

**OCORRÊNCIA DE ASPERGILLUS SECTION NIGRI PRODUTORES DE  
FUMONISINA B<sub>2</sub> E OCRATOXINA A EM ALIMENTOS**

DENISE BEDON<sup>1</sup>; BEATRIZ T. IAMANAKA<sup>2</sup>; LARISSA FERRANTI<sup>3</sup>; ALINE S.  
LOPES<sup>3</sup>, MARTA H. TANIWAKI<sup>3</sup>

**Nº 12214**

**RESUMO**

As espécies de *Aspergillus section Nigri* (grupo do *Aspergillus niger*) estão largamente distribuídas na natureza e são fungos deterioradores comuns em alimentos. Têm sido isoladas de frutas, vegetais, grãos e cereais. Algumas espécies deste grupo são capazes de produzir micotoxinas, como a ocratoxina A e mais recentemente a fumonina B<sub>2</sub>. A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina nefrotóxica e as fumonisinas estão envolvidas com câncer esofágico em humanos, além de estar relacionada com doenças em animais, como a leucoencefalomalácea em cavalos e edema pulmonar em suínos. Os objetivos deste trabalho foram analisar a ocorrência das espécies do grupo do *Aspergillus niger* em alimentos como café, cacau, frutas secas e castanha-do-Brasil e avaliar o potencial para a produção de ocratoxina A e fumonisina B<sub>2</sub> pelos isolados. Um total de 831 amostras, dentre elas, café (408), frutas secas (117), cacau (222) e castanha-do-Brasil (84), foram previamente analisadas quanto à presença de *Aspergillus section Nigri* e 1665 representantes deste grupo foram isolados. Todas as cepas foram testadas para a produção de ocratoxina A, utilizando a técnica do ágar plug e cromatografia de camada delgada e 18% foram capazes de produzir esta toxina. Para análise do potencial de produção de fumonisina B<sub>2</sub>, alguns isolados de cada tipo de amostra foram selecionados. A técnica utilizada foi cromatografia líquida de alta eficiência com derivatização pré-coluna com o reagente o-phthaldialdehydo (OPA). Duzentos e sessenta e dois isolados foram testados e 51,7% apresentaram a capacidade de produzir fumonisina B<sub>2</sub>, com níveis variando de não detectado a 37,2µg/g, e 6,1% foram capazes de produzir esta micotoxina e ocratoxina A.

<sup>1</sup> Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, PUC, Campinas-SP, denisebedon@hotmail.com.

<sup>2</sup> Orientadora: Pesquisadora, CCQA-MICROBIOLOGIA/ITAL, Campinas-SP.

<sup>3</sup> Colaborador: Pós-graduando, CCQA-MICROBIOLOGIA/ITAL, Campinas-SP.

<sup>4</sup> Colaborador: Pesquisador, CCQA-MICROBIOLOGIA/ITAL, Campinas-SP.

## ABSTRACT

The *Aspergillus* section *Nigri* species (group *A. niger*) are widely distributed in nature and the fungi commonly responsible for food spoilage. They have been isolated from fruits, vegetables, grains and cereals. Some species from these group are able to produce mycotoxins such as ochratoxin A and more recently fumonisins B<sub>2</sub>. Ochratoxin A (OTA) is a nephrotoxic mycotoxin and the fumonisins are involved in esophagic cancer in humans, as well as being related to animal diseases such as leucoencephalomalacia in horses and lung edema in pigs. The objectives of this project were to analyze the occurrence of the *Aspergillus* section *Nigri* in food such coffee, cocoa, dried fruits and brazil nuts and to evaluate the potencial for producing ochratoxin A and fumonisin B<sub>2</sub> by the isolates. A total of 831 samples which included coffee (408), dried fruits (117), cocoa (222) and brazil nuts (84) were previously analyzed as the presence of *Aspergillus* section *Nigri* and 1665 representatives of this group were isolated. All the strains were tested for ochratoxin A production using the Agar pluc technique and thin layer chromatography and 18% were able to produce this toxin. To analyze the fumonisin B<sub>2</sub> production potencial some isolates from each sample type were selected. The techniques used were high performance liquid chromatography with o-phthaldialdehydo (OPA) pré-column derivatization. Two hundred and eight isolates were tested and 51.7% were fumonisin B<sub>2</sub> positive with levels varying from not detected to 37.2 µg/g, and 6.1% were able to produce this mycotoxin and ochratoxin A.

## INTRODUÇÃO

*Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* conhecidos como black aspergilli são encontrados frequentemente em alimentos como frutas frescas, vegetais, grãos, cereais e outros. *A. niger* tem sido utilizado para a produção de várias enzimas e ácidos orgânicos, em escala industrial.

É reconhecido que uma pequena porcentagem (3-10%) dos isolados de *A. niger* e 70-100% dos isolados *A. carbonarius* são capazes de produzir ocratoxina A e pesquisas recentes têm mostrado que *Aspergillus* section *Nigri* são a fonte de ocratoxina A (OTA) em produtos como uvas (Da Rocha Rosa et al., 2002; Battilani et al., 2003), frutas secas (Iamanaka et al., 2005; Heenan et al., 1998; Abarca et al., 2003) e no café (Joosten et al., 2001; Urbano et al., 2001; Taniwaki et al., 2003).

Em 2007 Frisvad et al. relataram pela primeira vez a produção de fumonisina B<sub>2</sub> por *Aspergillus niger*. Até então a produção de fumonisina havia sido relatada

apenas em *Fusarium verticillioides* que é comum em milho, e em algumas espécies de *Fusarium*.

A produção de micotoxinas por estas espécies é preocupante, pois o grupo dos black aspergilli em alimentos é comum e não existem pesquisas no país investigando a produção de ocratoxina A e/ou fumonisina B2 por estas espécies nos alimentos consumidos pela população.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Amostras***

Um total de 84 amostras de castanha-do-Brasil (da região do Amazonas e Pará) foi analisado quanto à presença de *Aspergillus section Nigri*. Cerca de 500g de cada amostra foi coletada para a análise. As demais amostras de café (São Paulo), cacau (Bahia) e frutas secas (Chile, Argentina, Estados Unidos, Irã e Turquia), totalizando 747 amostras, já haviam sido analisadas quanto à infecção fúngica. Neste caso, foi realizado apenas o teste de produção de ocratoxina A e fumonisina B2 pelos *Aspergillus section Nigri* previamente isolados.

### ***Plaqueamento das amostras***

Cinquenta pedaços de diferentes castanhas-do-Brasil foram desinfetadas com 0,4% de solução de hipoclorito de sódio por 1 minuto de acordo com a metodologia de Pitt & Hocking (2009). Após a desinfecção, os pedaços foram colocados em placas de Petri, contendo o meio de cultura ágar Dicloran 18% Glicerol (DG18). As placas foram incubadas a 25°C por 5 dias. Os resultados foram expressos em porcentagem de infecção conforme a metodologia de Pitt & Hocking (2009).

### ***Isolamento e identificação dos fungos***

As cepas de *Aspergillus section Nigri* foram isoladas no meio Czapek extrato de levedura (CYA) e incubadas a temperatura de 25 °C por 7 dias. Após este período, os fungos foram observados ao microscópio para diferenciação entre *A. carbonarius* de outros *A. section Nigri* de acordo com a chave de Klich & Pitt (1988) e Samson et al. (2004).

### ***Avaliação do potencial de produção de ocratoxina A pelos Aspergillus section Nigri***

Os isolados foram inoculados em meio ágar Extrato de Levedura Sacarose (YESA) e incubados a 25 °C por 7 dias, para avaliação do potencial de produção de ocratoxina

A. Pequenos pedaços do micélio fúngico foram cortados da parte central, utilizando-se a técnica do ágar plug (Filtenborg et al., 1983) com auxílio de um bisturi e 3 gotas da solução clorofórmio:metanol (1:1) foram adicionadas para a extração da toxina. Os plugs foram aplicados nas placas de cromatografia de camada delgada (CCD) silicagel-G 60 de 500  $\mu\text{m}$  de espessura. Na placa foi adicionado paralelamente 5  $\mu\text{L}$  do padrão de ocratoxina A (OTA) (Sigma-Aldrich), para comparar as bandas. As placas foram transferidas para cuba com fase móvel, constituída dos seguintes solventes: tolueno, acetato de etila, ácido fórmico 90% e clorofórmio (7:5:2:5 v/v/v/v). Após o desenvolvimento das placas e secagem dos solventes, as mesmas foram levadas até a câmara UV e observadas sob dois diferentes comprimentos de ondas, 356 nm e 254 nm.

#### ***Avaliação do potencial de produção de fumonisina B<sub>2</sub> por Aspergillus section Nigri***

Os isolados de *Aspergillus section Nigri* foram inoculados em ágar Czapek Extrato de Levedura 20% de Sacarose (CY20S) e as placas incubadas a 25 °C por 7 dias, conforme a metodologia de Frisvad et al. (2007).

Para a extração da fumonisina, cinco pequenos pedaços do micélio fúngico, da parte central da placa foram transferidos para um frasco previamente pesado. Após a adição dos plugs, os frascos foram pesados novamente, obtendo assim os pesos do micélio para posterior cálculo da concentração da fumonisina B<sub>2</sub>. A extração foi realizada com 1 ml de metanol e agitado em vortex por 3 minutos. Em seguida a solução foi filtrada em Millex de 0,2 $\mu\text{m}$ . Foram transferidos 55  $\mu\text{L}$  do extrato para um *vial* adicionando mais 55  $\mu\text{L}$  do reagente o-phthaldialdehydo (OPA) para reação de derivatização da fumonisina, conforme a metodologia de Visconti et al. (2001), homogeneizando a solução por 30 segundos em vortex. Em seguida foi realizada a injeção em cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Para a detecção e quantificação da fumonisina B<sub>2</sub> foi utilizado o cromatógrafo da marca Shimadzu LC10VP (Shimadzu, Japão) com detector de fluorescência a 335 nm de excitação e 440nm de emissão. A fase móvel foi composta de acetonitrila:água:ácido acético (51:47:02 v/v/v). O fluxo foi programado para 1,4ml/min e a temperatura do forno de 40°C. O volume de injeção utilizado foi de 20 $\mu\text{L}$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A tabela 1 apresenta o total de amostras analisadas, o número total de isolados de *Aspergillus section Nigri* e a porcentagem de fungos produtores de ocratoxina A.

Tabela 1 – Número de isolados de *Aspergillus section Nigri* e porcentagem de cepas produtoras de ocratoxina A

Amostra		Nº amostras analisadas	Nº total de isolados de <i>Aspergillus section Nigri</i>	% Produtores de ocratoxina A
Café cru		408	552	9,4
Frutas secas	Uva passa escura	24	264	15,8
	Uva passa clara	19	5	0
	Ameixa seca	21	84	28
	Figo seco	19	43	11
	Tâmaras	20	95	65
	Damasco	14	0	0
Amêndoa de cacau		222	283	36,0
Castanha-do-Brasil		84	339	3,2
Total		831	1665	18

Avaliando o total de *Aspergillus section Nigri* isolados, é possível constatar a alta incidência destas espécies nas amostras analisadas. Nas amostras de frutas secas, principalmente uvas passas escuras, este grupo foi aquele com maior número de representantes, indicando que podem ser os responsáveis pela contaminação desta amostra pela ocratoxina A.

De acordo com Pitt & Hocking (2009), estas espécies são comuns em países de clima quente e podem crescer tanto em alimentos com alta atividade de água ( $a_w$ ) como em  $a_w$  intermediária. Os esporos pretos conferem proteção à luz solar e aos raios ultravioletas, fornecendo uma vantagem competitiva em alimentos secos ao sol. *A. niger* também já foi isolado de peixes secos, temperos e frutas frescas como maçãs, mangas, uvas, citros, peras, pêssegos, alguns vegetais como cebola e alho, amendoim, pecans, avelãs, milho, arroz, feijão, de produtos cárneos, queijos, azeitonas e morangos entre outros (Snowdon, 1990, 1991; Pitt & Hocking, 2009).

Dentre o total de *Aspergillus section Nigri* isolados (1665 isolados), 18% foram capazes de produzir ocratoxina A em meio de cultura.

Através da morfologia foi possível identificar apenas o *Aspergillus carbonarius* dentro do grupo dos *Aspergillus section Nigri*. No total de amostras analisadas, foram isoladas 147 cepas de *A. carbonarius* e 91,1% foram capazes de produzir ocratoxina A.

A tabela 2 apresenta espécies pertencentes ao grupo dos *Aspergillus section Nigri* que foram isolados de diferentes amostras, previamente identificados e testados quanto à produção de fumonisina B<sub>2</sub>.

Tabela 2 – Produção de fumonisina B<sub>2</sub> por *Aspergillus section Nigri*

Amostra	Nº total isolados testados	Identificação (nº isolados)	% Produtores de fumonisina B <sub>2</sub>
Café	19	<i>A. niger</i> (19)	89,4
Cacau	16	<i>A. niger</i> (7)	85,7
		<i>A. tubingensis</i> (4)	0
		<i>A. carbonarius</i> (5)	0
Frutas	20	<i>A. niger</i> (12)	83,3
		<i>A. tubingensis</i> (5)	0
		<i>A. acidus</i> (2)	0
		<i>A. ibericus</i> (1)	0
Castanha-do-Brasil	207	<i>Aspergillus section Nigri</i> (207)	35,7

Dentre as cepas testadas para a produção de fumonisina B<sub>2</sub>, a única espécie capaz de produzir esta micotoxina foi o *Aspergillus niger*. Os resultados estão de acordo com o trabalho de Frisvad *et al.* (2007), quem primeiro relatou este fato. Cerca de 86% dos isolados de *Aspergillus niger* testados apresentaram a capacidade de produzir a fumonisina B<sub>2</sub> em meio de cultura.

As cepas de *Aspergillus section Nigri* isoladas da castanha-do-Brasil, ainda não identificados até o nível de espécie, foram testadas quanto à produção de fumonisina B<sub>2</sub> em meio Czapek Extrato de Levedura 20% Sacarose. Dos 207 isolados testados, 35,7% foram positivos. Esta baixa porcentagem pode ser explicada pela existência de espécies do grupo *Aspergillus section Nigri* que foram testados e que não são *Aspergillus niger*. Este valor pode aumentar quando a análise for realizada apenas para os isolados identificados como *Aspergillus niger*.

Do total de isolados testados para todas as amostras, 6,1% apresentaram a capacidade de produzir ocratoxina A e fumonisina B<sub>2</sub>.

A tabela 3 apresenta os níveis de fumonisina B<sub>2</sub>, em ng/g, produzidos pelos 207 isolados de *Aspergillus section Nigri* provenientes em castanha-do-Brasil, em meio de cultura ágar Czapeck Extrato de Levedura 20% Sacarose.

Tabela 3: Produção de fumonisina, em µg/g, por isolados de *Aspergillus section Nigri* de castanha-do-Brasil em meio de cultura.

Fumonisina B <sub>2</sub> (µg/g)	Número de amostras	%
ND*	136	65,2
< LD	6	2,9
0,01 – 5,0	55	27,1
5,1 – 10,0	1	0,5
10,1 – 20,0	5	2,4
20,1 – 30,0	3	1,5
30,1 – 40,0	1	0,5

\*ND = Não detectado (Limite de detecção do método = 0,01µg/g)

De acordo com os resultados verificou-se que mais da metade (65,2%) dos isolados não foram capazes de produzir fumonisina B<sub>2</sub> em meio de cultura. Dentre àqueles testados, 31,9% foram capazes de produzir esta micotoxina, variando entre 0,01 a 37,2 µg/g.

Devido à produção de fumonisina B<sub>2</sub> e ocratoxina A por alguns isolados de *Aspergillus section Nigri*, verifica-se a necessidade de se avaliar a contaminação por estas micotoxinas nos alimentos. Trabalhos complementares estão sendo realizados com este objetivo e serão apresentados em outras publicações.

## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos até o momento, foi possível verificar a alta incidência de *Aspergillus section Nigri* produtores de ocratoxina A e fumonisina B<sub>2</sub> em diversos alimentos. A ocorrência destas espécies pode resultar na contaminação dos alimentos por micotoxinas, caso as condições de manejo e processamento não sejam adequadas, representando um sério problema de saúde pública.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.



## REFERÊNCIAS

- ABARCA, M.L.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLA, G. & CABANES, F.J. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. *Journal of Food Protection*, 66:504-506, 2003
- BATTILANI, P.; PIETRI, A.; BERTUZZI, T.; LANGUASCO, L.; GIORNI, P. & KOZAKIEWICZ, Z. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. *Journal of Food Protection*, 66: 633-636, 2003.
- DA ROCHA ROSA, C.A.; PALACIOS, V.; COMBINAS, M.; FRAGA, M.E.; OLIVEIRA, R.; MAGNOLI, C.E. & DALCERO, A.M. Potential ochratoxin A from wines grapes in Argentina and Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 19: 408-414, . 2002.
- FILTENBORG, O; FRISVALD, J.C.; & SVENDENSEN, J.A. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 581-585, 1983
- FRISVAD, J.C.; SMEDSGAARD, J.; SAMSON, R.A; LARSEN, T.O. & THRANE, U. Fumonisin B<sub>2</sub> production by *Aspergillus niger*. *Journal Agricultural of Food Chemistry*, 55: 9727-9732, 2007.
- HEENAN, C.N.; SHAW, K.J. & PITT, J.I. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *Journal of Food Mycology* 1: 67-72., 1998.
- IAMANAKA, B.T.; TANIWAKI, M.H.; MENEZES, H.C.; VICENTE, E. & FUNGARO, M.H.P. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. *Food Additives and Contaminants*., 22: 1258-1263, . 2005.
- JOOSTEN, H. M. L. J.; GOETZ, J.; PITTET, A.; SCHELLENBERG, M.; & BUCHELI, P. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries, *International Journal of Food Microbiology*, 65:39-44, 2001.
- KLICH, M.A. & PITT, J.I. A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* Species and their teleomorphs. North Ryde, *Australia: Division of Food Science and Technology*, 1988
- PITT, J.I. & HOCKING, A.D. Fungi and Food Spoilage, 3<sup>rd</sup> ed. New York. *Springer*. 2009.
- SAMSON, R.A.; HOUBRAKEN, J.A.M.P.; KUIJPERS, A.F.A. FRANK, J.M.; & FRISVAD, J.C. New ochratoxin A or sclerotium producing species of *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies on Mycology*, 50: 45-61, 2004.





SNOWDON, A.L. A Colour Atlas of Post-harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. 1. *General Introduction and Fruits*. Wolfe Scientific, London, 1990

SNOWDON, A.L. A Colour Atlas of Post-harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. 2. *Vegetables*. Wolfe Scientific, London, 1991.

TANIWAKI, M.H.; PITT, J.I.; TEIXEIRA, A.A. & IAMANAKA, B.T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology*, 82: 173-179, 2003.

URBANO, G.R.; TANIWAKI, M.H.; LEITÃO, M.F.F. & VICENTINI, M.C. Occurrence of ochratoxin A producing fungi in raw Brazilian Coffee. *Journal of Food Protection*, 64: 1226-1230, 2001.

VISCONTI A.; SOLFRIZZO M. & DE GIROLAMO A. Determination of fumonisins B1 and B2 in corn and corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity column cleanup: Collaborative study. *Journal Association of Official Analytical Chemists International*. 84: 1828-1838, 2001.