



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

**BIODIVERSIDADE DAS ESPÉCIES TOXIGÊNICAS DE *ASPERGILLUS* NO BRASIL:
OCORRÊNCIA, TAXONOMIA POLIFÁSICA E DISTRIBUIÇÃO**

Júlia Maria da **Silveira**^{1a}; Marta Hiromi **Taniwaki**^{1b}; Beatriz Thie **Iamanaka**^{1c}; Camila K. **Possari**^{1c};
Aline Morgan **Von Hertwig**^{1c}

¹ Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos,
Unidade laboratorial de Microbiologia

Nº 13218

RESUMO - *As espécies de Aspergillus estão entre os mais importantes fungos produtores de micotoxinas. O Brasil possui uma biodiversidade muito grande destes fungos que precisa ser mais explorada. O objetivo deste trabalho foi identificar espécie toxigênicas de Aspergillus utilizando os caracteres morfológicos e fisiológicos. Durante o período, um total de 60 amostras de alimentos foi analisado sendo: café, cacau e amendoim. Os cafés provenientes dos Estados de Minas Gerais e São Paulo, o cacau da Bahia e Pará e o amendoim do Estado de São Paulo. Houve uma grande diferença na atividade de água entre as amostras de cafés coletadas em diferentes estádios de processamento. As amostras de cacau e amendoim apresentaram uma variação intermediária nos valores de atividade de água. Destes alimentos, foram isolados 1208 fungos, sendo 28,5% pertencentes a Aspergillus section Flavi, 13,9% Aspergillus section Nigri, 0,16% Aspergillus section Circumdati e 57,3% de outras espécies de fungos, entre estes estavam Fusarium sp., Penicillium sp., Eurotium sp., fungos dematiáceos, hifomicetos e outros fungos. Dos pertencentes a A. section Flavi, 33,8% foram produtores de aflatoxinas B1 e B2 e 2,7% foram produtores de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. Dos produtores de ocratoxina A apenas 2,1% foram positivos.*

Palavras-chaves: micobiota, amendoim, café, cacau, micotoxinas.

^{1a} Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Campinas-SP, julia.m.silveira@hotmail.com

^{1b} Orientadora: Pesquisadora, CCQA/ITAL, Campinas-SP.

^{1c} Colaborador: CCQA/ITAL, Campinas-SP.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

ABSTRACT- *The Aspergillus species are among the most important fungi producers of mycotoxins. Brazil has a very large biodiversity of these fungi that needs to be explored. The objective of this study was to identify toxigenic Aspergillus species using morphological and physiological features. During the period, a total of 60 food samples was analyzed such as coffee, cocoa and peanuts. Coffee samples from the States of Minas Gerais and São Paulo, cocoa from Bahia and Pará, and peanuts from the State of São Paulo. There was a big difference in water activity among coffee samples collected at different stages of processing. The cocoa and peanut samples showed an intermediate value of water activity. From these foods 1,208 fungi were isolated, 28.5% belonging to Aspergillus section Flavi, 13.9% Aspergillus section Nigri, 0.16% Aspergillus section Circumdati and 57.3% of other species of fungi, among them were Fusarium sp., Penicillium sp., Eurotium sp., dematiaceous fungi, hyphomycetes and other fungi. From those belonging to A. section Flavi, 33.8% were aflatoxins B1 e B2 producers and 2.7% were aflatoxins B1, B2, G1 e G2 producers. From ochratoxin A producers only 2.1% were positive.*

Key-words: mycobiota, peanuts, coffee, cocoa, mycotoxins.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma biodiversidade pouco explorada na área de espécies toxigênicas de fungos incluindo as espécies de *Aspergillus* que estão entre os mais importantes fungos produtores de micotoxinas. A identificação correta à nível de espécie é muito importante na micologia de alimentos, porque existem várias características associadas à cada espécie. Além disso, o conhecimento da distribuição das espécies toxigênicas nos alimentos pode fornecer parâmetros para o controle e prevenção da produção de toxinas pelos fungos. Nestas condições, o presente projeto teve como objetivo estabelecer uma taxonomia polifásica para a identificação de espécies toxigênicas de *Aspergillus* que têm sido isoladas no Brasil.

O gênero *Aspergillus* é um dos mais importantes gêneros de fungos filamentosos. As espécies de *Aspergillus* são usadas na fermentação industrial, mas também podem estar presentes em diversos produtos agrícolas, e causar mudanças na qualidade como: sensorial, nutricional, pigmentação e descoloração.

As micotoxinas são metabólitos tóxicos, produzidos por algumas espécies fúngicas durante o seu crescimento, com efeitos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos sobre humanos e



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

animais. As micotoxinas são contaminantes naturais de difícil controle em alimentos. Estima-se que cerca de 25% de todos os produtos agrícolas do mundo estejam contaminados por tais substâncias (Benett & Klich, 2003).

Nestas condições o presente projeto teve os seguintes objetivos: (i) Identificar as espécies toxigênicas de *Aspergillus* utilizando os caracteres morfológicos e fisiológicos; (ii) Verificar a distribuição destas espécies em café e amêndoas de cacau e amendoim, coletados de diversas partes do Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Foi coletado um total de 60 amostras de alimentos de diferentes regiões do Brasil. Aproximadamente de 1 a 2 kg de cada amostra foi coletado, conforme disponível, para análise micológica e potencial toxigênico dos fungos isolados. As amostras foram transportadas até o laboratório de Micologia e Micotoxinas do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) em bolsas estéreis e armazenadas congeladas ou refrigeradas até o momento da análise. A Tabela 1 apresenta a quantidade e origem das amostras.

Tabela 1. Quantidade e origem das amostras de alimentos coletadas

Amostra	Quantidade	Origem	Local de Coleta
Amêndoas de Cacau	5	Bahia	Processadora
Amêndoas de Cacau	5	Pará	Processadora
Café robusta	18	São Paulo	Fazenda
Café arábica	3	Minas Gerais	Fazenda
Amendoim	29	São Paulo	Cooperativa

2.2 Análise da Atividade de Água (a_w)

As amostras de alimentos foram colocadas no medidor de atividade de água Aqualab, modelo 3T (Decagon, USA). A atividade de água das amostras foram medidas em triplicata a 25°C \pm 1°C.



2.3 Plaqueamento das amostras

Para o isolamento da microbiota, as amostras foram desinfetadas separadamente com 0,4% de solução de hipoclorito de sódio por 2 minutos conforme a metodologia descrita em Pitt & Hocking (2009). Após a desinfecção, foram plaqueados 50 pedaços ou grãos dependendo do tamanho em placas de Petri, contendo o meio de cultura ágar Dicloran 18% Glicerol (DG18) para o isolamento dos fungos. As placas foram incubadas a 25°C por 5 dias. Os resultados foram expressos em porcentagem de infecção.

2.4 Isolamento dos fungos

Para identificação dos fungos, as cepas suspeitas de pertencerem à *Aspergillus* section *Flavi*, *A. section Nigri* e *A. section Circumdati* crescidas no meio DG18, foram isoladas e inoculadas no meio Czapek Extrato de levedura (CYA) e incubadas nas temperaturas de 25°C e 37°C por 7 dias. Cada isolado foi identificado de acordo com a chave de Klich (2002), Samson et al. (2010), Pitt & Hocking (2009) e Varga et al. (2011). As espécies de *Eurotium* foram cultivadas no meio ágar Czapek Extrato de Levedura 20% Sacarose (CY20S) durante 14 dias a 25°C. As espécies de *Penicillium* e as outras espécies de *Aspergillus* foram cultivadas com três pontos equidistantes no meio CYA a 25°C e 37°C por 7 dias. Em alguns casos foi também usado o meio de Creatina Sacarose (CSN) a 25°C por 7 dias (Samson et al. 2010, Pitt & Hocking, 2009). As espécies do grupo *Aspergillus* section *Flavi* foram também cultivadas no meio AFPA (meio de cultura seletivo para a detecção de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*), para auxiliar na identificação das espécies.

2.5 Avaliação do potencial de produção de micotoxinas pelas espécies de *Aspergillus*

Todos os isolados identificados como pertencentes à *Aspergillus* section *Flavi*, *A. section Nigri* e *A. section Circumdati*, foram inoculados separadamente no meio ágar Extrato de Levedura Sacarose (YESA), meio com alta concentração de sacarose e incubados a 25°C por 7 dias, para avaliação do potencial de produção de aflatoxinas e ocratoxina A. Decorrido o período de incubação, as toxinas foram extraídas, aplicando-se a técnica de ágar plug associada à cromatografia de camada delgada (TLC), de acordo com a técnica de Filtenborg et al. (1983). Os plugs foram aplicados nas placas de TLC silicagel-G de 500 µm de espessura, juntamente com 2 µL do padrão de aflatoxinas e de ocratoxina A. A placa foi colocada numa cuba com a fase móvel, constituída dos seguintes solventes: tolueno: acetato de etila: ácido fórmico 90%: clorofórmio (7:5:2:5 v/v/v/v). Após o desenvolvimento do cromatograma, as placas foram secadas, colocadas em câmara UV e observadas sob dois diferentes comprimentos de ondas, 356nm e 254nm. O



tempo de retenção e as fluorescências foram comparadas qualitativamente com os padrões de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e ocratoxina A para avaliação da presença das mesmas nas cepas testadas.

2.6 Técnicas de preservação por Sílica Gel

Para a manutenção das cepas por um longo período, seguiu-se a metodologia de Smith & Onions (1983). As cepas foram cultivadas no meio CYA a 25°C por 7 dias. Tomou-se uma suspensão de esporos num frasco pequeno com um agente protetor constituído de 5% de leite desnatado. Em seguida, a suspensão foi distribuída em tubos com sílica gel estéreis, congelados e estes foram agitados para a penetração do líquido. A secagem foi realizada em estufa ou lugar escuro por uma semana com agitações constantes. Após este período os tubos foram armazenados em refrigeração ou longe da luz.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Valores de Atividade de Água (a_w)

Houve uma grande diferença na atividade de água entre as amostras de cacau, cafés e amendoim. Os valores de atividade de água das amostras de amêndoas de cacau, café e amendoim estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de atividade de água das amostras

Amostra	$Aw_{máx}$	$Aw_{mín}$
Amêndoas de Cacau (Bahia)	0,686	0,586
Amêndoas de Cacau (Pará)	0,710	0,648
Café robusta (São Paulo)	0,952	0,404
Café arábica (Minas Gerais)	0,968	0,436
Amendoim (São Paulo)	0,970	0,383

3.2. Análise da microbiota

A Figura 1 mostra a infecção fúngica das amostras de café (A), cacau (B), e amendoim (c) após 5 dias a 25°C no meio DG18. Todas as amostras analisadas apresentaram a presença de fungos indicando susceptibilidade destes alimentos à infecção fúngica.

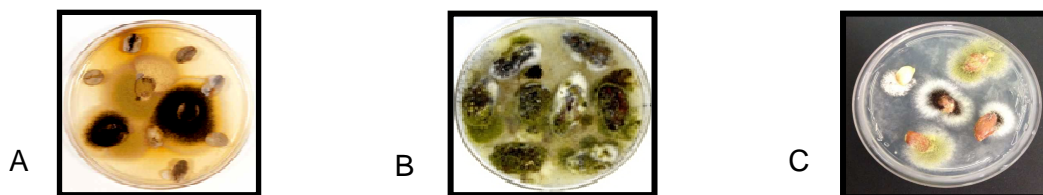


Figura 1. Infecção fúngica nas amostras de Café (A), Cacau (B) e Amendoim (C)

A Tabela 3 apresenta a porcentagem de infecção dos grupos de fungos encontrados em cada produto analisado. No caso do amendoim em algumas amostras foram plaqueadas casca e grãos separadamente e no café foram plaqueados cereja, verde e seco de algumas amostras.

Tabela 3. Porcentagem de infecção das amostras.

Amostra	% Amêndoas de Cacau		Café		Amendoim (São Paulo)
	(Bahia)	(Pará)	(São Paulo)	(Minas Gerais)	
<i>A. section Flavi</i>	138	24	10	0	372
<i>A. section Nigri</i>	18	0	4	2	256
<i>A. section Circundati</i>	0	0	0	4	0
<i>Eurotium sp.</i>	388	276	2	0	54
<i>Penicillium sp.</i>	0	0	44	34	4
Fungos dematiáceos	64	56	4	6	18
<i>Mucor sp.</i>	0	0	0	0	4
<i>Fusarium sp.</i>	0	0	174	90	60
Hifomicetos	24	43	14	16	62
Outros fungos	0	0	12	24	82

3.2 Teste de produção de toxina pelos fungos isolados

No cacau, o maior número de isolados foi do grupo *A. section Flavi* (104 isolados), sendo 27 produtores de aflatoxinas B1 e B2 e 2 de B1, B2, G1 e G2 e 8 apenas B1. Dos 9 isolados de *A. section Nigri*, nenhum foi produtor de OTA.

No café, foram encontrados apenas 3 do grupo *A. section Nigri* e entre eles, 1 isolado da amostra 29 apresentou produção de ocratoxina. Do grupo *A. section Flavi* também foram isolados poucos fungos (5), sendo 3 produtores de aflatoxinas B1 e B2 e 2 não produtores. Foram encontrados 2 fungos do grupo *A. section Circumdati*, sendo os dois produtores de Ocratoxina A.

No amendoim foram encontrados 35 produtores de Aflatoxina B1, 102 produtores de B1 e B2, 14 produtores de B1, B2, G1 e G2 e 73 fungos não produtores. Não foi isolado nenhum fungo produtor de ocratoxina A. Estes valores podem ser observados na Tabela 4.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Tabela 4. Produção de toxina pelos fungos isolados das amostras.

Amostra	Nº isolados	% produtores aflatoxinas		% produtores ocratoxina A
		B1 e B2	B1,B2,G1,G2	
Amêndoas de Cacau (Bahia)	28			
<i>Aspergillus</i> Section <i>Flavi</i>	19	5,2	10,5	
<i>Aspergillus</i> Section <i>Nigri</i>	09			0
Amêndoas de Cacau (Pará)	85	34,1	0	
<i>Aspergillus</i> Section <i>Flavi</i>	85			
Café (São Paulo)	07	60	0	
<i>Aspergillus</i> Section <i>Flavi</i>	05			
<i>Aspergillus</i> Section <i>Nigri</i>	02			0
Café (Minas Gerais)	03			
<i>Aspergillus</i> Section <i>Nigri</i>	01			100
<i>Aspergillus</i> Section <i>Circumdati</i>	02			100
Amendoim (São Paulo)	314			
<i>Aspergillus</i> Section <i>Flavi</i>	186	36,8	3,7	
<i>Aspergillus</i> Section <i>Nigri</i>	128			0

Todas as cepas de *Aspergillus* section *Flavi*, section *Nigri* e section *Circumdati* isoladas mantidas em sílica gel permaneceram viáveis.

4 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho mostram a presença de fungos toxigênicos no café, cacau e amendoim. A metodologia utilizada diferenciou as espécies de *Aspergillus* section *Flavi*, section *Nigri* e section *Circumdati*. No café existe a potencialidade de se encontrar a ocratoxina e no cacau e amendoim as aflatoxinas.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bennet, J.W. & Klich, M. Mycotoxins. **Clinic. Microbiol. Rev.**, v.16, p. 497- 516, 2003.

Filtborg, O., Frisvald, J.C. & Svendsen, J.A. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. **Appl. Environm. Microbiol.** v.45 p. 581-585, 1983

Klich, M.A. **Identification of common *Aspergillus* species**. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002, 116p.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Pitt, J. I. & Hocking, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 3rd ed. Springer, New York. 2009.

Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C. & Andersen, B. Food and Indoor Fungi. Utrecht, **The Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre**, 2009, 390p.

Smith, D.; Onions, A.H.S. **The preservation and maintenance of living fungi**. England: Commonwealth Mycological Institute, 1983, 132 p.

Varga J., Frisvad, J.C. & Samson R.A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. **Stud. Mycol.** v.69, p. 57-80, 2011.