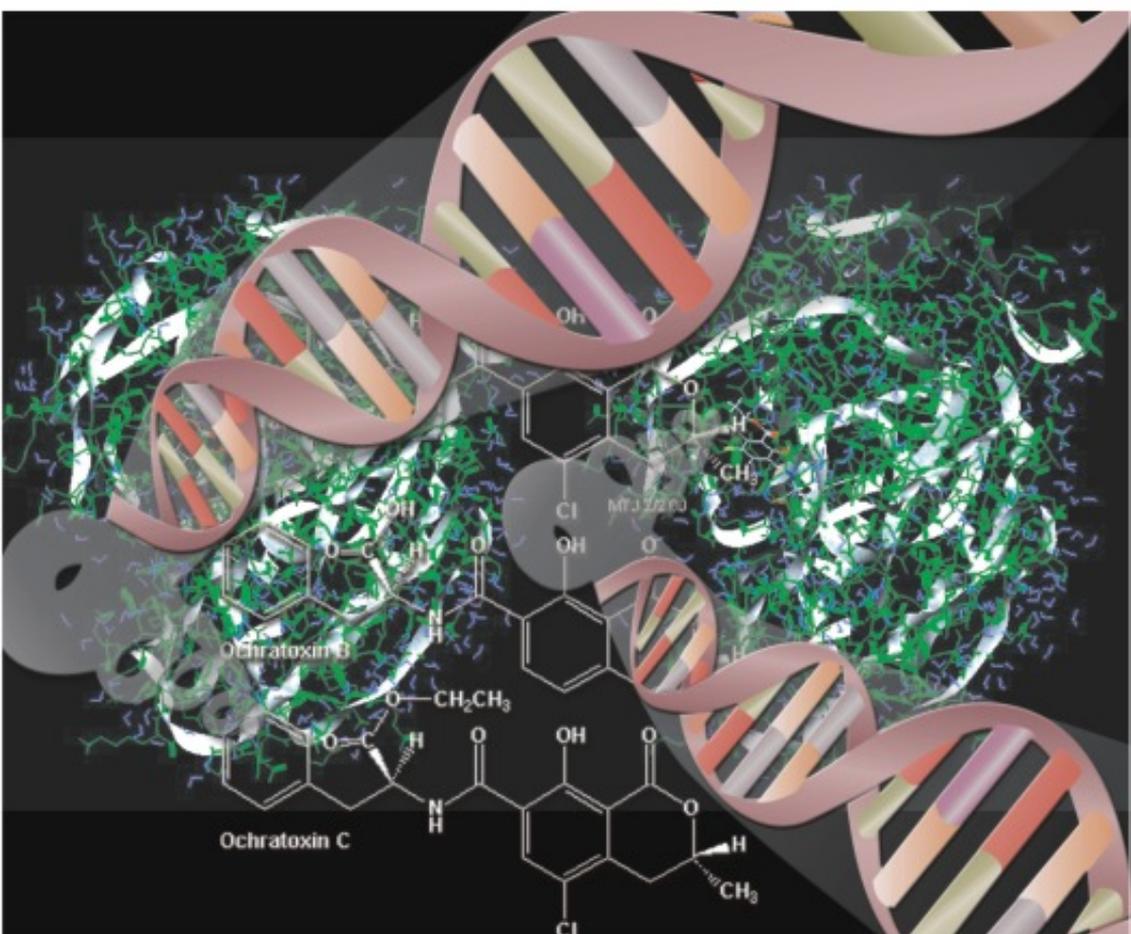


Deteção de Fungos Filamentosos Produtores de Ocratoxina Utilizando a Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR)





ISSN 0103-6068 76

Dezembro, 2006

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

Documentos 76

Detecção de Fungos Filamentosos Produtores de Ocratoxina utilizando a Reação em Cadeia da DNA Polimerase

Edna Maria Morais Oliveira
Otniel Freitas-Silva

Rio de Janeiro, RJ
2006

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: Virgínia Martins da Matta

Membros: Marcos José de Oliveira Fonseca, Márcia Nitschke, Ronoel Luiz de Oliveira Godoy e André Luís do Nascimento Gomes

Secretária: Renata Maria Avilla Paldês e Célia Gonçalves Fernandes

Supervisor editorial: André Luis do Nascimento Gomes

Revisor de texto: Comitê de Publicações

Normalização bibliográfica: Luciana Sampaio de Araújo

Foto da capa: André Guimarães de Souza

Tratamento de ilustrações: André Guimarães de Souza

Editoração eletrônica: André Guimarães de Souza

1ª edição

1ª impressão (2006): 100 exemplares

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.

Deteccção de fungos filamentosos produtores de ocratoxina utilizando a reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) / Edna Maria Morais Oliveira, Otniel Freitas-Silva. - Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2006.

15 p.; 21cm - (Embrapa Agroindústria de Alimentos. Documentos, ISSN 0103-6068; 76)

1. Fungo. 2. *Aspergillus carbonarius*. 3. *Aspergillus niger*. 4. *Aspergillus ochraceus*. 5. PCR. I. Freitas-Silva, Otniel. II. Embrapa Agroindústria de Alimentos. III. Título. IV. Série.

CDD 338.1 (21. ed.)

© Embrapa, 2006

Autores

Edna Maria Morais Oliveira

Eng. Quím., D.Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos,
Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba, CEP 23020-470,
Rio de Janeiro, RJ. Telefone: (0xx21) 2410-9644.
E-mail: edna@ctaa.embrapa.br

Otniel Freitas-Silva

Eng. Agrôn., D.Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos,
Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba, CEP 23020-470,
Rio de Janeiro, RJ. Telefone: (0xx21) 2410-9645.
E-mail: ofreitas@ctaa.embrapa.br

Apresentação

As ocratoxinas são substâncias tóxicas produzidas principalmente pelos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Os métodos convencionais para a detecção de fungos micotoxigênicos são aqueles que utilizam cultivos específicos, o que consome muito tempo e exige um profundo conhecimento em taxonomia fúngica. A classificação taxonômica pode ser simplificada pelo uso de meios seletivos, apesar do tempo necessário para a geração de resultados não ser reduzido. Os problemas relacionados ao tempo necessário para as análises podem ser superados através do uso da Reação em Cadeia da Polimerase (*PCR - Polymerase Chain Reaction*), onde se observa a redução no tempo das análises de detecção de alguns dias para algumas horas. O objetivo deste trabalho foi apresentar as novas estratégias para detecção de fungos filamentosos produtores de ocratoxinas, as quais utilizam a metodologia molecular: PCR.

Amauri Rosenthal

Chefe Geral da Embrapa Agroindústria de Alimentos

Sumário

Introdução	09
Ocratoxinas	11
Detecção de espécies fúngicas produtoras de ocratoxina A utilizando a reação em cadeia da DNA Polimerase (PCR) ...	13
Referências Bibliográficas	14

Detecção de Fungos Filamentosos Produtores de Ocratoxinas utilizando a Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR)

Edna Maria Morais Oliveira

Introdução

O Brasil lidera a produção mundial de café. Entretanto o “status” do produto brasileiro, na panorâmica mundial, não é tão expressivo quanto o seu volume de exportações. Esta situação é consequência da falta de qualidade, que pode ser revertida com maiores investimentos em pesquisa e no desenvolvimento e disseminação de novas tecnologias. Além disso, é necessário que haja um esforço concentrado para apresentar campanhas junto ao consumidor estrangeiro, enfatizando que o produto brasileiro é de boa qualidade e pode ser apreciado, a exemplo do que é realizado pela Colômbia, que investe cinco vezes mais que o Brasil em campanhas de marketing.

A produção brasileira de café é extremamente prejudicada pela incidência de ocratoxina. As ocratoxinas são substâncias tóxicas produzidas principalmente pelos fungos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium* sp, compreendendo uma família de sete substâncias, das quais a ocratoxina A (OTA) apresenta-se como contaminante de alimentos com efeitos tóxicos para os seres humanos (SOARES, 2000). A OTA é produzida sob condições diversas e, sobretudo, quando a atividade de água nos grãos de café está acima de 0,85 (OLSSON, 2000). A ação nefrotóxica e carcinogênica da OTA é a fonte de preocupação com segurança de alimentos contaminados com esta micotoxina. Consequentemente, são promovidos debates internacionais e deliberações de rígidas regulamentações, principalmente pelos países da União Européia (Harry; Mantle, 2001).

Um exame feito em consumidores médios de alimentos que são passíveis de contaminação e contribuem à exposição de OTA, levou ao estabelecimento de um TWI (Tolerable Weekly In-Take), sigla em inglês que significa ingestão semanal tolerável (IST), pelo painel de 120 ng/Kg para OTA. De acordo com o referido exame, os níveis atuais de exposição variam entre 15 e 60 ng/Kg, níveis abaixo do TWI estabelecido (European Food Safety Authority, 2006).

O café não é a principal fonte de OTA para o consumo humano, mas é o principal produto de exportação brasileira que pode apresentar altos níveis da micotoxina, gerando problemas de embargos sanitários. Desta forma, são necessárias medidas de prevenção da contaminação dos grãos de café por fungos filamentosos produtores de OTA.

Os fungos encontrados em grãos de café brasileiro são *Aspergillus niger*, *A. ochraceus* e *A. carbonarius* (Taniwaki et al., 2003; Magnani et al., 2005).

Ocratoxinas

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). Na Fig. 1 estão representadas as estruturas químicas das principais ocratoxinas (A, B e C).

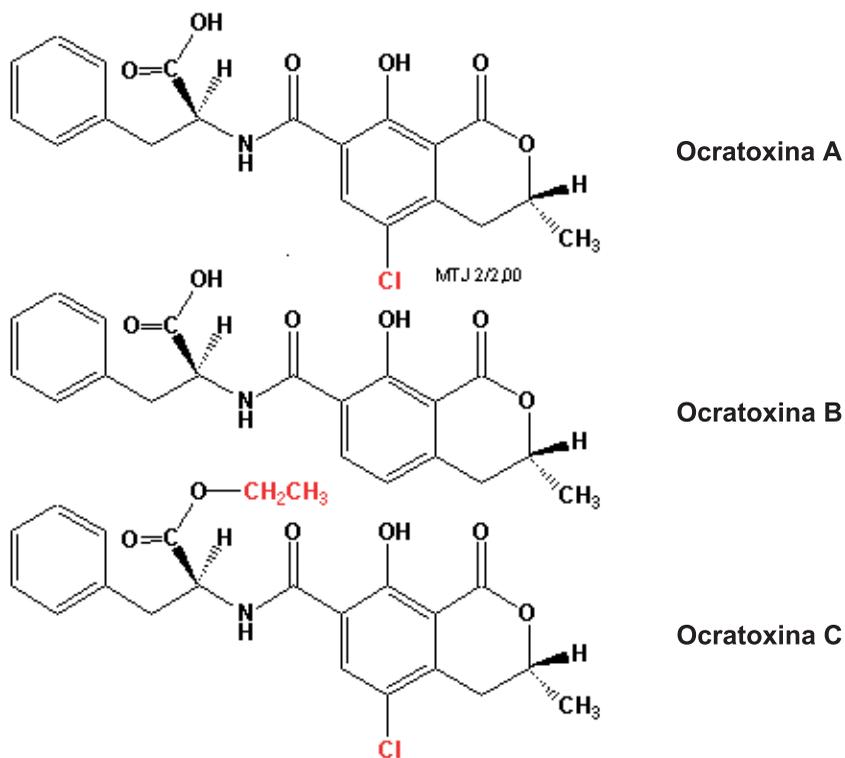


Fig. 1 . Representação das estruturas químicas das principais ocratoxinas (A, B e C).

Entre outros mecanismos de toxicidade, foi sugerido que a OTA inibe a ação da fenil-alanil-tRNA sintetase (PheRS), provocando uma redução/inibição da síntese de proteínas. A ação da OTA está representada na Fig. 2 (MC MASTERS; VEDANI, 1999).

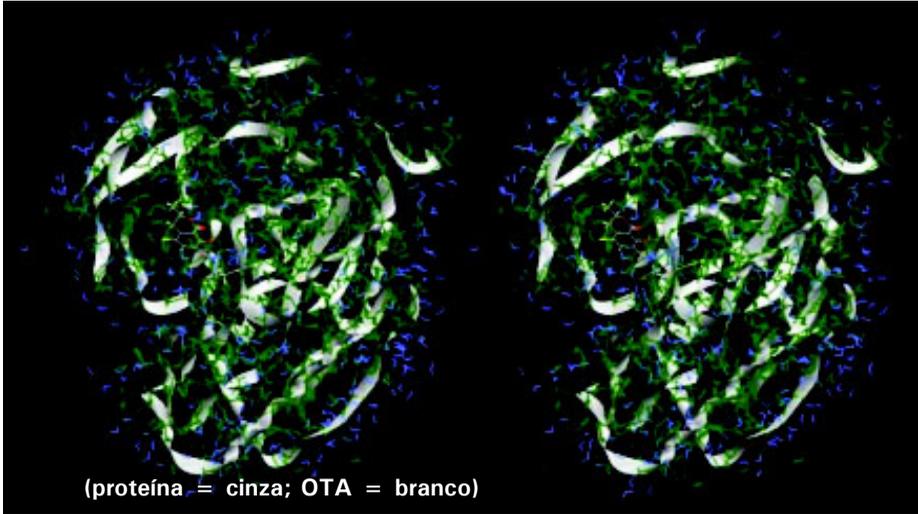


Fig. 2. Simulação da ligação da ocratoxina A com enzima fenilalanina hidroxilase (MC MASTERS & VEDANI, 1999).

Detecção de espécies fúngicas produtoras de Ocratoxina A utilizando reacção da DNA Polimerase (PCR)

A utilização de marcadores de DNA para a realização de análises de detecção, rápidas e seletivas, das espécies de *Aspergillus* produtoras de ocratoxina A presentes em café pode ser uma alternativa aos métodos convencionais. Os métodos convencionais requerem o isolamento, cultivo e seleção dos fungos filamentosos, além da necessidade de conhecimentos específicos em taxonomia. Estes marcadores foram obtidos através da caracterização molecular das três principais espécies produtoras da micotoxina, utilizando RAPD (Random Amplified Polymorphism) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Com isso, recentemente, foram definidas seqüências de "primers" específicos para a detecção por PCR de *Aspergillus carbonarius*, *A. ochraceus* e *A. niger* (FUNGARO et al., 2004; PATIÑO; GONZÁLEZ-SALGADO; GONZÁLEZ-JAÉN, 2005; SCHMIDT et al., 2003; SCHMIDT et al., 2004; SARTORI et al., 2006).

Sartori et al. (2006) estabeleceram condições para a aplicação de PCR Multiplex com o objetivo de detectar as três espécies de *Aspergillus* com maior potencial para a produção de ocratoxina A. A aplicação de PCR-Multiplex permite a amplificação de mais de uma seqüência-alvo em uma só reação, com a presença de dois ou mais pares de oligonucleotídios iniciadores. Esta abordagem diminui o tempo e número de reações (tubos), além da possibilidade de detectar diferentes espécies de fungos filamentosos presentes em uma amostra (Fig. 3).

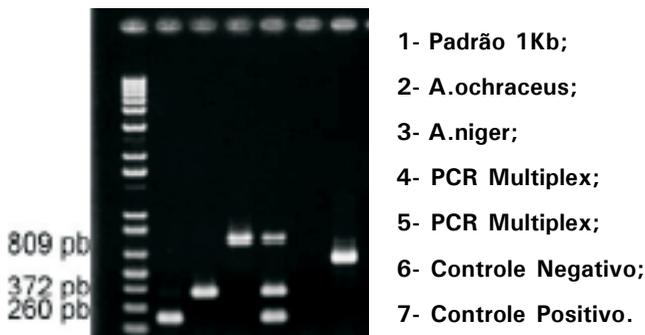


Fig. 3. Produtos de amplificação usando DNA de diferentes espécies de *Aspergillus*.

Referências Bibliográficas

- BULLERMAN, L. B. Significance of mycotoxins to food safety and human health. **Journal of Food Protection**, v. 42, p. 65-86, 1979.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **EFSA evaluates ochratoxin A in food and derives a Tolerable Weekly Intake**: press release. Parma, jun. 2006. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/press_room/press_release/1525.Par.0002.File.dat/pr_contam_ota_en1.pdf>. Acesso em: 24/10/2006.
- FUNGARO, M. H. P.; VISSOTTO, P. C.; SARTORI, D.; VILAS-BOAS, L. A.; FURLANETO, M. C.; TANIWAKI, M. H. A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* in coffee beans. **Current in Microbiology**, v. 65, p. 39-44, 2001.
- HARRIS, J. P.; MANTLE, P. G. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 709-716, 2001.
- MC MASTERS, D. R.; VEDANI, A. Ochratoxin binding to phenylalanyl-tRNA synthetase: computational approach to the mechanism of ochratoxicosis and its antagonism. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 16, p. 3075 -3086, 1999.
- MAGNANI, M.; FERNANDES, T.; CAVENAGHI, C. E.; HOMECHIM, M.; ONO, E. Y. S.; VILAS-BOAS, L. A.; SARTORI, D.; FURLANETO, M. C.; FUNGARO, M. H. P. Molecular identification of *Aspergillus spp.* isolated from coffee beans. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 1, p. 45-49, 2005.
- 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.

OLSSON, J. **Modern methods in cereal grain mycology**. 2000. 37 f. Thesis (Doctoral) – Department of Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

PATIÑO, B.; GONZÁLEZ-SALGADO, A.; GONZÁLEZ-JAÉN, M. T. PCR detection assays for the ochratoxin-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, p. 207-214, 2005.

SARTORI, D.; FURLANETO, M. C.; MARTINS, M. K.; DE PAULA, M. R. F.; PIZZIANI-KLEIMER, A. A.; TANIWAKI, M. H.; FUNGARO, M. H. P. PCR method for detection of potential ochratoxin-producing *Aspergillus* species in coffee beans. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 350-354, 2006

SCHMIDT, H.; EHRNANN, M.; VOGEL, R. E.; TANIWAKI, M. H.; NIESSEN, L. Molecular typing of *Aspergillus ochraceus* and construction of species specific SCAR-primers based on AFLP. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 138-146, 2003.

SCHMIDT, H.; TANIWAKI, M. H.; VOGEL, R. E.; NIESSEN, L. *Aspergillus ochraceus* and construction of species specific SCAR-primers based on AFLP: utilization of AFLP markers for PCR-based identification of *Aspergillus carbonarius* and indication of its presence in green coffee samples. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 899-909, 2004.

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**, v. 82, p. 173-179, 2003.



Agroindústria de Alimentos

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

