



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

Cristina Akemi **Yasumura**<sup>1</sup>; Larissa de Souza **Ferranti**<sup>2</sup>; Marta Hiromi **Taniwaki**<sup>3</sup>; Beatriz Thie  
**Iamanaka**<sup>4</sup>

RE 15208

**RESUMO** - *Aspergillus niger* é um fungo pertencente à seção *Nigri* de grande importância biotecnológica e que já foi isolada de vários alimentos. O fato destas 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 duas micotoxinas relevantes, prejudiciais à saúde humana e animal, a ocratoxina A e a fumonisina B<sub>2</sub>. 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 uvas 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 1887 *Aspergillus* da seção *Nigri* e 102 foram produtores de ocratoxina A, 66,72 % foram isolados da região de Petrolina, 18,13% de São Paulo, 8 % do Rio Grande do Sul e 7,15% do Paraná. 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 valores de recuperação obtidos, para os níveis de 0,62; 4,12 e 12,4µg/Kg foram de 87, 76 e 73% respectivamente. Os limites de detecção e quantificação do método foram de 0,45 e 1,49µg/Kg respectivamente.

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

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biomédicas, Veris Metrocamp 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 two relevant mycotoxins, harmful to human and animal health, ochratoxin A and fumonisin B<sub>2</sub>. 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 grapes 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 1887 from *Aspergillus* section *Nigri* with 102 being producers of ochratoxin A, 66.72% were isolated from Petrolina region, 18.13% from São Paulo, 8% from Rio Grande do Sul and 7.15% from Paraná. 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. The recovery values obtained for 0.62; 4.12 and 12.4µg/Kg levels were 87, 76 and 73% respectively. The detection and quantification limits of the method were 0.45 and 1.49µg/Kg respectively.

**Key-words:** *Aspergillus* section *Nigri*, ochratoxin A, mycotoxin, 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 57,07% 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. A presença destas espécies em uvas e por se tratar de um produto alimentício presente no cotidiano das pessoas, são fatores que mostram a necessidade de um estudo mais detalhado, a fim de determinar a presença de fungos potencialmente produtores de ocratoxina A e a presença desta micotoxina nas amostras obtidas.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Amostras**

As amostras de uva destinadas para produção de suco foram coletadas em 4 estados: 16 amostras do Paraná, região de Londrina e Curitiba; 30 do Rio Grande do Sul, região de Bento Gonçalves; 20 de Pernambuco, região de Petrolina e 21 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. Paralelamente foram coletadas 21 amostras de solo onde as uvas foram cultivadas (aproximadamente 500g). Foram analisadas as variedades: Isabel, Isabel Precoce, Bordo, Risata, Moscatel, Niágara 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 identificação prévia dos isolados foi realizada através das características macroscópicas (diâmetro e cor da colônia, presença de exudato, esclerócios) em todas as temperaturas testadas, e microscópicas (tamanho, rugosidade e coloração de conídios e conidióforos) nas placas incubadas a 25°C. (Klich & Pitt, 1988; Pitt & Hocking, 2009; Samson *et al*, 2002; Pitt, 2000). Diferentes espécies de *Aspergillus* da seção *Nigri* foram isoladas. Estas espécies foram separadas em grupos, utilizando as diferenças entre as características morfofisiológicas.

### **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 incubados 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 (Filtenborget *al.*, 1983).

### **2.5 Otimização do método 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 30mL 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 0,45µg/Kg) e calculado o desvio padrão. Este valor foi multiplicado pelo valor t de Student para uma confiabilidade de 99%, segundo graus 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 Medição da atividade de água**

A análise de atividade de água foi determinada no aparelho Aqualab, modelo 3TE (Decagon, USA). As leituras foram realizadas em triplicatas a 25°C ±1°C

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

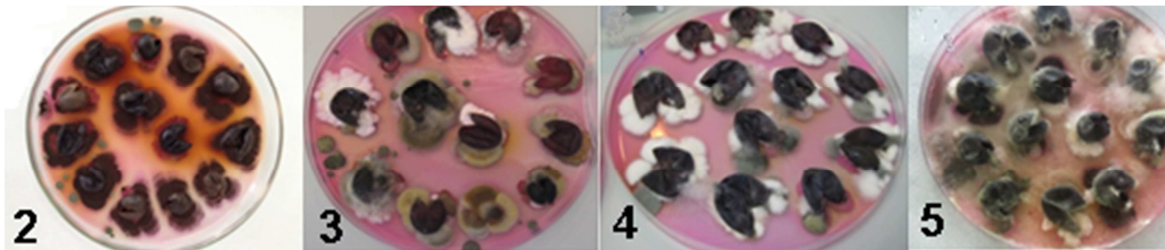
### **3.1 Infecção fúngica**

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 1887 cepas de *Aspergillus* da seção *Nigri* e 66,72% foram isolados da região de Petrolina, 18,13% de São Paulo, 8% do Rio Grande do Sul e 7,15% do Paraná. Todas as cepas foram testadas quanto à produção de ocratoxina A e apenas 5,4% foram produtoras. Em cada região a porcentagem de produtores de ocratoxina A foi de 6,5% em Petrolina; 4,4% no Paraná; 5,3% no Rio Grande do Sul e 1,75% em São Paulo, conforme apresenta a tabela 1.

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

	<b>Nº isolados <i>Aspergillus</i> da seção <i>Nigri</i> (%)</b>	<b>Nº isolados produtores de ocratoxina A</b>	<b>% produtores ocratoxina A</b>
Paraná	135 (7,15)	6	4,4
Rio Grande do Sul	151 (8)	8	5,3
Petrolina	1259 (66,72)	82	6,5
São Paulo	342 (18,13)	6	1,75
<b>Total</b>	<b>1887</b>	<b>102</b>	<b>5,4</b>

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	4µg/Kg	12µg/Kg
1	99,06	73,76	76,79
2	92,80	80,18	64,72
3	69,02	73,08	76,22
<b>média</b>	<b>86,96</b>	<b>75,68</b>	<b>72,58</b>



## 9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2015 10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

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

### 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 1887 cepas analisadas apenas 102 (5,4%) 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.

A realização de estudos adicionais em relação aos *Aspergillus* da seção *Nigri* é de extrema importância, por se tratar de um fungo potencialmente produtor de ocratoxina A e comumente encontrado em alimentos destinados à alimentação humana e animal.

### 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**

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2012**. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot137.pdf>>. Acesso em: 17 de Fev. 2015.



**9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2015**  
**10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo**

- FILTENBORG, O; FRISVAD, J.C.; SVENDENSEN, J.A. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures, **Appl. Environm. Microbiol.**, v. 45, p. 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**, v. 119, p. 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**, v. 22 (12), p. 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 telecomorphs.**- Food Science Australia, North Ryde, N.S.W.
- LOGRIECO, A.F.; FERRACANE, R.; COZZI, G.; HAIDUKOWSKY M.; SUSCA, A.; MULÈ, G.; RITIENI, A. Fumonisin B<sub>2</sub> by *Aspergillus niger* in the grape–wine chain: an additional potential mycotoxicological risk. **Ann Microbiol.**, v, 61, p. 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 e Pecuária (MAPA). **Culturas. Uva.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/uva>>. Acesso em: 17 de Fev. 2015.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage.** 3rd ed. New York: Springer. 2009, 471 p.
- PITT, J.I., 2000 - **A Laboratory Guide to Common Penicillium Species.** 3rd ed. - Food Science Australia, North Ryde, N.S.W. 197 p.
- SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to Food and Airborne Fungi** – Centraalbureau voor Schimmel cultures, 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**, v. 51, p 131-147, 2012.
- 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**, v. 58, p. 773-779, 2005.