 2011), sendo estas de maior interesse.

No presente trabalho não é possível descartar a existência de aflatoxinas em paçocas, caso a contaminação tenha acontecido no amendoim e devido ao processamento tenha ocorrido a morte dos fungos.



Em estudo realizado em rações para aves foi verificado que em 50% delas havia presença de aflatoxinas mesmo na ausência dos fungos, indicando que o crescimento do fúngico ocorreu em etapas anteriores ao processamento (CHALFOUN et al, 2008). Outra justificativa podem ser obtida por estudos realizados por Sylos et al. (1996) que indicaram que o calor do processo de produção de alimentos pode diminuir ou destruir a contaminação fúngica advinda das matérias primas, porém não é suficiente para degradar totalmente as aflatoxinas, uma vez que estas são extremamente resistentes ao calor. No entanto como este estudo analisou apenas a presença destes fungos não é possível fazer inferências sobre este fato. Assim, são sugeridos estudos futuros que analisem e relacionem a presença de fungos produtores de aflatoxinas e aflatoxinas na matéria-prima antes do processamento, no produto e após armazenamento para verificar com segurança na qualidade das paçocas em relação a contaminação por aflatoxinas e desta maneira assegurar o consumo deste alimento.

4 CONCLUSÃO

O presente trabalho proporciona conhecimentos a serem adicionadas as futuras pesquisas na área de ênfase ao consumo de alimento visando sua grande importância. As metodologias utilizadas neste trabalho se mostraram eficazes, contudo outras metodologias devem ser aplicadas ao âmbito de quantificar as micotoxinas para maiores conclusões. As amostras de paçoca utilizadas na pesquisa se mostraram próprias para o consumo e comércio, pois não apresentaram presença de fungos produtores e aflatoxinas.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 7, 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 9 março 2011.

CHALFOUN, Y et al. 2008. Análises microbiológica e de aflatoxinas no controle de qualidade de rações para cães. **Revista Científica Seropédica**, 28; 25-27.

DE OLIVEIRA, Letícia da Silva Favretto; DE CASTILHO KOLLER, Francisco Fernando. Ocorrência de *Aspergillus* spp. e aflatoxinas em amostras de amendoim in natura e paçocas. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 5, n. 1, p. 57-68, 2011.

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-SP, 2011.

International Agency for Research on Cancer. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, nephthalene and styrene. **IARC Monographic Evaluation Carcinogen Risks Humans**, v. 82, p. 1-556, 2002.

KANBE, B. et al. PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. **Yeast**, v. 19, p. 973-989, 2002.



MERCOSUL/GMC (Mercado Comum do Cone Sul/Grupo Mercado Comum). **Resolução nº 25 de 2002.** Regulamento Técnico Mercosul sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho. Disponível em: <http://anvisa.gov.br/legis/resol/mercosul/alimentos/25_02.pdf>. Acesso em: 03 abril 2017.

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de Alimentos.** São Paulo: Livraria Varela, São Paulo, 2000.

OLIVEIRA C. A. F.; GONÇALVES, N. B.; ROSIM, R. E.; FERNANDES, A. M. Determination of Aflatoxins in Peanut Products in the Northeast Region of São Paulo, Brazil. **International Journal Molecular Scienc**i, v. 10, p. 174-83, 2009.

OLIVEIRA, L. S. F.; KOLLER, F. F. C. Ocorrência de *Aspergillus* spp.e Aflatoxinas em amostras de amendoim in natura e paçocas. **Revista Ciências Ambient is**, v. 5, p. 57-68, 2011.

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 Pósgraduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia**, Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2004.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage.** 3. ed. Australia: Springer, p. 503, 1997.

SWANSON, K. M. J. et al. Colony count methods. In: Vanderzant, C.; Splittstoesser, D. S. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** Washington, USA: American Public Health Association, p. 534-541, 1992.

SYLOS, C. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; PINTO, C. A. Comparação de imunodosagem e cromatografia e minicoluna para triagem de aflatoxinas e amendoim e milho. São Paulo. **Revista Nutrição Alimentos**, 7:7-14. 1996.

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.

HUI-YENG, Y.; SHIN-YEE, F.; NEGT-HONG, T.; SZU-TING, N.; CHON-SENG, T. DNA Barcode Markers for Two New Species of Tiger Milk Mushroom: *Lignosus tigris* and *L. cameronensis*. **International Journal of Agriculture and Biology**, 16: 841-844, 2014.