

Avaliação da produção de ocratoxina A por *Aspergillus ochraceus* e preparo de microrganismo antagonista

Evaluation of the production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* and preparation of antagonistic microorganism

RESUMO

Letícia Bewiahn Quiaroti
bewiahnleticia@hotmail.com
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

O setor agroindustrial enfrenta problemáticas relacionadas a contaminação de alimentos providas de fungos filamentosos devido a síntese de metabólitos secundários denominados de micotoxinas. Essas toxinas têm sido detectadas em diversos produtos agrícolas. Uma das principais micotoxinas contaminantes de grãos e cereais é a ocratoxina A (OTA). A OTA destaca-se por seus efeitos hepatotóxicos, nefrotóxicos, teratogênicos e carcinogênicos, sendo produzida principalmente por espécies de *Aspergillus* spp. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento e produção de ocratoxina A (OTA) pelo fungo *Aspergillus ochraceus* no meio de cultura Yeast Extract Sucrose Agar (YES). O fungo foi inoculado neste meio e incubado durante 7 dias em BDO à 25 °C e a produção de ocratoxina foi confirmada por Cromatografia de Camada Delgada (CCD). Assim, a partir destas análises, o meio de cultura YES apresenta-se favorável para produção de OTA.

PALAVRAS-CHAVE: Micotoxinas. Fungos. *Aspergillus*.

ABSTRACT

The agro-industrial sector faces problems related to contamination of food from filamentous fungi due to the synthesis of secondary metabolites called mycotoxins. These toxins have been detected in several agricultural products. One of the main mycotoxins contaminating grains and cereals is ochratoxin A (OTA). OTA stands out for its hepatotoxic, nephrotoxic, teratogenic and carcinogenic effects, being produced mainly by species of *Aspergillus* spp. The present study aimed to evaluate the growth and production of ochratoxin A (OTA) by the fungus *Aspergillus ochraceus* in the culture medium Yeast Extract Sucrose Agar (YES). The fungus was inoculated in this medium and incubated for 7 days in BDO at 25 °C and the production of ochratoxin was confirmed by Thin Layer Chromatography (CCD). Thus, based on these analyzes, the YES culture medium is favorable for the production of OTA.

KEYWORDS: Mycotoxins. Fungi. *Aspergillus*.

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

A contaminação em alimentos e sua toxicidade, provenientes de fungos produtores de micotoxinas, tem grande impacto na agroindústria e consumo de alimentos. De acordo com Scussel et al. (1983, p. 75) algumas das principais micotoxinas contaminantes de grãos e cereais são aflatoxinas, ocratoxinas, deoxinivalenol, zearalenona, fumonisinas e tricotecenos.

Os fungos do gênero *Aspergillus* spp se destacam pela produção de micotoxinas, responsáveis por causar doenças em humanos e animais (SAMSON, 2007). O gênero apresenta colônias de conídios filamentosos esféricos, comum em regiões tropicais (KLINCH, 2002; PITT. HOCKING, 1997). Grãos e cereais são alimentos susceptíveis à contaminação pelo *Aspergillus ochraceus*, podendo produzir ocratoxina (OTA) em alimentos como café, cevada, aveia, centeio, trigo e também contaminar o vinho/sucos de uva e carnes (RIBA, A. et al. 2008).

OTA representa ser a micotoxina mais perigosa dentre o grupo de ocratoxinas (ROSA et al. 2009). Welke et al. (2009, p.2568) afirmam que esta toxina foi isolada pela primeira vez de uma cultura de fungos *A. ochraceus* por Van der Merwe, 1965. Caracterizada pelos seus efeitos hepatotóxico, nefrotóxico, teratogênico e carcinogênico, tem tido crescente enfoque por ser considerada fator de risco à saúde humana. O mecanismo tóxico se deve a inibição da síntese de proteínas; síntese de ATP e peroxidação lipídica (XIAO et al. 1996). OTA apresenta uma meia vida de 35 dias no corpo humano, ficando por um longo período no organismo (ALANATI; PETZINGER, 2006). A ocorrência desse alto índice de meia vida da OTA no corpo ocorre devido a grande afinidade que a toxina tem com proteínas do plasma sanguíneo, como a albumina (BOZZA, 2010), tendo em sua estrutura uma di-hidroisocumarina ligada através de seu grupo 7-carboxil, por uma ligação amida, à L-fenilalamina (XIAO; FROHLICH, 1995) e possuindo um átomo de cloro como grupo substituinte em sua cadeia química, contribuindo para a característica tóxica (SCUSSEL, 1988).

Mundialmente, os limites máximos toleráveis de OTA em alimentos variam de 2 a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (ABRUNHOSA, 2001). No Brasil, em fevereiro de 2018 foi publicado no Diário Oficial da União (DOU) na Portaria nº 354 a Resolução - RDC N° 7 da Anvisa os Limites Máximos Toleráveis de Micotoxinas (LMT) em Alimentos e Matéria Prima. Para a OTA a ANVISA salienta esses limites em alimentos como cereais, café, feijão e frutas secas com 10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$; vinho, suco de uva e alimentos à base de cereais 2,00 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e também especiarias culinárias como pimenta e cúrcuma 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (ANVISA, 2012).

Devido aos danos provocados pelo *A. ochraceus* e os riscos de contaminação por OTA em produtos alimentícios, o uso de fungicidas tem sido generalizado na agricultura. Os fungicidas além de causar danos à saúde humana também afeta o meio ambiente, podendo gerar cepas fúngicas resistentes. Neste sentido, estas aplicações de fungicidas sintéticos vem sendo desencorajadas, pois afetam a qualidade e segurança do produto ingerido (SUGAR; SPOTTS, 1999).

Diferentes estratégias estão sendo desenvolvidas para detoxificar micotoxinas em grãos e cereais, como métodos físicos, químicos e biológicos (AWAD; GHAREEB; BOHM; ZENTEK, 2010). Todavia, as técnicas físicas e químicas apresentam diversas restrições, como a perda de qualidade e valor nutricional do produto, também a necessidade de equipamentos de alto custo no mercado

(BASAPPA; SHANTA, 1996). Portanto, priorizar métodos de controle biológico e de antagonismo são vantajosos para inativar as micotoxinas.

Dessa forma, este estudo na fase inicial teve como objetivo avaliar um meio de cultura para produção de ocratoxina A (OTA) pelo fungo *Aspergillus ochraceus*, para em seguida utilizar esta cepa em testes de biodegradação.

MATERIAL E MÉTODOS

Fungo micotoxigênico: A cepa do fungo *Aspergillus ochraceus* A152 foi mantido em meio de cultura BDA (Ágar Batata Dextrose) a 7 °C. Os esporos do fungo filamentosos *A. ochraceus* foram suspensos em alíquotas de 10 mL de peptona bacteriológica (0,1%) estéril e transferida para placas de Petri contendo ágar extrato de malte composto de extrato de malte 45 g e ágar 20 g dissolvidos em 1 L de água destilada estéril. As placas foram incubadas durante 7 dias em estufa BOD à 25 °C. Em seguida, colônias isoladas foram inoculadas em ágar YES (Yeast Extract Sucrose) composto de extrato de levedura 20 g, sacarose 150 g e ágar 20 g, dissolvidos em 1 L de água destilada. Incubados durante 7 dias em BOD à 25 °C.

Microrganismo Controle: A cepa da bactéria B-9 foi isolada inicialmente devido a capacidade de degradar peptídeos (HASHIMOTO, 2009). Preservada no meio de cultura Agar Sakurai: peptona de caseína 0,2%, extrato de levedura 0,1%, glicose 0,5%, NaCl 0,05% e ágar bacteriológico 1,5%, refrigerada a 6 °C. Para a reativação da bactéria suspendeu-a em solução líquida de Sakurai contendo em g/L: (peptona de caseína 0,2%, extrato de levedura 0,1%, glicose 0,5% e NaCl 0,05%). Incubada em BDO a 27 °C, durante 72h com aeração periódica. Em sequência a B-9 foi repicada em meio Agar Sakurai sólido e mantida refrigerada a 6 °C até aplicações de testes (JIN et al. 2018).

Cromatografia em camada delgada: Para confirmar a produção da OTA, utilizou-se do método de análise Cromatografia em Camada Delgada (CCD). A extração e determinação de ocratoxina foram realizadas de acordo com IAL (2008, p. 1020 e ONO et al., 2007).

Utilizando a metodologia CCD segundo Ono et al (2007), adaptado, em um tubo Falcon misturou-se 2,5 mL de KCl 4%, 22,5 mL de Metanol e 40 g de amostra (cultura de *Aspergillus ochraceus* em BDA), repetindo esse processo em mais um tubo. Agitou-se a amostra presente em cada tubo utilizando um agitador Vortex por cinco minutos, homogeneizando-as. Filtrou-se a amostra usando um funil com papel filtro juntamente com 25 mL de Sulfato de Amônia 30% e 3,3 g de Terra Diatomácea. Em seguida se transferiu o filtrado para um funil de separação, adicionando 5,0 mL de clorofórmio. Agitou-se o funil de separação suavemente por três minutos para extrair a toxina. Esperou a separação das fases (aquosa e clorofórmica) e assim coletou-se a fase inferior (clorofórmica) em um frasco. Repetiu-se a operação com a adição de 5,0 mL de clorofórmio ao funil de separação. Novamente se agitou e esperou a separação de fases, coletou-se a fase inferior do funil no mesmo frasco da primeira partição. Foi transferido o volume total da fração clorofórmica para um tubo e evaporou-os em banho-maria a 50 °C até a evaporação completa do clorofórmio.

Para a análise da OTA, a placa cromatográfica foi ativada em estufa a 100 °C por 30 minutos. Resuspendeu-se o resíduo da amostra com 100 µL de clorofórmio em banho ultrassônico por 30 segundos. Aplicou dois pontos de amostra (5,0 µL) a 2,0 cm da base, e dois pontos de padrão de ocratoxina A na cromatoplaça de sílica gel 60, sendo uma aplicação de amostra sobreposta por 5,0 µL de padrão (cromatografia). Foi colocada a cromatoplaça em uma cuba cromatográfica contendo como fase móvel tolueno:acetato de etila:clorofórmio:ácido fórmico (18:13:13:5) mL. Removendo então a placa após o desenvolvimento de 10 cm de corrida, deixando-a secar sob capela de exaustão. Visualizou-se a placa sob luz UV a 366 nm. Para a quantificação, comparou a intensidade de fluorescência da banda referente à micotoxina na amostra e no padrão.

Manutenção do microrganismo antagonista: A *Sphignosinicella microcystinivorans* (B9) foi reativada em caldo Sakurai em Erlenmeyer incubadas a 27 °C com agitação periódica durante 72h. Em seguida transferiu-se o inóculo para superfície de ágar Sakurai com a alça de platina pela técnica de estria por esgotamento afim de se isolar colônias, sendo as placas incubadas por 72h a 30 °C para seu crescimento (KURIAMA et al. 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 1 apresenta a placa de cromatografia utilizada para confirmação da produção de ocratoxina pelo fungo testado.

A partir desta metodologia, aplicada na detecção da ocratoxina A, concluiu-se que *A. ochraceus* 151 foi positivo. Esta análise consiste em comparar a fluorescência do padrão da OTA e com o extrato da cultura fúngica testada, estando sinalizadas na mesma linha horizontal confirmam presença da OTA (COLLINS, 2010). Embora haja uma pequena diferença no Fator de retenção (RF) da amostra com o padrão, essa alteração se deve a interferentes no extrato da amostra, sendo o padrão puro.

Figura 1- Placa de cromatografia sob luz UV



Fonte: Autoria própria, 2019.

O meio de cultura YES estimulou positivamente a produção de OTA pelo fungo *A. ochraceus*, sendo classificado como um bom substrato no desenvolvimento de OTA (SOUZA, 2014). A temperatura de crescimento de 25 °C foi adequada (PALACIOS-CABRERA, 2005). Desse modo, o cultivo no meio YES apresenta ser

favorável na biossíntese de OTA, sendo rico em sacarose, e conseqüentemente tendo energia de metabolização rápida, fator que explica o crescimento e produção da toxina (BRAGULAT; ABARCA; CABANES, 2001).

Biodegradação com Microrganismo: A metodologia aplicada buscou isolar a bactéria B-9 devido ao seu potencial biodegradante e assim seguir avaliando seu efeito antagonista sob a OTA.

O processo de inoculação foi efetuado sem contaminantes e a análise biodegradante da bactéria sob a micotoxina não chegou a ser executada devido a paralização causada pelo vírus COVID-19. Com o retorno das aulas presenciais será então retomada a pesquisa laboratorial.

CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa com o fungo *Aspergillus ochraceus* demonstram uma produção de OTA no meio de cultura YES. A bactéria antagonista *Sphingosinicella microcystinivorans* (B-9) vem sendo mantida para testes posteriores.

Dessa maneira, trouxe maior conhecimento sobre o meio de cultura favorável à produção de micotoxinas. Preparando os microrganismos para a próxima etapa de teste de biocontrole e biodegradação.

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

ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R. R. M.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N.; VENÂNCIO, A. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. Letters in Applied Microbiology, v. 32, p. 240-242, 2001.

AL-ANATI, L.; PETZINGER, E. Immunotoxic activity of ochratoxin A. Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics, v. 29, p.79-90, 2006.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 354 a Resolução - RDC N° 7, 18 de fevereiro de 2011. Disponível em: <
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html> Acesso em: 18 agosto. 2020.

AWAD WA, GHAREEB K, BOHM J, ZENTEK J. Decontamination and detoxification strategies for the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2010 Apr;27(4):510-20.

BASAPPA S.C., SHANTA T. Methods for detoxification of aflatoxins in foods and feeds. A critical appraisal. J. Food Technol. India, 33 (1996), pp. 95-107

BOZZA, A. Detecção e quantificação de ocratoxina a produzida por espécies de Aspergillus isoladas de grãos de café, (Dissertação), Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba - PR, Brasil, 2010.

BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; CABANES, F. J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v. 71, n. 2-3, p. 139-144, Dec. 2001.

COLLINS, C. H. Scientia Chromatographica - Instituto Internacional de Cromatografia. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Vol.2, Nº1, 5-12, 2010.

IAL- Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, p. 1020

JIN H, HIRAOKA Y, OKUMA Y, HASHIMOTO EH, KURITA M, ANAS ARJ, UEMURA H, TSUJI K, HARADA KI. Microbial Degradation of Amino Acid-Containing Compounds Using the Microcystin-Degrading Bacterial Strain B-9. Mar Drugs. 2018

KLICH, M. A. Identification of Common Aspergillus species. Amsterdam: Centraalbureau voor Schimmelauteurs, 2002. 116p.

KURIAMA, F. et al,. Potencial de biodegradação de microcistinas por microrganismos. Universidade Estadual de Londrina, Eng Sanit Ambient, v.17 n.2, p. 181-186, abr/jun 2012.

ONO, E. Y. S.; BERND, L. P.; FUJII, S.; RIBEIRO, R. M. R.; HASHIMOTO, E. H. e HIROOKA, E.Y. Princípios Básicos para Análise de Micotoxinas. Univerdidade Estadual de Londrina, 2007.

PALACIOS-CABRERA, H. et al. Growth of Aspergillus ochraceus, A. carbonarius and A. niger on culture media at different water activities and temperatures. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 24- 28, Jan./Mar. 2005.

PITT, J.; HOCKING, A. D. Fungi and food spoilage. 2nd ed. London: Blackie Academic and professional, 1997. 540 p.

RIBA, A. et al. Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.122, n.1-2, p.85-92, 2008. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.057>>. Acesso em: 04 set. 2020.

ROSA, C.A.R.; KELLER, K.M.; KELLER, L.A.M.; PEREYRA, M.L.G. et al. Mycological survey and ochratoxin A natural contamination of swine feedstuffs in Rio de Janeiro state, Brazil. *Toxicon*, v.53, p.283-288, 2009.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. *Aspergillus* systematics in the genomics era. Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre, 2007. p. 206.

SCUSSEL, V. M. Micotoxinas em alimentos. Florianópolis: Editora Insular. 1998. 144p.

SCUSSEL, V. M.; RODRIGUEZ-AMAIA, D. B.; SILVA, W. J. da. Incidência de aflatoxinas em milho (*Zea mays* L.) e em seus produtos derivados, comercializados na região de Campinas, estado de São Paulo, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 6, n. 1, p. 75-85, 1983.

SOUZA, S. C. de. CRESCIMENTO DE *Aspergillus carbonarius* E *Aspergillus ochraceus* E PRODUÇÃO DE OCHRATOXINA A EM MEIO DE CULTURA SINTÉTICO E A BASE DE PRODUTOS AGRÍCOLAS. Universidade Federal de Lavras, LAVRAS –MG, 2014.

SUGAR, D., SPOTTS, R. A. Controlo f post-harvest decay in pear by four laboratory-grown yeasts and two registered biocontrol products. *Plant disease*, 1999.

WELKE, J.E.; HOELTZ, M.; NOLL, I.B. Aspectos relacionados à presença de fungos toxigênicos em uvas e ocratoxina A em vinhos. *Ciência Rural*, 2009.

XIAO H, MARQUARDT RR, FROHLICH AA, LING YZ. 1995. Synthesis and structural elucidation of analogs of ochratoxin A. *J Agric Food Chem*43:524–530

XIAO, H.; MADHYASTHA, S.; MARQUARDT, R. R.; LI, S.; VODELA, J. K.; FROHLICH, A. A.; KEMPPAINEN, B. W. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone from and several of its analogs: structure-activity relationships. *Toxicology and Applied Pharmacology*, San Diego, v. 137, p. 182-192, 1996.

