



## Avaliação do crescimento de *Aspergillus ochraceus* e produção de ocratoxina A

### Evaluation of the growth and toxigenicity of *Aspergillus* sp.

Bruna Sgrott<sup>1</sup>, Elisabete Hiromi Hashimoto<sup>2</sup>

#### RESUMO

*Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. são os gêneros mais comuns produtores de ocratoxina A (OTA), micotoxina encontrada em alimentos que possui efeitos carcinogênicos, imunossupressores, nefrotóxicos e teratogênicos. O estudo teve como objetivo investigar o crescimento e a toxigenicidade de *Aspergillus ochraceus* produtor de OTA para servir de insumo para posteriores estudos de controle biológico. A produção de OTA foi confirmada em meio de cultura (Ágar Coco) após extração e análise por cromatografia em camada delgada (CCD). Também foram avaliados os meios de cultivo com adição de Cloreto de Sódio ou Glicose para o estudo do crescimento e esporulação do fungo em diferentes condições. O meio Ágar Coco apresentou maior produção de OTA. O meio Yeast Extract Sucrose (YES) demonstrou maior potencial de crescimento, enquanto o meio Ágar Batata Dextrose (BDA) com adição de cloreto de sódio apresentou maior produção de esporos. A variação na concentração dos aditivos com potencial de indução ou inibição de crescimento oferece possibilidades para o estudo de controles biológicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Aspergillus*; crescimento; micotoxina; ocratoxina A; toxigenicidade.

#### ABSTRACT

*Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. are the most common genus producing ochratoxin A (OTA), a mycotoxin found in food that has carcinogenic, immunosuppressive, nephrotoxic, and teratogenic effects. The aim of the study was to investigate the growth and toxigenicity of OTA-producing *Aspergillus ochraceus* to serve as input for further biological control studies. OTA production was confirmed in culture media (Coconut Agar) after extraction and analysis by thin layer chromatography (SLC). Culture media with added Sodium Chloride or Glucose were evaluated to study the growth and sporulation of the fungus under different conditions. The Coconut Agar medium showed the highest production of OTA. Yeast Extract Sucrose (YES) medium showed greater growth potential, while Potato Dextrose Agar (BDA) medium with added sodium chloride showed greater spore production. The variation in the concentration of additives with the potential to induce or inhibit growth offers possibilities for the study of biological controls.

**KEYWORDS:** *Aspergillus*; growth; mycotoxin; ochratoxin A; toxigenicity.

## INTRODUÇÃO

As micotoxinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular produzidos por fungos toxigênicos, que afetam a saúde em humanos e animais. São encontradas nos produtos da agricultura como cereais, café, cacau, especiarias e frutas, incluindo também seus derivados como sucos, fermentados e desidratados. São produzidas por pelo menos cinco gêneros de fungos conhecidos: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Claviceps* sp. e *Alternaria* sp. Entre as toxinas, a ocratoxina A (OTA), produzida por cepas de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. apresenta efeitos carcinogênicos, imunossupressores, nefrotóxicos e teratogênicos (MAZIERO et al, 2010).

<sup>1</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. E-mail: bsgrott@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 6499732381501402.

<sup>2</sup> Docente no Curso de Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. E-mail: elisabete@utfpr.edu.br. ID Lattes: 2913931020821513.



Este composto pertence a um grupo de similares, denominadas ocratoxinas (A, B e C), que apresentam uma  $\beta$ -fenilalanina ligada a uma isocumarina por ligação amida. Diferentemente das outras ocratoxinas, OTA apresenta fluorescência verde e uma molécula de Cloro no radical R1, responsável pelo seu caráter tóxico. Também possui solubilidade em solventes orgânicos polares e emite adsorção UV (DUARTE, 2010). Devido à sua molécula, a OTA tem como característica uma alta estabilidade térmica, conferindo resistência a tratamentos desse tipo. Por isso, tende a permanecer facilmente em alimentos contaminados e estocados, sendo recuperada em até 45% após três meses de armazenamento. Esse fato dificulta a remoção da toxina de alimentos e bebidas, sendo a melhor saída a prevenção da formação das toxinas, permitida pelo controle da proliferação fúngica (KRUGER, 2006).

As condições de clima em um território são definitivas na gama de espécies de fungos que irão crescer e as toxinas que irão produzir. O Brasil, por sua extensão territorial e abrigo de diversos ecossistemas, traz condições propícias suficientes para o crescimento de todo tipo de espécie toxigênica (MAZIERO et al, 2010). Tal fato traz a necessidade nacional de estudo e entendimento das espécies produtoras de micotoxinas como o *Aspergillus* sp., e desenvolvimento de formas de controle específicas, sejam físicas, químicas ou biológicas. Apesar da popularidade dos controles químicos, os biológicos surgem como uma alternativa mais específica, efetiva e sustentável, permitindo uma maior preservação do produto final (ABRUNHOSA et al, 2010).

Portanto, esse trabalho teve como objetivo o estudo do crescimento e toxigenicidade do *Aspergillus* sp. produtor de ocratoxina A, a fim de servir de insumo para estudos subsequentes de controle biológico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### REATIVAÇÃO E ISOLAMENTO

A origem do fungo testado é a cepa de *Aspergillus ochraceus* A152, conservada em Ágar Batata Dextrose (BDA 39 g/L). Para a reativação, uma alçada foi inoculada em tubos de ensaio com Caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI 37g/L), e incubados em estufa tipo BOD à 25°C por 7 dias. Observado o crescimento pela turvação, uma alíquota obtida por alça de Drigalski foi inoculada por esgotamento em placas de Petri com meio BDA e incubadas em estufa BOD por 7 dias.

Para o isolamento, colônias foram selecionadas de acordo com a morfologia nas placas BDA para prosseguir com a semeadura por esgotamento em placas com BDA e Ágar Coco, que foram incubadas em estufa por 7 dias à 25 °C.

### TESTE DE TOXIGENICIDADE

Para a extração de ocratoxina A (OTA) o conteúdo das placas de Petri contendo meio de cultura BDA (amostras A e B) e Ágar Coco (amostras C e D) e colônias de *A. ochraceus* foram transferidas para béqueres de 1L, o material foi triturado até a e homogeneizado. Em seguida, foram adicionados 90 mL de metanol e 10 mL de cloreto de potássio 4% (m/v) e homogeneizado. O material foi filtrado em papel de filtro e coletou-se 50 mL de filtrado. Atingido esse volume, foi adicionado 7 g de terra diatomácea e 50 mL de



sulfato de amônio 30% e homogeneizado. Essa solução passou pela segunda filtração em mesmo aparato de filtração, coletando-se 50 mL de filtrado.

A última etapa da extração foi a separação. No uso do funil de separação foram adicionados os 50 mL do filtrado da fase anterior, 50 mL de água destilada e 10mL de clorofórmio. Após agitação por 3 minutos, deixou-se o funil em repouso até observação da separação das fases, cuja inferior (clorofórmica) foi recolhida em 5 mL em um Erlenmeyer de 50 mL. O processo foi repetido, totalizando 10 mL de fração clorofórmica. O extrato foi seco em banho-maria a 50 °C até evaporação total.

Para a visualização por cromatografia de camada delgada, inicialmente foi preparada uma placa cromatográfica (sílica gel 60) com identificação de cada amostra (A, B, C e D) e padrão comercial da toxina. Os extratos foram dissolvidos com 0,2 mL de clorofórmio e um volume de 0,005 mL foi aplicado na placa cromatográfica. Após toda a transferência de volume por capilaridade para a placa cromatográfica, essa foi inserida com a fase móvel em cuba de vidro. Após a corrida da fase móvel, a placa foi analisada em câmara escura com lâmpada UV de 365 nm ao lado de uma placa cromatográfica com padrão comercial da Ocratoxina A.

## AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO EM DIVERSOS MEIOS DE CULTURA

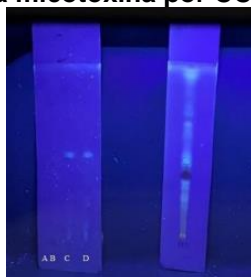
A fim de avaliar meios de cultura com maior potencial para esporulação e facilitação da identificação da toxigenicidade durante o teste de toxigenicidade, foi estudado o crescimento da cepa de *A. Ochraceus* em diversos meios de cultura. Os meios escolhidos foram Yeast Extract Sucrose (YES), BDA com adição de Glicose (100 g/L) e BDA com adição de Cloreto de sódio (20 g/L), sugeridos pela literatura por Souza (2014) e Wang (2020). Placas com BDA sem adições foram inoculadas para padrão. A partir do fungo preservado em placas com BDA, foi retirada uma alíquota com alça de platina e realizada uma semeadura por esgotamento em triplicata em placas com cada um dos quatro meios escolhidos. As placas foram levadas à estufa e o crescimento das colônias foi observado após 7 dias à 25 °C.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### TESTE DE TOXIGENICIDADE

A análise qualitativa por cromatografia de camada delgada é feita a partir da comparação visual da intensidade da fluorescência entre amostra e padrão. O resultado do teste de toxigenicidade da cepa estudada pode ser observada na Figura 1, com a visualização da corrida dos compostos da fase móvel pela placa cromatográfica:

Figura 1 – Detecção da micotoxina por CCD em luz UV (365 nm)





Fonte: Autoria própria.

Entre as quatro amostras (A, B, C e D), as duas últimas demonstraram fluorescência verde similar à apresentada pelo padrão comercial de OTA. Uma possível explicação é o meio de cultura em que as amostras positivas foram propagadas (Ágar Coco) ter colaborado para a detecção da toxina. Lin & Dianese (1976) estudaram a relação da fluorescência de *Aspergillus* sp. em Ágar Coco e propuseram um possível teste rápido relacionado.

Mesmo com a determinação da característica produtora de OTA, é essencial realizar a confirmação dessa condição a partir de outros testes mais específicos, já se trata de um teste de confirmação meramente qualitativo. Outros metabólitos relacionados podem ser fluorescentes, causando interpretações erradas. Um exemplo disso é a ocratoxina C, que também apresenta fluorescência verde similar à A (BOZZA, 2010). Portanto, análises específicas são necessárias para trazer a distinção entre metabólitos e determinar as linhagens produtoras de toxinas.

## AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO EM DIVERSOS MEIOS DE CULTURA

Dentre os meios de cultura testados, a amostra que teve maior crescimento de hifas foi a inoculada em meio YES. Por se tratar de um meio sintético formulado, esse favorece o crescimento e biossíntese de OTA. É constituído de sacarose, e sua rápida e fácil metabolização pode explicar o alto crescimento (SOUZA, 2014).

Figura 2 – Colônias de *A. ochraceus* em meio de cultura YES após incubação



Fonte: Autoria própria.

Em relação à esporulação, a amostra inoculada em meio BDA com adição de Cloreto de sódio apresentou a maior produção de esporos, apresentando também um crescimento em grau semelhante às amostras em YES. Comparada com as placas controle sem adição de Cloreto de sódio, houve também um maior crescimento e distribuição pela placa.

Wang (2018) afirma que os fungos dos gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. sobrevivem melhor à ambientes com uma rica oferta de açúcares como a sacarose, mas ao se encontrarem em locais com uma alta quantidade de solutos, utilizam da via metabólica das ocratoxinas como uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo. Em outro estudo realizado por Wang (2020), foi avaliado diversas concentrações de Cloreto de sódio e a influência no crescimento e esporulação de *A. Ochraceus*, sendo 40,3% e 61,4% maior que um controle sem Cloreto de sódio, respectivamente. Porém, foi observado que em concentrações maiores que 100 g/L, o crescimento foi inibido e maiores que 60 g/L, a esporulação reduziu drasticamente.



Figura 3 – Colônias de *A. Ochraceus* em meio de cultura BDA sem adição de Cloreto de Sódio e com Cloreto de Sódio após incubação



Fonte: Autoria própria.

As amostras inoculadas em meio BDA com adição de Glicose tiveram um comportamento semelhante em relação ao crescimento, comparadas com as placas de BDA sem Glicose. No artigo de Wang (2020), foi estudado a adição de Glicose e a influência em crescimento, apresentando um aumento de 81,4% na mesma concentração adicionada (100 g/L). Porém, nenhuma concentração de glicose testada foi capaz de inibir o crescimento e esporulação do fungo.

Figura 4 – Colônias de *A. Ochraceus* em meio de cultura BDA sem Glicose e com Glicose após incubação



Fonte: Autoria própria.

De acordo com Kupski (2015), a produção de metabólitos secundários é considerada condicionada por crescimento micelial e esporulação, porém afirma que mais estudos são necessários para confirmar relações diretas entre elas.

## CONCLUSÕES

Os métodos aplicados garantiram o isolamento e replicação da cepa de *Aspergillus ochraceus*, além de criar o ambiente favorável para a detecção de ocratoxina. A partir do teste de toxigenicidade, pode-se afirmar a produção de OTA pela cepa A152. Dentre os meios de cultura avaliados, o meio YES demonstrou maior potencial para crescimento, porém o potencial de indução ou inibição do crescimento e esporulação do fungo a partir da variação na concentração de Cloreto de Sódio e Glicose traz maiores possibilidades para o estudo de controles biológicos para o *A. ochraceus*.

## Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR.



## Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

ABRUNHOSA, L. et al. Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. **Toxins**, v. 2, n. 5, p. 1078-1099, 2010.

BOZZA, A. Detecção e Quantificação de Ocratoxina A produzida por espécies de *Aspergillus* isoladas de grãos de café. 2010. 144 f. Dissertação de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

DUARTE, T. L. Ocratoxina A em alimentos e bebidas: uma revisão bibliográfica. 2010. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

LIN, M. T.; DIANESE, J. C. A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, v. 66, n. 12, p. 1466-1469, 1976.

KRUGER, C. D. Ocratoxina A em suínos abatidos no Estado do Rio de Janeiro sob Inspeção Sanitária. 2006. Tese (Pós-Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2006.

KUPSKI, L. Degradação de Ocratoxina A: estudo de processo e toxicidade. 2015. 184 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.

MAZIERO, M. T. et al. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista brasileira de produtos agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 89-99, 2010.

SOUZA, S. C. de. Crescimento de *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* e produção de ocratoxina A em meio de cultura sintético e a base de produtos agrícolas. 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

WANG, Y. The Influence of NaCl and Glucose content on Growth and Ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* and *Penicillium nordicum*. **Toxins**, v. 12, n. 8, p. 515, 2020.

WANG, Y. A Consensus Ochratoxin Biosynthetic Pathway: Insights from the Genome Sequence of *Aspergillus ochraceus* and a Comparative Genomic Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 89, n. 19, set. 2018.