

ANÁLISE MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *Aspergillus* CONTAMINANTES DE UVAS VENDIDAS NO COMÉRCIO DE MARINGÁ-PR

Janaina Nicolau de Oliveira*
Alessandra Valéria de Oliveira**
Eline Ramos Meneghello***

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 pode contaminar uvas em seus diversos estágios de produção. As técnicas tradicionais para identificação das espécies de fungos produtores de micotoxinas são demoradas e, normalmente, as características morfológicas são insuficientes para distinguir espécies próximas, sendo necessária a utilização de técnicas moleculares para detecção. Este trabalho teve como objetivo a identificação molecular de *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* em amostras de uvas coletadas na cidade de Maringá/PR. As análises foram realizadas a partir da coleta de 30 amostras de uvas em mercados e feiras livres, com posterior cultura em meio sabouraud com cloranfenicol para obtenção do micélio. Quando considerada positiva, a amostra foi submetida ao processo de extração e quantificação de DNA, seguido da amplificação do material genético com *primers* específicos. Das 30 amostras analisadas 26,67% apresentaram crescimento fúngico característico e foram submetidas à análise molecular. Dessas, 25% foram identificadas como *A. niger* e 12,5% como *A. carbonarius*. Os testes moleculares utilizados foram eficientes para detectar a presença de espécies de fungos produtores de toxinas em uvas vendidas no comércio da cidade de Maringá/PR. A análise microbiológica evidenciou a presença de outras espécies fúngicas nas amostras, contudo a distinção em nível de espécie não foi possível, sendo necessária a realização de testes moleculares adicionais.

PALAVRAS-CHAVE: *Agregado Niger*; OTA; RAPD; Uva; Variabilidade Genética.

MOLECULAR ANALYSIS OF *Aspergillus* SPECIES WHICH CONTAMINATE GRAPES SOLD IN MARINGÁ PR BRAZIL

ABSTRACT: Food contamination by fungi may cause health risks, especially when mycotoxins are produced. Ochratoxin A (OTA) has been focused due to the production of several toxic carcinogenic, teratogenic, immunosuppressor and nephrotoxic effects. OTA is mainly produced by *Aspergillus* fungi which may contaminate grapes during the various production stages. Traditional techniques for the identification of mycotoxin-producing fungus species are slow and normally the morphological characteristics are insufficient to distinguish close species. The use of molecular techniques for detection is thus required. Current analysis aims at the molecular identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in grape samples collected in Maringá PR Brazil. Analyses were undertaken from a collection of 30 grape samples in markets and fairs, with culture in sabouraud medium and chloramphenicol to obtain the mycelium. When positive, the sample was submitted to DNA extraction and quantification process, followed by the amplification of genetic material with specific primers. Further, 26.67% of the 30 samples had characteristic fungus growth and underwent molecular analysis, of which 25% were identified as *A. niger* and 12.5% as *A. carbonarius*. Molecular tests were efficient to detect toxin-producing fungus species

* Biomédica. Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá – UEM; E-mail: janaina.noliveira@hotmail.com

** Coordenadora e Docente do curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR; E-mail: alessandra.oliveira@unicesumar.edu.br

*** Biomédica. Setor de Comissão de Controle de Infecções Hospitalares da Santa Casa de Misericórdia de Maringá. E-mail: eline_meneghello@hotmail.com

in grapes sold in Maringá PR Brazil. Microbiological analysis evidenced other fungus species in the samples although distinction at species level was not possible. Additional molecular tests were required.

KEYWORDS: *Aspergillus Niger*; OTA; RAPD; Grape; Genetic Variability.

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). Alimentos como grãos, legumes, café, frutas secas, cerveja, vinho, carne e uvas podem conter ocratoxina A, que geralmente consiste em um metabólito dos fungos *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. tubingensis* e *A. ochraceus* (PERRONE et al., 2007; PEREYRA et al., 2010).

Peraica et al. (1999) afirma que a ocratoxina A (OTA) é a toxina mais frequentemente encontrada em alimentos e também a mais tóxica, pois pode causar efeitos nefrotóxicos, imunossupressores, carcinogênicos e teratogênicos. Esta toxina recebe destaque devido ao seu elevado efeito nefrotóxico e sua classificação B2 quanto a efeitos carcinogênicos pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (FUNGARO; SARTORI, 2009).

Em uvas, os principais produtores da toxina são o *A. niger* e *A. carbonarius*, 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).

As uvas são facilmente contaminadas, por exemplo, quando têm suas bagas rompidas devido à irrigação excessiva, perfuração por aves e insetos ou contaminação prévia por outros fungos. A concentração fúngica encontrada na uva também depende de seu estágio de maturação e da espécie do fungo em análise. Cepas de *Aspergillus niger* podem ser encontradas durante todo o processo de maturação da fruta enquanto que o *Aspergillus carbonarius* pode provocar contaminação crescente, porém em menor prevalência que a espécie anterior (WELKE; HOELTZ; NOLL, 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. Segundo Welke, Hoeltz e Noll (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.

As técnicas tradicionais para identificação dos fungos produtores de micotoxinas são demoradas e, normalmente, as características morfológicas são insuficientes para distinguir espécies próximas (MORRELO et al., 2007).

O fungo *Aspergillus niger* é descrito como semelhante morfológicamente a outras espécies do mesmo gênero, como *A. brasiliensis*, *A. foetidus* e *A. tubingensis* os quais são classificados como agregado *Niger* devido a esta semelhança existente. Portanto para a correta identificação das espécies 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). Inúmeras técnicas têm sido usadas na detecção de variabilidade genética ou polimorfismo genético em organismos e a PCR (Polymerase Chain Reaction) é uma delas. Os marcadores moleculares constituem regiões do genoma possíveis de serem detectadas e cuja presença ou ausência pode caracterizar um organismo (GOSTIMSKY; KOKAEVA; BOBROVA, 1999).

Considerando a toxicidade da ocratoxina A presente nos alimentos, a identificação dos fungos em amostras colhidas no comércio de Maringá pode constituir dado importante sobre o nível de contaminação das uvas *in natura* que são consumidas e produzidas nesta região. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi identificar a presença dos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* nas amostras, que são os principais fungos colonizadores de uvas.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1 Coleta das Amostras

Foram coletadas 30 amostras de uvas em oito pontos de venda escolhidos aleatoriamente na cidade de Maringá/PR, incluindo supermercados e feiras livres. Das 30 amostras coletadas, 12 foram do tipo Niágara, 7 do tipo rubi, 4 do tipo Itália, 3 do tipo Brasil e 4 Benitaka. Além disso, foram utilizadas amostras controle de *A. carbonarius* e *A. niger* fornecidas pelo laboratório de microbiologia da UniCesumar.

As uvas foram compradas e acondicionadas em sacos plásticos lacrados para o transporte até o Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do Centro Universitário Cesumar (UNICESUMAR). Foram 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 *Sabouraud–dextrose* (SDA) com cloranfenicol a fim de se evitar o crescimento bacteriano.

Os bagos foram escolhidos aleatoriamente na amostra e fatiados em cadinho auto-clavados 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 foi realizada a partir do 7º dia.

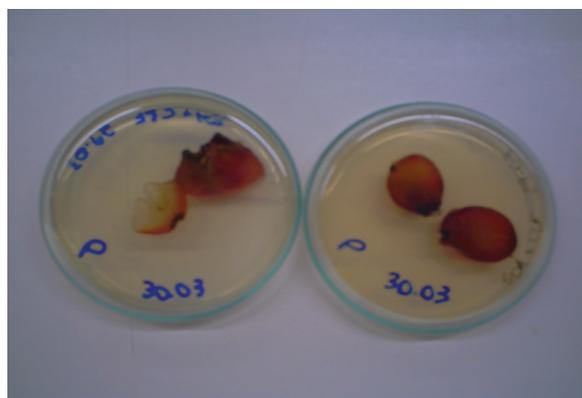


Figura 1. Cultura das amostras de uva *in natura* em meio SDA.

2.1.3 Leitura dos Resultados de Cultura

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

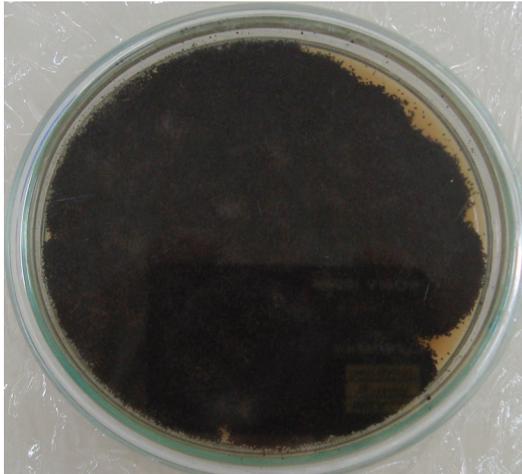


Figura 2. Aspecto macroscópico da colônia de fungos do “agregado *Niger*”, obtido a partir de amostras de uva

2.1.4 Extração de DNA

A extração do DNA fúngico seguiu o protocolo de Cenis (1992) com adaptações. 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 a 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 análises posteriores.

2.1.5 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA extraído foi realizada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio por comparação do DNA das amostras com o padrão de DNA lambda de concentração conhecida. A visualização foi realizada em aparelho transluminador sob luz ultravioleta.

2.1.6 Amplificação do DNA

Os reagentes utilizados para a reação de PCR foram tampão 10X PCR Buffer, água ultra–pura, magnésio, nucleotídeos – dNTPs, *primers*, Taq Polimerase

e amostra de DNA. Os *primers* específicos foram utilizados de acordo com Fungaro e Sartori (2009) cuja sequência para *A. niger* foi F5’CAGTCGTCCAGTACCC–TAAC / R5’ GAGCGAGGCTGATCTAAGTG enquanto que para *A. carbonarius* foi utilizado o par de *primers* 5’AGGCTAATGTTGATAACGGATGAT/ F5’AGGCTAATGT–TGATAACGGATGAT.

O ciclo de PCR foi composto por 1 ciclo inicial de 94°C por 5 minutos, seguido por 45 ciclos de 94°C por 1 minuto, 35°C por 2 minutos e 72° C por 3 minutos (LOURENÇO et al., 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 da amplificação do DNA das amostras com *primers* específicos ofereceram os dados para identificação das espécies através de comparação com amostras controle.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido à produção de micotoxinas de importância médica, os fungos do gênero *Aspergillus* tem sido constantemente foco de pesquisas em vários continentes, pois a presença destas toxinas pode ocasionar a contaminação de alimentos naturais dificultando também a comercialização 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, oito amostras (26,67%) apresentaram crescimento fúngico com características morfológicas de colônia dos fungos do “agregado *Niger*” e portanto foram consideradas positivas. Pesquisas anteriores realizadas na Itália encontraram um valor 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 amostras

coletadas na Espanha apresentaram 82% de positividade para fungos do “*agregado Niger*” (MEDINA et al., 2005). Chiotta et al. (2009) encontrou um valor de 32,5% de contaminação por fungos do “*agregado Niger*” em amostras de uvas coletadas na Argentina, aproximando-se dos valores encontrados neste trabalho. Esta variação de incidência da contaminação pode ser justificada com base nas características de crescimento fúngico do gênero em questão, que é vulnerável a mudanças climáticas, como temperatura e umidade e, portanto vulnerável também às características geológicas, como longitude e latitude de determinada região (BATTILANI et al., 2006). Este fator torna-se explicativo em relação à discrepância entre os dados deste trabalho quando comparados com dados representativos da Europa, mas que quando comparados com dados sul-americanos demonstram-se semelhantes.

Segundo Varga et al. (2003) o “*agregado Niger*” é constituído de cerca de nove espécies diferentes de *Aspergillus*, 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, sendo necessária a utilização de técnicas moleculares, geralmente baseadas em PCR.

Neste trabalho foi utilizado, durante a reação de amplificação do DNA por PCR, o *primer* descrito por Fungaro (2004) para identificação de *A. carbonarius*, com amplificação de um fragmento de DNA de 809pb, e o *primer* descrito por Sartori (2006) para identificação de *A. niger* através da amplificação de um fragmento de DNA de 372pb. Duas amostras (25%) foram positivas para *A. niger*, e 1 amostra (12,5%) foi 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).

Silva (2013), estudando a produção de micotoxinas por fungos filamentosos em uvas, sucos e vinhos da região nordeste e sudeste do Brasil, identificou as espécies ocratoxigênicas *A. niger* e *A. carbo-*

narius, sendo que todos os isolados de *A. carbonarius* foram produtores de OTA, demonstrando que esta espécie é a principal fonte desta toxina em uvas e dessa forma a importância de sua detecção.

Além destas espécies pertencentes ao “*agregado Niger*”, outras foram encontradas através da análise microbiológica, porém não foi possível identificá-las em nível de espécie, sendo necessária a realização de testes moleculares adicionais, com a utilização de outros pares de *primers* específicos.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os testes moleculares utilizados foram eficientes para detectar a presença de espécies de fungos produtores de toxinas *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger* em uvas vendidas em diferentes pontos de venda na cidade de Maringá. A análise microbiológica evidenciou a presença de outras espécies fúngicas nas amostras, contudo a distinção em nível de espécie não foi possível, sendo necessária a realização de testes moleculares adicionais.

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.
- BATTILANI, P.; BARBANO, C.; MARIN, S.; SANCHIS, V.; KOZAKIEWICZ, Z.; MAGAN, N. Mapping of *Aspergillus* section nigri in southern Europe and Israel based on geostatistical analysis. **International journal of food microbiology**, v. 111, p. 72–82, 2006.
- 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**, v. 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**, v. 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**, v. 52, p. 241–248, 2009.
- FUNGARO, M. H.; SARTORI, D. An overview on molecular markers for detection of ochratoxigenic fungi in coffee beans. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 52, p. 1–9, 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.
- GOTMISKY, S. A.; KOKAEVA Z. G.; BOBROVA V. K. Use of molecular marker for the analysis of plant genome. **Research Journal of Genetics**, v. 11, n. 35, p. 1538–49, 1999.
- 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**, v. 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.
- MAGNANI, M.; FERNANDES, T.; PRETE, C. E. C.; HO-MECHIM, M.; ONO, E. Y. S.; VILAS-BOAS, L. A.; SARTORI D.; FURLANETO, M. C.; FUNGARO, M. H. P. Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 1, p. 45–49, 2005.
- 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.
- 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.
- PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin of world health organization**, v. 77, n. 9, 1999.
- PEREYRA, C. M.; CAVAGLIERI, L. R.; CHIACCHIERA, S. M.; DALCERO, A. M. 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**, v. 59, n. 1, p. 53–66, 2007.
- 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.

SILVA, D. M. **Fungos filamentosos e micotoxinas em uvas, sucos, mostos e vinhos das regiões sudeste e nordeste do Brasil**. Tese (Doutorado) – Universidade de Lavras. Disponível em: <<http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/758>>. Acesso em: 2013.

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.

VECCHIA, A. D.; CASTILHOS-FORTES, R. Contaminação fúngica em granola comercial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p.324–327, 2007.

VOGEL, S. D.; JIMÉNEZ, L. C. V. Micotoxinas en la salud pública. **Revista salud pública**, v. 8, n. 1, p. 129–135, 2006.

WELKE, J. E.; HOELTZ, M.; NOLL, I. B. Aspectos relacionados à presença de fungos toxigênicos em uvas e ocratoxina A em vinhos. **Ciência rural**, v. 39, n. 8, p. 2567–2575, 2009.

Recebido em: 26 de novembro de 2013

Aceito em: 28 de novembro de 2013