

LARISSA DE SOUZA FERRANTI

***Aspergillus* section *Nigri* produtores de fumonisina B₂
isolados de castanha-do-brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Benedito Corrêa

Versão original

São Paulo
2012

RESUMO

FERRANTI, L. F. *Aspergillus* section *Nigri* produtores de fumonisina B₂ isolados de castanha-do-brasil. 2012. 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) é uma planta de grande importância econômica na região da Amazônia e constitui um importante produto exportado pelo Brasil. No entanto, os baixos níveis tecnológicos característicos de sua cadeia produtiva considerada ainda extrativista e as condições inadequadas de manejo da matéria prima, favorecem o aparecimento de contaminação por fungos produtores de micotoxinas. O conhecimento da distribuição de fungos toxigênicos em alimentos é importante porque dá parâmetros para controlar e prevenir a produção destas micotoxinas. A fumonisina B₂ (FB₂) é uma micotoxina produzida por espécies de *Fusarium* e *Aspergillus* section *Nigri*, e é motivo de preocupação para a saúde humana e de animais. O objetivo do presente trabalho foi verificar o potencial toxigênico quanto à produção de fumonisina B₂ das cepas de *Aspergillus* section *Nigri* isolados de castanha-do-brasil e verificar a contaminação desse alimento por essa micotoxina. Foram analisadas 200 cepas, previamente identificadas morfológicamente como *Aspergillus* section *Nigri*, isoladas de amostras de castanha-do-brasil, pertencentes a coleção de fungos do laboratório de Microbiologia do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA), do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) em Campinas–SP. Para testar o potencial de produção de fumonisina B₂, os isolados foram inoculados em Czapek Yeast Extract Agar Sacarose 20% (CY20S). A toxina foi extraída com metanol e detectada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando reagente o-phthaldialdehydo (OPA) para reação de derivatização. Um total de 100 amostras de castanha-do-brasil provenientes dos Estados do Pará, Amazonas e São Paulo em diferentes etapas da cadeia produtiva da castanha foram analisadas utilizando coluna de imunoafinidade para extração e limpeza das amostras, OPA e CLAE, para detecção e quantificação da fumonisina B₂. De um total de 200 cepas de *Aspergillus* section *Nigri* testadas quanto à capacidade de produção de fumonisina B₂, apenas 39 cepas (19,5%) foram produtoras de FB₂, as concentrações variaram de 0,01 a 37,25 µg/kg. Cento e trinta e oito (69%) não foram produtoras de fumonisina B₂ e 23 cepas (11,5%) apresentaram picos menores que o limite de detecção. A atividade de água destas 100 amostras de castanha-do-brasil variaram de 0,348 a 0,994 e a infecção fúngica de 0 a 100%, nas diferentes etapas de cadeia. Embora várias amostras apresentaram alta contaminação por *Aspergillus* section *Nigri*, nenhuma amostra estava contaminada por fumonisina B₂.

Palavras-chave: *Aspergillus* section *Nigri*. Fumonisina B₂. Castanha-do-brasil.

ABSTRACT

FERRANTI, L. F. ***Aspergillus* section *Nigri* produtores de fumonisina B₂ isolados de castanha-do-brasil.** 2012. 84 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) is a plant with vast economic importance in the Amazon region and is an important product exported by Brazil. However, low levels of technology, and inadequate management of raw material favor the appearance of contamination by fungi that produce toxic metabolites called mycotoxins. The knowledge of the distribution of toxigenic fungi in foods is important because it provides parameters to control and prevent the production of mycotoxins. Fumonisin B₂ (FB₂) is a mycotoxin produced by *Fusarium* species and *Aspergillus* section *Nigri*, and is a concern for human health. The aim of this study was to assess the toxigênico potential for fumonisin B₂ production by *Aspergillus* section *Nigri* strain isolated from brazil nut and check the contamination of food by this mycotoxin. We analyzed 200 strains previously identified morphologically as *Aspergillus* section *Nigri* isolated from brazil nut samples, preserved in silica gel at a temperature of 5 °C, from the fungi collection at the Microbiology laboratory of the Centre for Science and Food Quality (CCQA), Institute of Food Technology (ITAL), Campinas-SP. To test the potential of fumonisin B₂ production, the isolates were inoculated on Czapek Yeast Extract Agar Sucrose 20% (CY20S). The toxin was extracted with methanol and identified by high performance liquid chromatography (HPLC) using o-phthaldialdehydo reagent (OPA) for derivatization reaction. A total of 100 brazil nut samples from the States of Pará, Amazonas and São Paulo at different stages of the nut production chain were analyzed using an immunoaffinity column for extraction and cleanup of samples, HPLC and OPA for the detection and quantification of fumonisin B₂. From a total of 200 strains of *Aspergillus* section *Nigri* tested for the ability to produce fumonisin B₂, only 39 strains (19.5%) were producing FB₂ concentrations ranging from 0.01 to 37.25 g / kg, 138 (69%) were not producing fumonisin B₂, and 23 strains (11.5%) showed peaks less than the detection limit. The water activity of the 100 samples from the brazil nuts ranged from 0.348 to 0.994 and a fungal infection of 0 to 100%, at the different stages of the chain. Although several samples showed high contamination by *Aspergillus* section *Nigri*, no sample was contaminated by fumonisin B₂.

Keywords: *Aspergillus* section *Nigri*. Fumonisin B₂. Brazil nut.

1 INTRODUÇÃO

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) é um produto de elevada importância para a economia dos Estados da Amazônia Brasileira, sendo o principal produto extrativo não madeireiro da floresta amazônica, está ligada à cultura das populações tradicionais onde seus produtos e subprodutos são utilizados como fonte de alimentação e renda há várias gerações. O Brasil abastece 75% do mercado mundial e produz, anualmente, cerca de 26.000 toneladas de castanha-do-brasil, sendo predominante a exportação do produto *in natura*. A amêndoa da castanha-do-brasil é considerada um alimento rico em proteínas, lipídios e vitaminas, além de se constituir em excelente fonte de selênio. Entretanto, o baixo nível tecnológico característico de sua cadeia produtiva bem como as condições inadequadas de manejo e manuseio da matéria-prima favorece a constituição de pontos de contaminação com conseqüente risco à saúde do consumidor e perdas econômicas comuns em todas as etapas (SOUZA, 2003).

Aspergillus section *Nigri*, conhecidos como *black aspergilli*, são comumente encontrados em alimentos como uvas e produtos de uvas, café, cacau, grãos e cebolas. É considerado um fungo frequente em castanhas, especialmente em amendoim e nozes (PITT; HOCKING, 2009). *A. niger* é um dos mais importantes fungos filamentosos utilizados em biotecnologia. Possui o grau GRAS (*Generally Regarded as Safe*) estabelecido pelo FDA (*US Food and Drugs Administration*), sendo utilizado para a produção de várias enzimas e ácidos orgânicos, em escala industrial (SAMSON; VARGAS, 2009).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidas por fungos. Apesar de haver um esforço para controlar contaminações fúngicas em alimentos, os fungos toxigênicos estão presentes na natureza e ocorrem regularmente em alimentos como cereais, frutas e castanhas. Os três principais gêneros produtores de toxinas em alimentos são: *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (MURPHY et al., 2006).

Em 2007, Frisvad et al., relataram pela primeira vez a produção de fumonisina B₂ (FB₂) por *Aspergillus niger*. Até então, a produção de fumonisina havia sido relatada apenas em *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* e outras espécies do gênero *Fusarium*. Mais tarde, Frisvad et al. (2011), demonstram que *A. niger* pode produzir tanto fumonisina B₂ quanto B₄ e B₆, não encontrando cepas produtoras de FB₁ nem FB₃.

A fumonisina B₁ (FB₁) é a mais estudada dentre este grupo de metabólitos, mas quando comparada à FB₂, esta última é mais citotóxica que a FB₁ (GUTLEB; MORRISON; MURK, 2002). Fumonisinas são carcinogênicas, hepatotóxicas e nefrotóxicas. Causadoras de leucoencefalomalácia (relacionadas com lesões necróticas no cérebro) em equinos e edema pulmonar em suínos. O consumo de grãos contaminados por fumonisinas pode estar relacionado ao maior índice de câncer esofágico em humanos (DESJARDINS, 2006; MURPHY et al., 2006).

Nestas condições são necessários estudos a fim de conhecer a incidência de *Aspergillus section Nigri* produtores de fumonisina B₂ nas castanhas-do-brasil, uma vez que a incidência destas espécies neste produto é comum.

6 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos a partir deste estudo, podemos concluir que a infecção por *Aspergillus* section *Nigri* em castanha-do-brasil pode variar dependendo da região, da etapa do processo, e das boas práticas realizadas.

Os valores de atividade de água das amostras de castanha-do-brasil coletadas na floresta do Estado do Pará e do Amazonas foram mais elevados que os valores encontrados nas processadoras e nos mercados.

As cepas de *Aspergillus* section *Nigri* mostraram potencialidade para produção de fumonisina B₂, *Aspergillus awamori*, apresentou uma maior produção de FB₂, comparado às com *Aspergillus niger*.

A presença de *black aspergilli* em alimentos é comum, exigindo um estudo mais detalhado em relação à estas espécies em alimentos consumidos pela população.

Através da análise molecular foi observado grande variabilidade genética dentro da espécie de *Aspergillus niger*. Utilizando sequenciamento do gene β -tubulina, foi concluído que as espécies *Aspergillus awamori* e *Aspergillus niger*, se diferenciam por apenas uma base nitrogenada na posição 133 do gene, confirmando que para a identificação destas espécies a utilização da biologia molecular junto a análise morfológica é imprescindível.

Apesar das amostras de castanha-do-brasil apresentarem contaminação por fungos produtores de fumonisina B₂, nenhuma amostra estava contaminada com essa micotoxina, assim pode-se concluir que a castanha-do-brasil não é um bom substrato para a produção de FB₂ por *Aspergillus* section *Nigri*.

REFERÊNCIAS*

- ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F. J. Taxonomy and significance of *black Aspergilli*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, p. 33-49, 2004.
- ABRUNHOSA, L.; CALADO, T.; VENÂNCIO, A. Incidence of Fumonisin B₂ Production by *Aspergillus niger* in Portuguese Wine Regions. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, p. 7514-7518, 2011.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC Nº7 de 18 de fevereiro de 2011. **Diário Oficial da União**. n. 37, seção 1, 22 de fevereiro de 2011.
- AOYAMA, K.; NAKAJIMA, M.; TABATA, S.; EIICHI, I.; TANAKA, T.; NORIZUKI, H.; ITOH, Y.; FUJITA, K.; KAI, S.; TSUTSUMI, T.; TAKAHASHI, M.; TANAKA, H.; IIZUKA, S.; OGISO, M.; MAEDA, M.; YAMAGUCHI, S.; SUGIYAMA, K. I.; SUGITAKONISHI, Y.; KUMAGAI, S. Four-year surveillance for ochratoxin A and fumonisins in retail foods in Japan. **Journal of Food Protection**, v. 73, p. 344-352, 2010.
- ARRUS, K.; BLANKA, G.; ABRAMSONB, D.; CLEARC, R.; HOLLEYA, R. A. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **J. Stor. Prod. Research**, v. 41, p. 513-527, 2005.
- ASHWORK, L. J.; SCHROEDER, H. W.; LANGLEY, B. C. Aflatoxins: Environmental Factors Governing Occurrence in Spanish Peanuts. **Science**, v. 148, p. 1228-1229, 1965.
- AZEVEDO, A. C. S.; FURLANETO, M. C.; SOSA-GOMEZ, D. R.; FUNGARO, M. H. P. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (*Deuteromycotina: Hyphomycetes*) isolates. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 729-732, 2000.
- BAKER, S. *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future. **Medical Mycology**, v. 44, p. S17-S21, 2006.
- BARTÓK, T.; SZÉCSI, Á.; SZEKERES, A.; MESTERHÁZY, Á.; BARTÓK, M. Detection of new fumonisin mycotoxins and fumonisin-like compounds by reversed-phase highperformance liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, p. 2447-2462, 2006.
- BARTÓK, T.; SZEKERES, A.; SZÉCSI, Á.; BARTÓK, M.; MESTERHÁZY, Á. A new type of fumonisin series appeared on the scene of food and feed safety. **Cereal Research Communications**, v. 36, p. 315-319, 2008. Suppl. B.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARTÓK, T.; TÖLGYESI, L.; SZEKERES, A.; VARGA, M.; BARTHA, R.; SZÉCSI, Á.; BARTÓK, M.; MESTERHÁZY, Á. Detection and characterization of twenty-eight isomers of fumonisin B₁ (FB₁) mycotoxin in a solid rice culture infected with *Fusarium verticillioides* by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight and ion trap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, p. 35-42, 2010.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, 497-516, 2003.

BEUCHAT, L. R.; RICE, S. L. *Byssochlamys* spp. and their importance in processed fruits. **Adv. Food Res.**, v. 25, p. 237-288, 1979.

BIGELIS, R. Food enzymes. In: FINKELSTEIN, D. B.; BALL, C. (Ed.). **Biotechnology of filamentous fungi: technology and products**. Boston, MS: Butterworth-Heinemann, 1992. p. 361-415.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeto de **Monitoramento da castanha-do-brasil**: relatório de atividades. Brasília, 2002. 110 p.

BAQUIÃO, A. C.; ZORZETE, P.; REIS, T. A.; ASSUNÇÃO, E.; VERGUEIRO, S.; CORREA, B. Mycoflora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. **Food Control**, v. 28, p. 224-229, 2012.

BRIDGE, P. D.; ARORA, D. K.; REDDY, C. A.; ELANDER, R. P. **Application of PCR in mycology**. London, UK: CAB International, 1998. 368 p.

BUTCHKO, R. A.; PLATTNER, R. D.; PROCTOR, R. H. Deletion analysis of FUM genes involved in tricarballic ester formation during fumonisin biosynthesis, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 25, p. 9398-9404, 2006.

CABAÑES, F. J.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; CASTELLA, G.; MINGUEZ, S.; PONS, A. What is the source of ochratoxin A in wine?. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, p. 213-215, 2002.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxinas A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.

CALDERARI, T. O. **Biodiversidade de fungos aflatoxigênicos e aflatoxinas em castanha-do-brasil**. 2011. 145 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

CAMPO/PAS, **Manual de segurança e qualidade para a cultura da castanha-do-brasil**. Brasília, DF: Campo PAS, 2004. (Série Qualidade e Segurança dos Alimentos).

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The fungi**. 2nd ed. London, UK: Academic Press, 2001. 588 p.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (CAST). **Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems.** Raleigh, US: Task Force Report, 2003. 109 p.

CAWOOD, M. E.; GELDERBLOM, W. C. A.; VLEGGAR, R.; BEHREND, Y.; THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O. Isolation of the fumonisin mycotoxins: A quantitative approach. **J. Agric. Food Chem.**, v. 39, p. 1958-1962, 1991.

CHELKOWSKI, J. **Cereal grain: mycotoxins, fungi and quality in drying and storage.** Amsterdam: Elsevier, 1991. 607 p.

CLIVER, D. O.; RIEMANN, H. **Foodborne diseases.** 2nd ed. Amsterdam: Academic Press, 2002. 424 p.

CHULZE, S. N. Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: a review. **Food Additives and Contaminants**, v. 27, pt. A, p. 651-657, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Conjuntura Mensal.** abr. 2012. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 7 jun. 2012.

COOPERATIVA CENTRAL DE COMERCIALIZAÇÃO EXTRATIVISTA DO ESTADO DO ACRE (COOPERACRE). **Ficha técnica de produtos: castanha-do-brasil.** Disponível em: <www.cooperacre.gov.br>. Acesso em: 20 jul. 2012.

CROUS, P. W.; VERKLEY, G. J. M.; GROENEWALD, J. Z.; SAMSON, R. A. **Fungal Biodiversity.** Uthrech, NL: CBS Fungal Biodiversity Center, 2009. 269 p. (CBS Laboratory Manual Series, 1).

CREPPY, E. E. Human ochratoxicosis. **J. Toxicol. Toxin Reviews**, v. 18, p. 277-293, 1999.

CRISHOLM, A.; MC AULEY, K.; MANN, J.; WILLIAMS, S.; SKEAFF, M. Cholesterol lowering effects of nuts compared with a Canola oil enriched cereal of similar fat composition. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 15, n. 4, p. 284-292, 2005.

DESJARDINS, A. E. **Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics and biology.** Minnesota: APS Press, 2006. 260 p.

DUPUY, J.; LE BARS, P.; BOUDRA, H.; LE BARS, J. Thermostability of fumonisin B₁, a mycotoxin from *Fusarium moniliforme*, in corn. **Applied and Env. Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 2864-2867, 1993.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Pesquisas tentam livrar castanha-do-brasil da contaminação por fungos.** Disponível em: <<http://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

ENRÍQUEZ, G. Amazônia- Rede de Inovação de Dermocosméticos: Sub-rede de dermocosméticos na Amazônia a partir do uso sustentável de sua biodiversidade

com enfoques para as cadeias produtivas da castanha-do-pará e dos óleos de andiroba e copaíba. **Parceria Estratégica**, v. 14, n. 28, p. 51-118, 2009.

EURACHEM GUIDES. **The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics**. Teddington: LGC, 1998.

EUROPEAN UNION (EU). Commission Decision of 4 July 2003, imposing special conditions on the import of Brazil nuts in shell originating in or consigned from Brazil (2003/493/EC) L 163. **Official Journal of the European Union**, v. 46, p. 33-38 2003.

EUROPEAN UNION (EU). Commission regulation No 165/2010 of 16 February 2010. Amending regulation (EC) N. 1881/2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff as regards aflatoxins. **Official Journal of the European Union**, v. 53, p. 1-18, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **International trade in non-wood forest products: an overview**. Disponível em: <www.fao.org>. Acesso em: 7 jun. 2012.

FERRACIN, L. M.; FRISVAD, J. C.; TANIWAKI, M. H.; IAMANAKA, B. T.; SARTORI, D.; SCHAPOVALOFF, M. E.; FUNGARO, M. H. P. Genetic Relationships among Strains of the *Aspergillus niger* Aggregate. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 52, n. special, p. 241-248, 2009.

FINK-GREMMELS, J. H. Micotoxins: Their implications for human and animal health. **Veterinary Quarterly**, v. 21, n. 4, p. 115-120, 1999.

FREIRE, F. C. O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R. M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. **Mycopathologia**, v. 149, n. 1, p. 13-19, 2000.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage and mycotoxin production. In: ARORA, D. K.; MUKERJI, K. G.; MARTH, E. H. (Ed.), **Handbook of applied mycology: volume 3**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 31-68.

FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O.; DE VRIES, R.; MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J.; CABAÑES, F. J.; EHRlich, K.; SAMSON, R. A. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 31-37, 2007a.

FRISVAD, J. C.; SMEDSGAARD, J.; SAMSON, R. A.; LARSEN, T. O.; THRANE, U. Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9727-9732, 2007b.

FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O.; THRANE, U.; MEIJER, M.; VARGA, J.; SAMSON, R. A.; NIELSEN, K. Fumonisin and Ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. **Plos One**, v. 6, n. 8, p. 1-5, 2011.

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

