



OCORRÊNCIA DE *ASPERGILLUS* DA SEÇÃO *NIGRI* E OCRATOXINA A EM UVAS DESTINADAS À PRODUÇÃO DE SUCOS

Cristina Akemi Yasumura¹; Larissa de Souza Ferranti²; Marta Hiromi Taniwaki³, Beatriz Thie Iamanaka⁴

RE 16211

RESUMO - *Aspergillus niger* é um fungo pertencente à seção *Nigri* de grande importância biotecnológica e que já foi isolada de vários alimentos. O fato de estas espécies estarem amplamente difundidas na natureza demanda que estudos sejam conduzidos para obter conhecimento sobre sua incidência em produtos destinados à alimentação. Entretanto esta espécie já foi descrita pelo seu potencial para produzir micotoxinas prejudiciais à saúde humana e animal, a ocratoxina A. No Brasil, o conhecimento sobre incidência de *Aspergillus niger* produtores e não produtores de ocratoxina A em uvas ainda é restrito. O objetivo deste projeto foi isolar e identificar *Aspergillus* da seção *Nigri* de uva produzidas no Brasil, bem como avaliar a presença de ocratoxina A nestes alimentos. Os isolados pertencentes à seção *Nigri* foram investigados quanto à capacidade de produção de ocratoxina A. Dentre as 87 amostras analisadas foram isolados 2043 *Aspergillus* da seção *Nigri* 204 foram produtores de ocratoxina A, 67,8 % foram isolados da região de Petrolina, 18,9% de São Paulo e 6,7% do Paraná e 6,6% do Rio Grande do Sul. A otimização da metodologia de ocratoxina A nas amostras de uvas foi realizada, utilizando para a limpeza e quantificação, colunas de imunoafinidade e cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. Os isolados de *Aspergillus* seção *Nigri* foram separados em 6 grupos, baseando-se nas características morfo-fisiológicas.

Palavras-chaves: *Aspergillus* da seção *Nigri*, ocratoxina A, uvas.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduando em Ciências Biomédicas, VerisMetrocamp IBTA, Campinas-SP; akemi.yasumura@hotmail.com

2 Colaborador: Pós-graduanda Universidade Estadual de Londrina, UEL e Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL, Campinas-SP

3 Colaborador : Pesquisador CCQA/Microbiologia, Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL, Campinas-SP

4 Orientador: Pesquisador CCQA/Microbiologia, Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL, Campinas/SP; beatriz@ital.sp.gov.br



ABSTRACT- *Aspergillus niger* is a fungus belonging to the *Nigri* section of great biotechnology importance that has been isolated from various foods. The fact that these species are widespread in nature demand that studies be conducted to gain knowledge on its incidence in products intended for food. This species has been described by its potential to produce mycotoxins, harmful to human and animal health, ochratoxin A. In Brazil, the knowledge of the incidence of *Aspergillus* section *Nigri* producers and non-producers of ochratoxin A is restricted. The objective of this project was isolate and identify *Aspergillus* section *Nigri* of grape produced in Brazil, and to evaluate the presence of ochratoxin A in these foods. The isolates belonging to the section *Nigri* were investigated for ochratoxin A production capacity. Among the 87 samples analyzed were isolated 2043 from *Aspergillus* section *Nigri* with 204 being producers of ochratoxin A, 67,8% were isolated from Petrolina region, 18,9% from São Paulo, 6,7% from Paraná and 6,6% from Rio Grande do Sul. The ochratoxin A methodology validation in grapes samples was carried out using immunoaffinity columns for cleaning and quantification of the sample and high performance liquid chromatography with fluorescence detector. Isolates of *Aspergillus Nigri* section were separated into 6 groups, based on morphological and physiological characteristics.

Key-words: *Aspergillus* section *Nigri*, ochratoxin A, grapes.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a viticultura brasileira ocupa aproximadamente uma área de 81 mil hectares, com produções desde o extremo sul até regiões próximas à linha do equador. Dentre as regiões produtoras, duas merecem maior atenção: o Rio Grande do Sul pela alta produção anual, em média 777 milhões de quilos, e o Vale do São Francisco, pela exportação nacional de uvas finas de mesa (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2015).

No Brasil, o principal estado produtor é o Rio Grande do Sul, responsável por cerca de 90% da produção nacional. Em 2012, cerca de 57% da produção de uvas foi destinada ao processamento de vinhos, sucos e derivados e o restante foi destinado ao consumo in natura (EMBRAPA, 2012).

Aspergillus da seção *Nigri* já foram isolados de uvas e uvas passas (Somma et al., 2012; Logrieco et al., 2011; Iamanaka et al., 2005; Hocking et al., 2007) mas no Brasil os estudos ainda são escassos. Desta maneira faz-se necessário um estudo mais detalhado, a fim de determinar a



presença de fungos potencialmente produtores de ocratoxina A e a presença desta micotoxina em uvas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras

As amostras de uva destinadas para produção de suco foram coletadas em 4 estados: dezesseis amostras do Paraná, região de Londrina e Curitiba; trinta do Rio Grande do Sul, região de Bento Gonçalves; vinte de Pernambuco, região de Petrolina e vinte e uma de São Paulo, região de Louveira. Foram coletados 20 cachos de cada variedade de uva e aproximadamente 10 bagas de cada cacho foram separadas aleatoriamente para compor a amostra analítica, totalizando 1,5Kg de material. Foram analisadas as variedades: Isabel, Isabel Precoce, Bordo, Risata, Moscatel, Niagara Precoce, Violeta, Cora, Coder, Rudder, Concorde, Cabernet.

As amostras foram colhidas diretamente do pé, conforme apresentado na figura 1, mantidas em sacos de papel, sob refrigeração, até no máximo dois dias até a chegada no laboratório. O plaqueamento das uvas e a análise de atividade de água foram realizados no mesmo dia da chegada das amostras.



Figura 1. Coleta de uva em Petrolina/PE

2.2 Infecção fúngica – Plaqueamento

Cerca de 100 bagas foram selecionadas, descartou-se a polpa. A casca, após secagem em papel, foi plaqueada em meio DRBC. As placas foram incubadas a 25°C por 5 a 7 dias. A porcentagem de infecção fúngica foi calculada de acordo com Pitt & Hocking (2009) e as espécies de interesse foram isoladas e identificadas.



2.3 Identificação dos fungos filamentosos

Todos os isolados da seção *Nigri* foram purificados em ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA) e incubados a 25°C por 7 dias. Novamente os isolados foram inoculados em 3 pontos em CYA e incubados a 25°C e 37°C por 7 dias. A separação em grupos foi realizada através das características macroscópicas (diâmetro e cor da colônia, presença de exsudato, esclerócios) nas duas temperaturas testadas, e microscópicas (tamanho, rugosidade e coloração de conídios e conidióforos) (Klich & Pitt, 1988; Pitt & Hocking, 2009; Samson *et al*, 2002; Pitt, 2000). Diferentes espécies de *Aspergillus* da seção *Nigri* foram isoladas.

2.4 Capacidade para produção de ocratoxina pelos *Aspergillus* da seção *Nigri*

As espécies de *Aspergillus* da seção *Nigri* foram inoculados em ágar Extrato de Levedura Sacarose (YESA) e incubadas a 25°C por 7 dias. Um pequeno pedaço da colônia (plug) foi cortado, adicionou duas gotas da solução metanol : clorofórmio (1:1), e o plug foi pressionado sob a placa de sílica gel. A placa seguiu para a realização da cromatografia de camada delgada, utilizando como fase móvel a solução tolueno: acetato de etila: ácido fórmico 90%: clorofórmio (7:5:2:5) e comprimentos de onda de 365 e 254 nm. O padrão de ocratoxina A foi aplicado na placa para comparação com a amostra (Filténborget al., 1983).

2.5 Otimização do método e análise de ocratoxina A em uvas

O método de ocratoxina A em uvas foi otimizado seguindo o método proposto por Vargas *et al* (2005). Foram pesados 5 g da amostra previamente triturados em moinho (IKA Works do Brasil Ltda – mod A11) em frascos de 250mL e adicionado 100mL de metanol : bicarbonato 3% (1:1). Em seguida, o frasco seguiu para o shaker por 30 minutos. Foi realizada a filtração com o filtro qualitativo e o filtro de fibra de vidro, respectivamente. Foram transferidos 4mL do filtrado para um balão volumétrico de 100mL completando com solução PBS pH 7,0. Todo o conteúdo do balão volumétrico foi passado pela coluna de imunoafinidade OTA (VICAM®), e lavado com 30 mL de água destilada. A coluna de imunoafinidade seguiu para a etapa de eluição com metanol HPLC, para a remoção da toxina da coluna, totalizando 4mL de metanol HPLC. O metanol contendo a toxina foi seco em fluxo de nitrogênio e o extrato armazenado em freezer até a injeção no HPLC. Antes da injeção, o extrato foi eluído com 300µL de fase móvel e injetado 20µL.

Para avaliar o desempenho do método, uvas sem contaminação com ocratoxina A foram fortificadas com padrão de ocratoxina A, utilizando 3 níveis de contaminação: 0,62; 4,12 e



12,4µg/Kg, para o cálculo da recuperação. Para determinação do limite de detecção (LOD) foram realizadas 8 extrações de amostras de uvas fortificadas com padrão (Sigma-Aldrich) de ocratoxina A (nível 0,45 µg/Kg) e calculado o desvio padrão. Este valor foi multiplicado pelo valor t de Student para uma confiabilidade de 99%, segundo grau de liberdade apropriados. O limite de quantificação do método foi calculado como 10 vezes o valor do desvio padrão (Keith *et al.*, 1983, Long & Winefordner, 1983).

2.6 Separação dos isolados de *Aspergillus* da seção *Nigri* em grupos

Representantes de cada grupo pertencentes à seção *Nigri* foram inoculados em diferentes meios e temperaturas: 5°C, 25°C, 37°C e 42°C para ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA), 25°C para ágar Extrato de Malte (MEA) e 25°C para ágar Creatina Sacarose (CREA)

A separação em grupos foi baseada nas características morfológicas (diâmetro e coloração das colônias e presença de esclerócios e exsudatos em todas as temperaturas e meios testados) e diâmetro, cor e rugosidade dos conídios e conidióforos em CYA 25°C).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Infecção fúngica

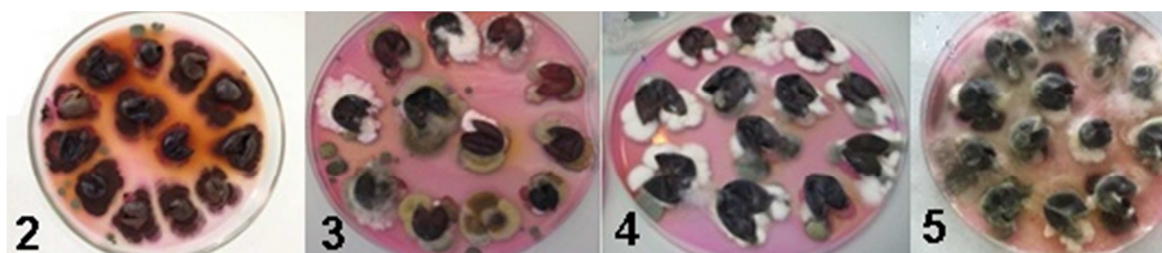
A região com maior infecção por *Aspergillus* da seção *Nigri* foi Petrolina/PE, apresentando média de infecção de 62,95%, com amostras variando de 1 a 100% de infecção, valores maiores que as demais regiões. Os valores médios de infecção obtidos foram: para as amostras do Paraná 6,5%; para o Rio Grande do Sul, 5% e São Paulo 16,3%. Dentre o total de amostras analisadas, foram isoladas 2043 cepas de *Aspergillus* da seção *Nigri* e 67,8% foram isolados da região de Petrolina, 18,9% de São Paulo e 6,7% do Paraná e 6,6% do Rio Grande do Sul. Todas as cepas foram testadas quanto à produção de ocratoxina A e apenas 9,9% foram produtoras. Em cada região a porcentagem de produtores de ocratoxina A foi de 9,5% em Petrolina; 0,2% no Paraná e 0,2% em São Paulo. A região do Rio Grande do Sul não apresentou isolados capazes de produzir ocratoxina A, conforme apresenta a tabela 1.

Tabela 1. Média de infecção por *Aspergillus* da seção *Nigri*.

	Nº isolados <i>Aspergillus</i> da seção <i>Nigri</i> (%)	Nº isolados produtores de ocratoxina A	% produtores ocratoxina A
Paraná	136 (6,7)	5	0,2

Rio Grande do Sul	134 (6,6)	0	0
Petrolina	1386 (67,8)	195	9,5
São Paulo	387 (18,9)	4	0,2
Total	2043	204	9,9

As figuras 2 a 5 apresentam as cascas de uvas plaqueadas em meio DRBC de cada região estudada.



Figuras 2 a 5. Respectivamente, amostra 52-PE, amostra 2-PR, amostra 28-RS e amostra 69-SP.

3.2 Otimização do método de ocratoxina A em uvas

As amostras fortificadas com ocratoxina A, nos níveis 0,62; 4,12 e 12,4µg/Kg apresentaram os valores médios de recuperação de 87, 76 e 73% respectivamente, como mostra a tabela 1 (ensaio em triplicata).

Tabela 2. Recuperação de ocratoxina A.

Ensaio	Recuperação ocratoxina A (%)		
	Níveis de fortificação com padrão de ocratoxina A		
	0,6µg/Kg	4 µg/Kg	12 µg/Kg
1	99,06	73,76	76,79
2	92,80	80,18	64,72
3	69,02	73,08	76,22
Média	86,96	75,68	72,58
Desvio padrão	15,85	3,92	6,81

Os resultados foram satisfatórios e encontram-se de acordo com o regulamento da Comunidade Européia (EC 26, 2002) que estabelece os valores de recuperação entre 50 a 120%



para nível de contaminação menor que 1 µg/Kg e 70 a 110% para valores entre 1 a 10 µg/Kg. Os limites de detecção e quantificação do método foram de 0,45 e 1,49 µg/Kg.

Apesar do elevada ocorrência de fungos da seção *Nigri* nas amostras de uvas, nenhuma apresentou contaminação por ocratoxina A. Este fato pode ser explicado pela alta contaminação por fungos que não eram produtores de ocratoxina A (90,1%).

3.3 Grupos de *Aspergillus* da seção *Nigri* isolados das uvas

Através da avaliação macro e microscópica dos isolados, capacidade de produção de ocratoxina e crescimento em diferentes meios e temperaturas, foi possível realizar a separação dos isolados em 6 grupos distintos: grupo dos agregados de *A. niger*, grupo *A. japonicus*, grupo *A. uvarum*, *A. carbonarius*, grupo *Aspergillus* sp, e outros *Aspergillus* da seção *Nigri*. A tabela a seguir apresenta o número de isolados de cada grupo, por região analisada.

Dentre os isolados de *Aspergillus* da seção *Nigri*, foi possível confirmar a identidade apenas de *Aspergillus carbonarius* através das características morfológicas. Para as outras espécies faz-se necessária a avaliação molecular e de produção de metabólitos para a definição da identidade das espécies. Dentre os isolados verificou-se o grupo *Aspergillus* sp. Estes foram isolados apenas no Rio Grande do Sul e não se enquadraram com nenhuma espécie na literatura ou chaves de classificação para *Aspergillus* da seção *Nigri*. Estes isolados estão sendo estudados e é possível que possam ser uma nova espécie.

Tabela 3. Isolados de *Aspergillus* da seção *Nigri* em grupos, por região.

	Paraná	Rio Grande do Sul	Pernambuco	São Paulo	Total
Agregados <i>A. niger</i>	32	13	240	76	361
Grupo <i>A. japonicus</i>	57	32	1038	291	1418
Grupo <i>A. uvarum</i>	27	17	-	-	44
<i>A. carbonarius</i>	1	-	45	2	48
Grupo <i>Aspergillus</i> sp	-	25	-	-	25
Outros <i>Aspergillus</i> da seção <i>Nigri</i>	19	47	63	18	147
Total					2043



4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos a partir desse trabalho, podemos concluir que *Aspergillus* da seção *Nigri* estiveram presentes em uvas e podem ser considerados potenciais contaminantes neste produto.

A região que apresentou o maior índice de *Aspergillus* da seção *Nigri* foi a região de Petrolina, seguida de São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná, respectivamente.

De 2043 cepas analisadas apenas 204 (9,9%) foram classificadas como potencialmente capazes de produzir ocratoxina A, através da cromatografia de camada delgada em placa de sílica gel.

O desempenho do método utilizado para a detecção e quantificação de ocratoxina A nas uvas foi satisfatório, podendo ser utilizado para avaliar o grau de contaminação por ocratoxina A nas amostras. Nenhuma amostra apresentou contaminação por ocratoxina A.

A partir da separação dos isolados de *Aspergillus* da seção *Nigri* em grupos, podemos observar que o grupo mais comum nas uvas foi o de *A. japonicus*, uma espécie não capaz de produzir a ocratoxina A. Apesar da alta contaminação por fungos, as amostras não apresentaram contaminação por ocratoxina A e isso pode ser explicado pela alta incidência de fungos não produtores desta micotoxina.

Contudo algumas cepas de *Aspergillus carbonarius* e do grupo de *A. niger* capazes de produzir ocratoxina A foram também encontradas, e é sabido que estas espécies já foram descritas como os principais responsáveis pela presença de ocratoxina A em uvas. A análise de novas amostras é de extrema importância, principalmente pelo fato do trabalho ter contado com espécies que são conhecidas pela capacidade de produção de ocratoxina A. Também é importante a realização de estudos adicionais visando avaliar quais as etapas do cultivo das uvas e do processo de fabricação dos sucos podem estar relacionadas com o desenvolvimento de *Aspergillus* da seção *Nigri*, a fim de estabelecer métodos que possam diminuir a contaminação pelo fungo, e conseqüentemente, pela ocratoxina A.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPq – PIBIC pela bolsa concedida. Ao CCQA – ITAL pela oportunidade de estágio. À Fapesp pelo apoio financeiro do projeto (Projeto 2013/05414-8). E à Beatriz, Marta e Larissa pela orientação e ensinamentos.



6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

EC 26/2002 – **DIRECTIVA 2002/26/CE**, Jornal Oficial das Comunidades Europeias, **Fixa os métodos de colheita de amostras e de análise para o controlo oficial do teor de ocratoxina A nos géneros alimentícios**, 13 de março de 2002, L 75/38

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – **Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2012**. Disponível em: <<http://www.cnpqv.embrapa.br/publica/comunicado/cot137.pdf>>. Último acesso: 17/02/2015

FILTENBORG, O; FRISVAD, J.C.; & SVENDENSEN, J.A. - **Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures** - Appl. Environm. Microbiol.,45: 581-585, 1983.

HOCKING, A.D.; LEONG, S.L.L.; KAZI, B.A.; EMMETT, R.W.; SCOTT, E.S. **Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products**. International Journal of Food Microbiology 119, 84–88, 2007.

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 & Contaminants, 22:12, 1258-1263, 2005.

KEITH, L.H.; CRUMMETT, W.; DEEGAN J.; LIBBY, R.A.; TAYLOR, J.K.; WENTLER, G. Principles of environmental analysis. **Analytical Chemistry**, Washington, v.55, p.2210-2218, 1983.

KLICH, M.A. & PITT, J.I. 1988 - **A Laboratory Guide to Common Aspergillus Species and their teleomorphs**. - North Ryde, Australia: Division of Food Science and Technology.

LOGRIECO, A.F.; FERRACANE, R.; COZZI, G.; HAIDUKOWSKY M.; SUSCA, A.; MULÈ, G.; RITIENI, A. **Fumonisin B2 by Aspergillus niger in the grape–wine chain: an additional potential mycotoxicological risk**. Ann Microbiol, 61:1–3, 2011.

LONG, G.L.; WINEFORDNER, J.D. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, Washington, v.55, p. 712A-724A, 1983

Ministério da Agricultura – **Culturas. Uva** – Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/uva>>. Último acesso: 17/02/2015

PITT, J.I. & HOCKING, A.D. - **Fungi and Food Spoilage** - , 3rd ed. New York. Springer. 2009.

PITT, J.I., 2000 - **A Laboratory Guide to Common Penicillium Species** 3rd edn - Food Science Australia, North Ryde, N.S.W. 197 pp

SAMSON, R.A., HOEKSTRA, E.S., FRISVAD, J.C., FILTENBORG, O., 2002. -**Introduction to Food- and Airborne Fungi** - Centraalbureauvoor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands.

SOMMA, S.; PERRONE, G.; LOGRIECO, A.F. **Diversity of black aspergilli and mycotoxin risks in grape, wine and dried vine fruits**. Phytopathologia Mediterranea, 51 (1), pp. 131-147, 2012.



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

VARGAS, E.A., SANTOS, E.A. & PITTET, A. **Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography collaborative study.** A. AOAC International 58 : 773-779, 2005.