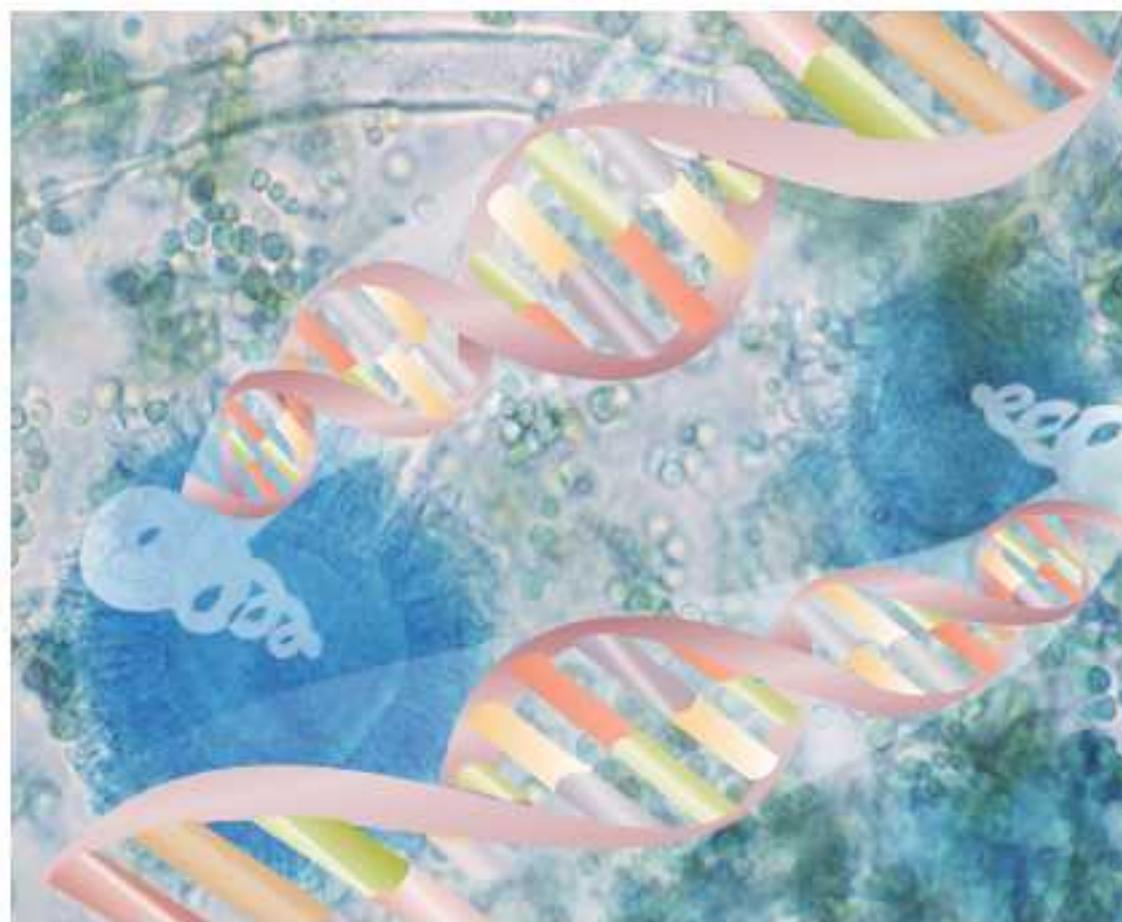


Detecção de Fungos Filamentosos Produtores de Aflatoxina Utilizando a Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR)



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Hélio Tollini
Cláudia Assunção dos Santos Viegas
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana
Diretor-Presidente

José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho
Tatiana Daene de Abreu Sá
Diretores-Executivos

Embrapa Agroindústria de Alimentos

Amauri Rosenthal
Chefe-Geral

Regina Isabel Nogueira
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Marcos Luiz Leal Maia
Chefe Adjunto de Administração



ISSN 0103-6068 68

Dezembro, 2005

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Documentos68

Detecção de Fungos Filamentosos Produtores de Aflatoxinas Utilizando a Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR)

Edna Maria Morais Oliveira
Otniel Freitas-Silva

Rio de Janeiro, RJ
2005

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria de Alimentos

Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
CEP: 23020-470 - Rio de Janeiro - RJ
Telefone: (0xx21)2410-9500
Fax: (0xx21)2410-1090
Home Page: www.ctaa.embrapa.br
E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Regina Isabel Nogueira
Membros: Maria da Graça Fichel do Nascimento
 Maria Ruth Martins Leão
 Neide Botrel Gonçalves
 Ronoel Luiz de O. Godoy
 Virgínia Martins da Matta
Secretária: Renata Maria Avilla Paldês

Supervisor editorial: Maria Ruth Martins Leão
Revisor de texto: Comitê de Publicações
Normalização bibliográfica: Maria Ruth Martins Leão
Foto da capa: André Guimarães de Souza
Tratamento de ilustrações: André Guimarães de Souza
Editoração eletrônica: André Luis do Nascimento Gomes
 André Guimarães de Souza

1ª edição

1ª impressão (2005): versão on-line

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação - CIP
Embrapa Agroindústria de Alimentos**

Oliveira, Edna Maria Morais.
Detecção de fungos filamentosos produtores de aflatoxinas utilizando a reação em cadeia DNA polimerase (PCR) / por Edna Maria Morais Oliveira e Otniel Freitas-Silva - Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2005.

16 p. ; 21 cm.- (Embrapa Agroindústria de Alimentos. Documentos, ISSN 0103-6068; 68).

1. Aflatoxinas. 2. Fungos. 3. Métodos de detecção
I. Freita-Silva, Otniel. II. Embrapa Agroindústria de Alimentos.
III. Título. IV. Série.

CDD 615.9529 (21. ed.)

© Embrapa, 2005

TRAIL, F.; MAHANTI, N.; RARICK, M.; MEHIGH, R.; LIANG, S. H.; ZHOU, R.; LINZ, J. E. Physical and Transcriptional map of an aflatoxin gene cluster in *Aspergillus parasiticus* and functional disruption of a gene involved early in the aflatoxin pathway. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC., v. 61, n. 7, p. 2665-2673, 1995.

YU, J.; WHITELAW, C. A.; NIERMAN, W. C.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E. *Aspergillus flavus* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in aflatoxin contamination of crops. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 15, n. 237, p. 333-340, 2004.

YU, J.; WOLOSHUK, C. P.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E. Cloning and characterization of *avfA* and *omtB* genes involved in aflatoxin biosynthesis in three *Aspergillus species*. **Gene**, Amsterdam, v. 248, p. 157-167, 2000.

CHU, F. S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 259, p. 291-306, 1991.

EDWARDS S. G.; O'CALLAGHAN, J.; DOBSON, A. D. W. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. **Mycological Research**, Cambridge, Inglaterra, v. 106, n. 9, p. 1005-1025, 2002.

ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. Fungal and fungal diseases of plants. In: ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. **Grain fungal diseases & mycotoxin reference**. Missouri: Grains Inspection, Parkers and Stockyards Administration, 1999. 54p.

KUSUMOTO, K. I.; YABE, K.; NOGATA, Y.; OTHA, H. Transcript of a homolog of *afIR*, a regulatory gene for aflatoxin synthesis in *Aspergillus parasiticus*, was not detected in *Aspergillus oryzae* strains. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 169, p. 303-307, 1998.

Martin, J. F. Secondary metabolites. In: KIGHORN, J. R.; TURNER, G. (Ed.). **Applied molecular genetics of filamentous fungi**. London: Blackie Academic and Professional, 1992. p. 214-252.

O'BRIAN, G. R.; FAKHOURY, A. M.; PAYNE, G. A. Identification of genes differentially expressed during aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 39, p. 118-127, 2003.

SIQUEIRA, G. C. L. (Coord.). **Castanha-do-Brasil: opções de investimento no Acre com produtos florestais não-madeireiros**. Brasília, DF: MMA: SUFRAMA: SEBRAE: GTA, 1998. 51 p. (Produtos Potenciais da Amazônia).

SHAPIRA, R.; PASTER, N.; EYAL, O.; MENASHEROV, M.; METT, A.; SALOMON, R. Detection of aflatoxin molds in grains by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC., v. 62, n. 9, p. 3270-3273, 1996.

SWEENEY, M. J.; PÀMIES, P.; DOBSON, A. D. W. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for monitoring aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* 439. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 56, p. 97-103, 2000.

Autores

Edna Maria Morais Oliveira

Eng. Quím., D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, Guaratiba, CEP 23.020-470, Rio de Janeiro, RJ, Fone (0xx21) 2410-9644. E-mail: edna@ctaa.embrapa.br

Otniel Freitas-Silva

Eng. Agrôn., M.Sc., Pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, Guaratiba, CEP 23.020-470, Rio de Janeiro, RJ, Fone (0xx21) 2410-9645. E-mail: ofreitas@ctaa.embrapa.br

Detecção de Fungos Aflatoxígenos pela PCR em Diferentes Matrizes Alimentares

A detecção de fungos aflatoxígenos em alimentos processados requer, na maioria das situações, um pré-tratamento da amostra antes da extração do DNA total. Este procedimento é importante para evitar a presença de inibidores de PCR (gorduras, carboidratos, proteínas, acidez, etc.). Sendo assim, é importante que o DNA extraído seja o mais limpo possível, ou seja, livre de inibidores, para que os resultados não sejam erroneamente considerados negativos para a presença de fungos aflatoxígenos (Edwards et al., 2002).

Referências Bibliográficas

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa n.º 9, de 24 de março de 2000. Aprova os métodos analíticos de referência para análise de micotoxinas em produtos, subprodutos e derivados de origem vegetal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 mar. 2000. Seção 9, p. 39. (seção 1).

BROWN, M. P.; BROWN-JENCO, C. S.; PAYNE, G. A. Genetic and molecular analysis of aflatoxin biosynthesis. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 26, p. 81-98, 1999.

BULLERMAN, L. B. Significance of mycotoxins to food safety and human health. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 42, p. 65-86, 1979.

CARTAXO, C.; SOUZA, J.; CORRÊA, T.; COSTA, P.; FREITAS-SILVA, O. Occurrence of aflatoxin and filamentous fungi contamination in brazil-nuts left inside the forest. In: SEMINÁRIO ANUAL ANIMAL, 2003, Havana, Cuba. **Resumos...** Cuba, 2003. 1 CD-Rom.

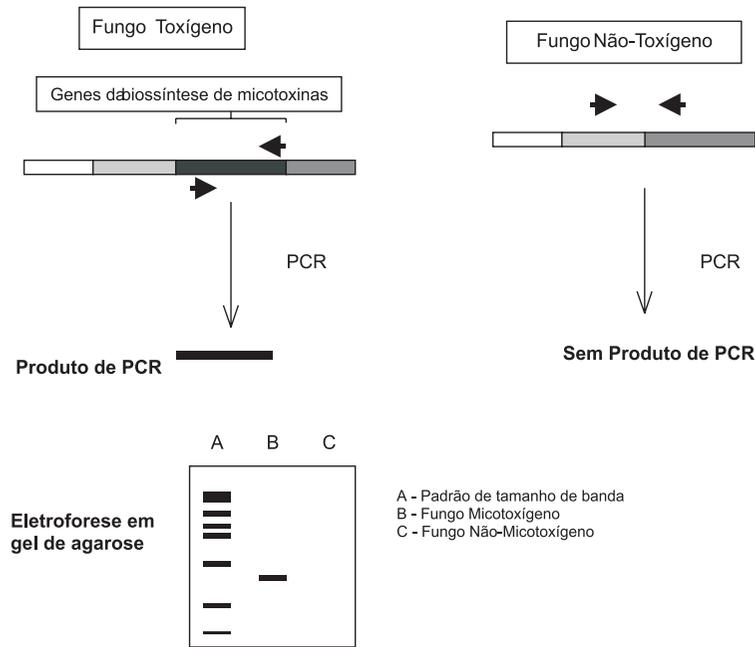


Fig. 1. Utilização da Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR) para detecção de fungos filamentosos micotóxicos

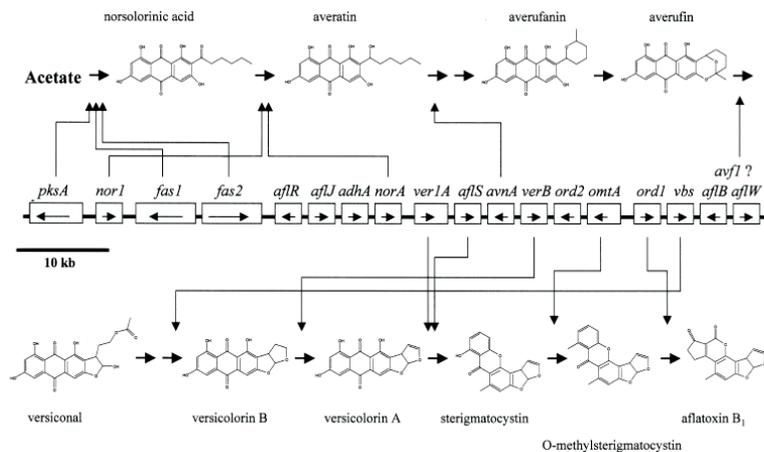


Fig. 2. Rota de biossíntese de esterigmatocistina e aflatoxina B1 em *Aspergillus flavus*.

Fonte: Edwards et al. (2002)

Apresentação

As aflatoxinas são metabólitos secundários altamente tóxicos e carcinogênicos para os animais e seres humanos. O impacto na saúde e na economia causados pela presença de aflatoxinas em produtos agrícolas tem promovido um aumento no número de estudos relacionados com a genética e com a via de biossíntese dessas micotoxinas. Diversos trabalhos têm sido realizados no sentido de desenvolver metodologias sensíveis e específicas para detecção de fungos produtores de aflatoxinas. Nesses estudos, tem sido verificada a utilização de *primers* específicos para a amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de genes codificadores de proteínas-chave da via de biossíntese, detectando especificamente fungos produtores de aflatoxina. O objetivo deste trabalho foi apresentar uma atualização das estratégias que já estão sendo realizadas para detecção de fungos filamentosos produtores de aflatoxinas, as quais utilizam a metodologia molecular: PCR.

Amauri Rosenthal

Chefe Geral da Embrapa Agroindústria de Alimentos

Detecção de Fungos Aflatoxígenos pela Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR)

Diversos trabalhos tem sido realizados no sentido de desenvolver metodologias sensíveis e específicas para detecção de fungos produtores de aflatoxinas. Nesses estudos, verificou-se que a utilização de *primers* específicos para a amplificação de genes, que codificam proteínas-chave da via de biossíntese das aflatoxinas, por PCR (DNA *Polymerase Chain Reaction*) detecta especificamente fungos produtores de aflatoxina. Isso demonstra que essa estratégia é a base para o desenvolvimento de um sistema de detecção de fungos aflatoxigênicos com maior sensibilidade e especificidade, em produtos agrícolas e alimentos em geral (Shapira et al., 1996; Kusumoto et al., 1998; Sweeney et al., 2000).

Para que o método de detecção baseado na PCR seja aplicável, os alvos para amplificação devem ser genes unívocos. Além disso, estes genes só devem estar presentes nos fungos filamentosos produtores de aflatoxinas. Dessa forma, a utilização dos *primers* permite a amplificação específica dos genes envolvidos com a via de biossíntese da micotoxina, obtendo-se amplicons (produto da PCR) de DNA de fungos produtores, enquanto a PCR de DNA de fungos não aflatoxígenos resultaria em não amplificação (Fig. 1).

Diante disso, diversos estudos foram conduzidos no que diz respeito ao conhecimento da via de biossíntese da aflatoxina (B1), na identificação de proteínas-chave e na identificação e seqüenciamento de genes que codificam tais proteínas-chave (Trail et al., 1995; Brown et al., 1999). Os principais genes expressos durante a biossíntese da aflatoxina produzida por cepas do gênero *Aspergillus* são *aflR*, *avfA*, *avfA1*, *ord-1*, *omt-1*, *ver-1*, *omtB*, entre outros (Shapira et al., 1996; Kusumoto et al., 1998; Yu et al., 2000; Sweeney et al., 2000; O'Brian et al., 2003; Yu et al., 2004). Na representação esquemática da Fig.2, destacam-se os genes envolvidos na rota de biossíntese da aflatoxina B1 e da esterigmatocistina.

Aflatoxinas

As micotoxinas pertencem a diferentes classes químicas com diferentes estruturas moleculares, como poliquetídeos, isoprenos e aminoácidos (Martin, 1992). Já foram identificadas cerca de 300 diferentes micotoxinas, mas apenas 20 destas são relevantes para a saúde humana. As principais enfermidades causadas pelas micotoxinas incluem efeitos teratogênicos, imunossupressivos, tremorgênicos, nefrotóxicos, hepatóxicos e carcinogênicos (Bullerman, 1979).

As aflatoxinas apresentam efeitos agudos e crônicos em animais e humanos. As aflatoxinas atacam primeiramente o fígado, causando necrose, cirrose e carcinomas. Não há relato da existência de animais resistentes às aflatoxinas, embora haja diferença de suscetibilidade de espécie para espécie. A aflatoxina B1 é a responsável pelos carcinomas em animais, apresentando uma forte relação com a incidência de câncer em humanos (Chu, 1991; Estados..., 1999).

A produção de aflatoxinas é potencializada pelas condições climáticas (temperatura e umidade) e de armazenamento de produtos agrícolas. Os métodos atualmente utilizados para o isolamento e identificação de fungos produtores de aflatoxinas baseiam-se em métodos convencionais através do cultivo em meios de cultura semi-seletivos/específicos para fungos aflatoxígenos. O tempo para o isolamento dos fungos é longo e a identificação demanda conhecimentos profundos em taxonomia. As análises qualitativas e quantitativas das aflatoxinas são conduzidas por cromatografia em camada fina e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), respectivamente.

Sumário

Introdução	9
Aflatoxinas	10
Detecção de Fungos Afloxígenos pela Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR)	11
Detecção de Fungos Afloxígenos pela PCR em Diferentes Matrizes Alimentares	13
Referências Bibliográficas	13

Detecção de Fungos Filamentosos Produtores de Aflatoxinas Utilizando a Reação em Cadeia DNA Polimerase (PCR)

Edna Maria Morais Oliveira

Otniel Freitas-Silva

Introdução

Nos últimos anos, a crescente preocupação com a segurança (inocuidade) de produtos agrícolas aliada à questão de saudabilidade e de utilização de métodos analíticos mais sensíveis, têm levado os países importadores a serem mais exigentes quanto à segurança dos produtos. A contaminação de grãos e alimentos, por fungos cosmopolitas, como *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* é muito comum. Esses fungos filamentosos são produtores de aflatoxinas, que são metabólitos tóxicos potencialmente carcinogênicos (Bullerman, 1979).

As culturas de amendoim, castanha do Brasil, milho, entre outras, assumem uma grande importância devido à geração de divisas para o Brasil nos mercados interno e externo, principalmente, com as exportações para a União Européia e os Estados Unidos. Atualmente, as exportações de alguns destes *commodities* estão seriamente comprometidas, pois a produção brasileira de, principalmente, castanha tem sido afetada por crescente contaminação por aflatoxinas (Cartaxo et al., 2003; Siqueira, 1998). Por outro lado, os limites admissíveis vem sendo reduzidos, demandando métodos analíticos mais sensíveis para sua quantificação. Desta forma, existe a necessidade de desenvolver metodologias mais sensíveis e específicas para a detecção e quantificação de fungos filamentosos produtores de aflatoxinas, para que os produtos consumidos nos mercados internos e exportados possam atender às exigências nacionais e internacionais cujos limites máximos de presença de aflatoxinas, estabelecidos pelo regulamento 2001/466/CE (Brasil, 2000), são de 4 ppb (sendo 2 ppb para a aflatoxina B1) e de 20 ppb de aflatoxinas total, para o Brasil.