

Isolamento de *Aspergillus flavus* micotoxigênico em noz pecan

Isolation of mycotoxigenic *Aspergillus flavus* in pecan nuts

RESUMO

Karyne Victoria Machado Delfino
karynedelfino@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Elisabete Hiromi Hashimoto
elisabete@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

A aflatoxina é produzida por fungos do gênero *Aspergillus spp*, sendo a aflatoxina B1 o composto natural mais carcinogênico já conhecido. A noz pecan (*Carya illinoensis*) possui risco moderado de contaminação por aflatoxinas. Este trabalho teve como objetivo isolar *Aspergillus flavus* produtor de aflatoxina em noz pecan. Após o isolamento as cepas fúngicas foram mantidas em BDA e inoculadas em ágar coco em triplicata, após crescimento realizou-se a extração da toxina e análise por cromatografia em camada delgada (CCD). A cepa de *Aspergillus flavus* isolada da noz Pecan não produziu AFB1, mas apresentou na CCD fluorescência semelhante a Aflatoxina G, sendo necessário mais estudos, para confirmação. **PALAVRAS-CHAVE:** *Aspergillus flavus*. Noz pecan. Biocontrole.

ABSTRACT

The Aflatoxin is produced by fungus of the gender *Aspergillus spp*, being the B1 aflatoxin the most carcinogenic compound already known. The pecan nut (*Carya illinoensis*) contains moderate risk of aflatoxin contamination. The objective of this work was the isolation of aflatoxin producer *Aspergillus flavus* in the pecan nut. Afterwards this the strains had been kept on PDA and inoculated in coconut agar, by triplicate. After it had grown, it was realized the toxin extraction and the test by Thin-layer chromatography (TLC). The isolated strain from Pecan nut didn't produce AFB1, however the TLC showed similar fluorescence to aflatoxin G, it making required more studies for the confirmations.

KEYWORDS: *Aspergillus flavus*. Pecan nut. Biocontrol.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

Micotoxinas são provenientes do metabolismo secundário de fungos filamentosos e são potencialmente perigosas para animais, incluindo os humanos. A aflatoxina é produzida por fungos do gênero *Aspergillus*, sendo produzida por *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, dos quais, os dois primeiros são os mais encontrados durante a colheita e a estocagem (YU *et al.*, 2004). Esses podem produzir quatro tipos de aflatoxinas, sendo elas B1, B2, G1 e G2, sendo diferenciadas pela sua coloração na luz UV e estrutura molecular. Diferentes linhagens podem produzir ou não, ambas, aflatoxina B1 e/ou B2 (HEDAYATI,2007).

Aflatoxina B1 é o composto natural mais carcinogênico já conhecido e classificado no grupo 1 pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC,1993). Segundo a ANVISA (2011), o limite máximo, no Brasil em nozes é de 10 µg/kg para qualquer aflatoxina.

A noz pecan (*Carya illinoensis*) é uma planta nativa da América do Norte, ocorre naturalmente nos Estados Unidos da América e sudeste do México (PECAN REPORT, 2020). No Brasil, o cultivo dessa planta é praticado principalmente em três estados do Sul/Sudeste (Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo) (GARCIA *et al.*,2019). Rio Grande do Sul tem sido o maior produtor desde 2013, e de acordo com os arquivos de agricultura do Brasil (IBGE,2019), representa 47,8% de toda a produção de nozes no Brasil.

Um dos maiores problemas na comercialização de nozes é a contaminação por aflatoxina em produtos derivados das mesmas (HAMIDO,2014). Segundo Cast (2003), nozes como amêndoas, pecans e pistaches contem risco de moderado a alto para contaminação por aflatoxinas.

Durante os vários estágios de cultivo e processo, a noz pecan está exposta a grande quantidade de microrganismos, especialmente fungos, e podem se multiplicar nos frutos, alterando a qualidade, produzindo sabores indesejados (*off-flavors*) e sintetizando micotoxinas, como a aflatoxina (PITT; HOCKING, 2009).

Para diminuir a perda de qualidade da noz pecan, é necessário o uso de fungicidas, que acabam sendo prejudiciais à saúde dos animais, porém o uso indiscriminado de fungicidas comerciais são um problema de saúde pública, causando a mutação e aciração de fungos resistentes. (PIGNATI *et al.*, 2017 apud STADLER *et al.*, 2019).

Tendo como nova onda mundial cada vez mais o uso de recursos naturais, o objetivo deste trabalho foi isolar *A. flavus* produtor de aflatoxina B1 em noz Pecan.

MATERIAL E MÉTODO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Ponta Grossa, no período de julho de 2019 a março de 2020.

Preparo da amostra

Cerca de 250 g de noz pecan (*Carya illinoensis*) foi adquirida da feira de agricultores de Ponta Grossa-Paraná. Realizou-se o quarteamento da amostra até aproximadamente 5 gramas (amostra analítica), a qual foi triturada e dissolvida em peptona bacteriológica diluída até a concentração de 0,1%. A solução resultante foi centrifugada e filtrada e em seguida essa solução sofreu diluição seriada (1:9) em 5 tubos contendo a peptona bacteriológica 0,1%. De cada um desses tubos foram inoculados 100 µL da solução nas placas de Petri contendo BDA (Batata Dextrose

Ágar), em triplicata, e incubados por 10 dias a temperatura ambiente (20-26 °C).

Isolamento e identificação de *A. flavus*

As colônias de bolores provenientes das nozes foram isoladas por repique por estria por esgotamento, buscando o isolamento das colônias de fungos com aparência macroscópica similar ao *A. flavus*. Os isolados foram identificados pelas características macroscópicas da colônia, sendo essas repicadas e propagadas em meio BDA (ágar batata dextrose) para uso nesta pesquisa. A linhagem padrão de *A. flavus* NRRL 3251, mantida em óleo mineral, foi reativada em caldo BHI (brain-heart infusion broth) por uma semana a 25 °C e o tubo foi agitado em agitador de tubos por cerca de 60 segundos, para que os esporos se soltassem. Foi transferido 0,1 mL do inóculo para placa contendo meio BDA e espalhado com a alça de Drigalski, sendo esse procedimento feito em triplicata.

Método de conservação de culturas

As culturas foram mantidas através de: a) método de preservação sob óleo mineral - as culturas foram mantidas em tubos contendo meio BDA, à temperatura de 25°C. Após a cultura atingir toda a extensão do meio, foi coberta com óleo mineral esterilizado e o frasco foi tampado; e b) método de transferência periódica - as linhagens foram repicadas, num período médio de 2 semanas. O meio utilizado foi BDA e as linhagens foram mantidas à temperatura de 25°C.

Análises Microscópicas

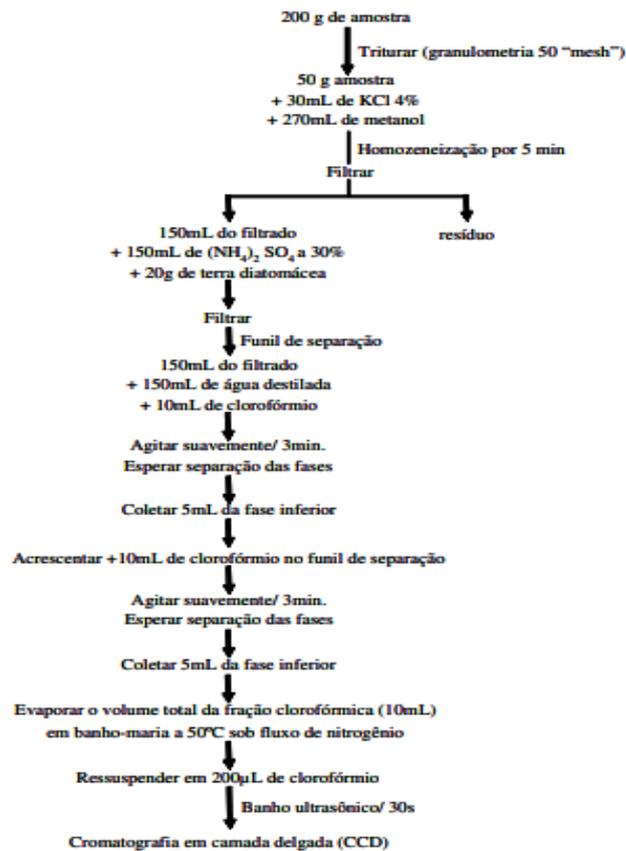
Para a identificação da cepa isolada, foram realizadas observações microscópicas dos esporos com a alça de níquel, sendo estes dispersos nas placas, contendo água destilada.

Identificação de Aflatoxina

As linhagens foram inoculadas em ágar coco (DAVIS; IYER; DIENER, 1987) em triplicata, por 15 dias, à 25°C. Após crescimento o inóculo foi extraído seguindo a metodologia de ONO (2007) como mostrada na Figura 1 para análise de identificação de aflatoxinas por cromatografia em camada delgada (CCD) (Soares e Rodriguez-Amaya, 1989; e ONO *et al.*, 2007, p. 45).

A preparação da CCD consistiu na ativação da placa cromatográfica (20 x 20 cm, sílica gel 60) e na ressuspensão das amostras extraídas e dos padrões AFB1 e AFB2 em clorofórmio (200µL) em banho ultra-sônico por 30 segundos. Após isso foi aplicado a 2 cm da base, 2 pontos de amostra (B e C) e 2 pontos de padrões (AFB1 e AFB2), respectivamente. A placa foi então colocada em cuba cromatográfica contendo a fase móvel da CCD, tolueno: acetato de etila: clorofórmio: ácido fórmico, na proporção (17,5:12,5:12,5:5). Após a corrida (10cm) a placa foi retirada e deixada para secar a temperatura ambiente, então foi colocada em incidência de luz UV a 366 nm para visualização e cálculo dos seus fatores de refração (Rf).

Figura 1 – Metodologia de quantificação de aflatoxinas por CCD (Soares e Rodriguez-Amaya, 1989).



Fonte: ONO *et al.*, 2007, pg.45

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 15 dias da inoculação foram selecionadas as cepas que apresentavam características macroscópicas similares a literatura (HEDAYATI, 2007) assim como demonstra a Figura 2.

Figura 2 – Amostra B.



Fonte: Autoria própria.

Após análises microscópicas, selecionou-se a cepa que apresentou características da espécie *A. flavus*, como cabeça conidiar aspergilar sendo de radial a globosa, vesícula globosa e estigma bisseriado tendo seus conidiosporos com superfície irregular e não pigmentada.

A cepa mantida em óleo mineral ao ser reativada, apresentou uma coloração verde mais escura que a inoculada, porém ainda dentro dos parâmetros da descrição, como mostrado na Figura 3.

Figura 3 – Linhagem NRRL 3251 reativada de *Aspergillus flavus* em meio PDA (C)



Fonte: Autoria própria

Como já demonstrado por Terabe *et al.* (2008), há incidência de produtores de aflatoxina, como *A. flavus* e *A. parasiticus* na noz pecan. Segundo as características macro e microscópicas foi possível a identificação do fungo *A. flavus* na amostra. Hedayati (2007) diz que: “*A. flavus* é encontrado nas colorações avermelhado, amarelo para verde ou marrom, com o fundo dourado a vermelho-amarronzado.” Sendo assim, a linhagem apresentou cores de amarelo à verde, com o fundo dourado, apresentando características similares ao *A. flavus* da literatura como mostrado na Figura 2. Assim como a linhagem NRRL 3251, apresentando apenas um verde mais escuro, mostrado na Figura 3.

Na CCD, pode-se observar a visualização do padrão AFB1, pela banda de cor azul, o padrão AFB2 não apresentou cor, isso pode ser explicado, pois a sua solução estava muito diluída, não sendo suficiente para que fosse captado pela luz UV. Como apresentado na Figura 4.

Figura 4 – CCD em câmara de luz UV



Fonte: Autoria própria

Obteve-se como resultado os seguintes valores de fatores de retenção (Rf): B(0,6756), C(ausente), B1(0,4054), B2(ausente). Nenhuma das amostras teve Rf e cor próxima do padrão AFB1, demonstrando ausência de aflatoxina B1 nas amostras, sendo as cepas não produtoras da AFB1. A amostra B (isolada) apresentou leve fluorescência verde, em câmara de luz UV, característica da AFG1 e AFG2, porém devido a falta de padrões específicos, não se pode afirmar se possui ou não a mesma, podendo assim demonstrar ter uma pequena quantidade de AFG1 ou AFG2.

Como descrito por Davis; Iyer; Diener(1987), a AFB1, quando em ágar coco, demonstra coloração azul (blue) perante a luz UV.

O resultado obtido pode ser explicado por diversos fatores. Segundo Taniwaki *et al.* (1993), algumas linhagens de *A. flavus* não produzem aflatoxinas, outras só produzem as do grupo B e outras só produzem as do grupo G, ou seja, ela pode não ser produtora ou ainda produzir a aflatoxina do tipo G. Segundo Schroeder; Ashworth (1966), o ambiente é um importante fator para produção de aflatoxinas, interagindo com o genótipo de uma linhagem, sendo assim, o ambiente pode ter afetado sua produção.

A linhagem NRRL 3251 (C) é naturalmente produtora de aflatoxina B1, porém, essa produção não foi detectada por CCD, uma possível explicação é descrita por Moreau (1979), onde uma linhagem toxigênica pode perder sua habilidade de produzir aflatoxina, após subculturas sucessivas em meios sintéticos, devido à mutação.

Ainda investigando, outros fatores externos podem inibir a produção da aflatoxina, como o meio, temperatura e pH. “O fungo cultivado em meios sintéticos ricos perde sua capacidade de produzir aflatoxinas com maior facilidade que o fungo cultivado em meios mais pobres, uma vez que naquele meio o fungo encontra a substância pronta sem precisar seguir algumas vias metabólicas para a sua síntese”. (TANIWAKI *et al.*,1993). O meio utilizado foi o ágar coco, apesar de ser muito utilizado para a identificação de aflatoxinas, outros autores sugerem o meio Czapek ou Yes para uma melhor produção (TANIWAKI *et al.*,1993).

Não se pode comprovar o resultado da amostra B, pois para o mesmo seria necessário um estudo voltado para as aflatoxinas do tipo G, com seus padrões específicos.

CONCLUSÃO

Aspergillus flavus foi isolado de noz pecan, porém esse não produziu AFB1, mas não foi possível confirmar se ele é não-toxigênico ou produtor de Aflatoxina G, sendo necessário mais estudos.

Espera-se em futuros estudos que esse tipo de biocontrole seja realizado, assim como outras formas do mesmo, buscando a inibição do crescimento do fungo e a diminuição da produção das aflatoxinas.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem aos órgãos CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Araucária e Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelo apoio no desenvolvimento desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

BRASIL ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Limite para presença de micotoxinas**. 22 fev. 2011. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/resultado->

de-
[busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=2663554&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=anvisa-estabelece-limites-para-presenca-de-micotoxinas-em-alimentos&inheritRedirect=true](#). Acesso em: 16 jun. 2020.

CAST-Council for Agricultural Science and Technology. (2003). **Mycotoxins e risks in plant, animal and human systems**. Task Force Report 139. Ames, IO: CAST.

DAVIS, N.D; IYER, S.K; DIENER, U.L. Improved Method of Screening for Aflatoxin with a Coconut Agar Medium. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, [S. l.], v. 53, n. 7, p. 1593-1595, 17 abr. 1987. Disponível em: <https://aem.asm.org/content/aem/53/7/1593.full.pdf> . Acesso em: 10 jun. 2020

GARCIA, M. V.; MORAES, V. M.; BERNADI, A. O.; OLIVEIRA, M. S.; MALLMANN, C. A.; BOSCARDIN, J.; COPETTI, M. V. (2019). **Mycological quality of pecan nuts from Brazil: absence of aflatoxigenic fungi and aflatoxins**. *Ciência Rural*, 49(6).Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782019000600752&tlng=en; Acesso em 16. Jun. 2020.

HAMIDO, F., Rathore, A., Waliyar, F., & Vadez, V. (2014). **Although drought intensity increases aflatoxin contamination, drought tolerance does not lead to less aflatoxin contamination**. *Field Crops Research*, 156, 103–110. Acesso em: 17 jun, 2020.

HEDAYATI, M. T.; PASQUALOTTO, A. C.; WARN P. A.; BOWYER P.; DENNING D. W. **Aspergillus flavus: human pathogen, allergen and mycotoxin producer**. *Microbiology society*, [S. l.], v. 150, p. 1677–1692, 1 jun. 2007. DOI <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/007641-0>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.2007/007641-0> . Acesso em: 12 jun. 2020.

IARC – International Agency for Research on Cancer. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans**. v.56, p.489–452, 1993. Acesso: Jun. 16, 2020. doi: 10.1002/food.19940380335.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção agrícola em lavouras perenes: noz. 2019. Acesso em: Jun. 16 2020.

LÓPEZ-MALO, A., ALZAMORA, S. M., & PALOU, E. (2002). *Aspergillus flavus* dose–response curves to selected natural and synthetic antimicrobials. **International Journal of Food Microbiology**, 73(2-3), 213–218. doi: 10.1016/s0168-1605(01)00639-0 .

MOREAU, C. *Moulds, Toxins & Food*. Chichester: John Wiley, 1979. 477p.

PECAN REPORT. 2020. Disponível em: <https://pecanreport.com/> . Acesso em :15 jun, 2020.

PITT, J.I., HOCKING, A.D., 2009. Fungi and Food Spoilage, vol. 519. Springer.

ONO E. Y. S. Princípios básicos para a análise de micotoxinas/Elisabete Yuri Sataque Ono...[Et al.]. -Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2007, p. 45. Acesso em: 18 jun, 2020.

SCHROEDER, H.W.; ASWORTH, L.J. Aflatoxins: some factors affecting production and location of toxins *Aspergillus flavus - oryzae*. **Journal of Stored Products Research**, New York, v.1, p.267-271, 1966.

STADLER, Franciély et al. EFEITO COMBINADO DE CARVACROL E TIABENDAZOL CONTRA *Colletotrichum gloesporioides*, *Fusarium solani* e *Alternaria alternata*. **Higiene Alimentar**, [S. l.], p. 2774-2778, 1 maio 2019. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vti-24524> . Acesso em: 18 jun. 2020.

TANIWAKI, M. H.; FONSECA H.; PIZZIRANI-KLEINER A. A. Variabilidade de produção de aflatoxinas por linhagens de *Aspergillus flavus* em diferentes tempos de manutenção. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 50, n. 1,p. 140-150, 4 maio 1993. DOI <https://doi.org/10.1590/S0103-90161993000100019>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90161993000100019&lng=pt&tlng=pt . Acesso em: 16 jun. 2020.

TERABE, N. I. et al. Microrganismos associados a frutos de diferentes cultivares de noz Pecan. **Ciência e Agrotecnologia**, [s.l.], v.32, n.2, p.659–662, 2008. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-70542008000200049&script=sci_arttext&tlng=ES . Acesso: 13 jun. 2020. doi: 10.1590/S1413-70542008000200049.

YU J., Whitelaw C. A., Nierman W. C., Bhatnagar D., Cleveland T. E.. 2004; ***Aspergillus flavus* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in aflatoxin contamination of crops**. **FEMS Microbiol Lett**237:333–340. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article/237/2/333/530271>. Acesso em: 13 jun.