

# Estudo do Efeito da Pectina Cítrica na Produção de Micotoxinas por *Aspergillus niger* URM3856



## Resumo:

A pectina é um carboidrato presente na parede dos vegetais, em especial a lamela média, que confere rigidez a sua estrutura. É amplamente utilizada na indústria de alimentos como aditivo alimentar. Este trabalho objetivou avaliar o efeito da pectina cítrica na produção das aflatoxina e ocratoxina A produzida por *Aspergillus niger* URM3856 durante o processo de crescimento e esporulação. O fungo foi cultivado em meio Czapek contendo 1% de pectina cítrica. O controle foi realizado sem a pectina. A produção de aflatoxina foi verificada inoculando o fungo em meio MAC (ágar-coco) com observação de fluorescência por raios UVA. A ocratoxina 'A' foi verificada através da mudança de cor por vapor de amônia nos meios batata-dextrose-ágar (BDA), MAC e extrato de levedura-sacarose (YES) durante um período de 7 dias. O estudo mostrou que *Aspergillus niger* URM3856 é produtor apenas de aflatoxina e que a adição de 1% de pectina cítrica no meio de crescimento inibiu a produção da micotoxina durante o período observado. Entretanto o fungo foi repicado novamente em meio czapek na ausência de pectina cítrica onde foi observado que o mesmo voltou a apresentar aflatoxina. Assim o presente trabalho mostrou que a pectina cítrica é uma alternativa para prevenir a contaminação de micotoxinas produzidas por *A. niger* URM3856 em alimentos.

## Abstract:

Pectin is a carbohydrate present in the plant wall, in particular the middle lamellae, rigidifying its structure. It is widely used in the food industry as a food additive. This study evaluated the effect of citrus pectin in the production of aflatoxin and ochratoxin A produced by *Aspergillus niger* URM3856 during the process of growth and sporulation. The fungus was grown in Czapek medium containing 1% citrus pectin. The control was made without pectin. The production of aflatoxin was checked by inoculating the fungus among MAC (agar-coconut) with observation fluorescence by UVA rays. Ochratoxin A was checked by changing color by steam of ammonia in the potato dextrose agar medium (PDA), MAC and Yeast extract sucrose (YES) over a period of 7 days. The study showed that *Aspergillus niger* URM3856 producer only aflatoxin, and the addition of 1% of citrus pectin in the growth medium inhibited the production of mycotoxins during the observed period. However, the fungus was peaked again amid Czapek in the absence of citrus pectin where it was observed that the same again showed aflatoxin. Thus the present study showed that the citrus pectin is an alternative to prevent contamination of mycotoxins produced by *A. niger* URM3856 in food.

**Jonatas Carvalho Silva<sup>1</sup>,  
Osmar Soares Silva<sup>1</sup>,  
Ellyda Thamirys de Lima Pereira<sup>1</sup>,  
Maria Eugênia Meliano Medeiros  
Souto<sup>1</sup>,  
Tatiana Souza Porto<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Graduando em Engenharia de Alimentos, pela Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE – Unidade Acadêmica de Garanhuns –UAG, Avenida Bom Pastor, s/n, Boa Vista - CEP: 55292-270.

<sup>2</sup> Professora da Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Avenida Bom Pastor, s/n, Boa Vista - CEP: 55292-270 - Garanhuns/PE. E-mail: portots@yahoo.com.br

Contato principal:

**Tatiana Souza Porto<sup>2</sup>**



**Palavras chave:** Aflatoxina, Ocratoxina 'A' e Pectina  
**Keywords:** Aflatoxin, Ochratoxin 'A' and Pectin



## INTRODUÇÃO

A pectina é um polissacarídeo constituinte da parede celular de plantas dicotiledôneas, responsável pela adesão entre as células e pela resistência mecânica da parede celular. A protopectina, de natureza insolúvel, é facilmente hidrolisada por aquecimento, em meio ácido, formando pectina (MUNHOZ; SANJINEZ-ARGANDOÑA; SOARES-JÚNIOR, 2010).

Sendo que a produção de enzimas pectinolíticas para fins industriais são feitas a partir de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* e os níveis de atividades destas enzimas são dependentes das fontes de carbono e demais condições de fermentação. Sendo que alguns *Aspergillus* são produtores de micotoxinas (BUENO; PERES; GATTÁS, 2005; MARTINEZ et al., 2014)

Além da influência direta na qualidade, promovida pela ação de fungos, as micotoxinas são metabólitos secundários altamente nocivos à saúde do homem e que não possuem imunogenicidade. Dentre os fatores que favorecem o desenvolvimento fúngico destacam-se temperatura, umidade relativa, conteúdo de umidade, predomínio de linhagens toxigênicas, composição do substrato e competição microbiana (MARTINEZ et al., 2014).

Os alimentos e rações podem estar contaminados por micotoxinas de forma direta ou indireta. A contaminação indireta ocorre quando um ingrediente qualquer foi previamente contaminado por um fungo toxigênico, mesmo que este tenha sido eliminado durante o processamento, as micotoxinas ainda permanecerão no produto final (FREIRE et al., 2007).

A pectina é considerada um adsorvente orgânico de micotoxinas na indústria de ração. Uma vez que, um substrato com ampla capacidade de ligação irá assegurar que pelo menos uma fração das micotoxinas se tornará não biodisponível e as micotoxinas biodisponíveis estarão abaixo do limiar de atividade biológica. Ampla capacidade de um agente ligante de ligar-se ao substrato irá minimizar o potencial de sinergia toxicológica entre as micotoxinas (KNOWMYCOTOXINS, 2015; BRASIL, 2009; CASTRO, 2014).

Diante da importância de se conhecer a produção de micotoxinas por fungos filamentosos de interesse biotecnológico, várias técnicas são utilizadas para a determinação da toxina, como os métodos

qualitativos em placas: ágar coco e vapor de amônia, assim como por cromatografias de baixa e alta resolução. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi observar o efeito da pectina como adsorvente na produção de micotoxinas por *Aspergillus niger* URM3856.

## MATERIAL E MÉTODOS

### a) Micro-organismo

O micro-organismo *Aspergillus niger* URM3856, foi obtido da coleção de cultura da Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco e mantido em tubos inclinados em óleo mineral e reativados em Frascos Erlenmeyers 125mL contendo 50mL de meio de cultura composto de pectina 1%, peptona 1%, glicose 2% e extrato de levedura 0,3%. O controle foi realizado contendo o meio na ausência de pectina. O crescimento ocorreu durante 72h, 120 rpm a 30°C. Os esporos foram coletados com a adição de 3 mL de solução de NaCl (0,9%) e Tween 80 (0,01% v/v) previamente esterilizados. O fungo foi inoculado em Erlenmeyers 125mL contendo meio de cultura Czapek enriquecido com pectina 1% incubado a 30°C por 7 dias em estufa. O controle foi inoculado no meio Czapek sem adição de pectina.

### b) Detecção de produção de micotoxina baseado no teste ágar-coco.

A detecção de aflatoxina produzida por *Aspergillus niger* URM3856 foi determinada conforme o método descrito por Lin e Dianese, (1976). Utilizou-se o meio Ágar coco (MAC). O meio MAC foi preparado com leite de coco (SOCOCO®). O pH do meio foi ajustado para 6,9 com NaOH 2 mol/L. O meio foi autoclavado por 20 minutos a 120°C e distribuído em placas de Petri estéreis. O centro da placa foi inoculado com 5µL de suspensão de esporos e incubado em ausência de luz a 30 °C durante 3 e 7 dias.

A detecção de aflatoxina foi verificada observando-se no reverso da colônia a presença de um halo fluorescente azulado a violeta nas placas contendo o *A. niger* URM3856, crescido em meio MAC quando submetidos a luz ultravioleta UV-A 365nm em Câmara escura.

### c) Detecção de produção micotoxina baseado no teste Vapor de Amônia.

A detecção de Ocratoxina 'A' foi determinada conforme o método proposto por Saito e Machida (1999). Foram utilizados os meios MAC (conforme o item 2.3), Batata Dextrose Ágar (BDA), e meio YES (2% de extrato de levedura, 20% de sacarose e 2% de Ágar). Após 3 e 7 dias foram vertidas nas placas 5 mL de uma solução hidróxido de amônio (20%). Foi observado mudança da coloração no reverso da colônia de rosa para vermelho após 10 min de reação para o fungo produtor de toxinas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para a verificação do efeito adsorvente da pectina cítrica sobre a produção de aflatoxina por *Aspergillus niger* URM3856 estão representados na Figura 1. Após 3 dias de incubação o tratamento controle sem adição de pectina na reativação e no repique começou a apresentar uma coloração fluorescente azulada no reverso da placa. Isto demonstrou que *Aspergillus niger* URM3856 foi produtor de micotoxina. Entretanto o tratamento que utilizou pectina cítrica a 1% inibiu a produção de aflatoxina (Figura 1A). Isto também foi observado após 7 dias de incubação. *Aspergillus niger* URM3856 não apresentou aflatoxina no tratamento com adição de 1% de pectina cítrica durante o cultivo (Figura 1D).

Várias substâncias têm sido descritas pela literatura como inibidor de micotoxinas, por exemplo, cafeína (BUCHANAN e LEWIS, 1984),  $\alpha$  e  $\beta$ -carotenos (NORTON, 1997), biflavanóides (SAKUDA et al. 2000), ácido gálico (MAHONEY e MOLYNEUX; 2004) e etileno (ROZE et al. 2004), dentre outras. Entretanto estudos com pectina cítrica se restringem apenas a utilização como aditivos alimentares em produtos já contaminados por micotoxinas reduzindo a sua absorção pelo trato gastrointestinal (VAN SOEST, ROBERTSON e LEWIS, 1991; TAMURA et al. 2013).

Assim, além de ser utilizada como aditivo alimentar, na diminuição da biodisponibilidade de micotoxinas em alimentos contaminados no trato gastrointestinal, a pectina pode também ser utilizada para prevenir a contaminação por micotoxinas.

Como pode ser observado na Figura 1(B) os controles apresentaram maior esporulação a medida que o tratamento com 1% de pectina praticamente não esporulou. De acordo com Calvo et al. (2002) metabólitos secundários são comumente associados com esporulação dos fungos e que micotoxinas são

secretados pelas colônias a medida que ocorre a esporulação.

De acordo com a Figura 2, *Aspergillus niger* URM3856 não é produtor de ocratoxina 'A', pois não apresentou coloração avermelhada após reação com a solução de amônia 20% em 7 dias de incubação. Segundo Maziero e Bersot (2010) diferentes espécies de fungos podem produzir um mesmo tipo de micotoxina, como também, uma única espécie de fungo pode produzir mais de um tipo de toxina. Perrone et al. (2006), Esteban et al. (2014) e Tjamos et al. (2004) verificaram que várias cepas de *Aspergillus niger* são produtoras de ocratoxina A. Algumas espécies do gênero *Aspergillus* podem não produzir aflatoxina e ocratoxina simultaneamente.

Fraga et al. (2007) estudaram a produção de aflatoxinas e ocratoxinas por 5 espécies de *Aspergillus*, e observaram que *Aspergillus candidus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus chevalieri*, produziram apenas aflatoxinas enquanto que o *Aspergillus melleus* expressou apenas ocratoxina. Igualmente encontrado por este trabalho.

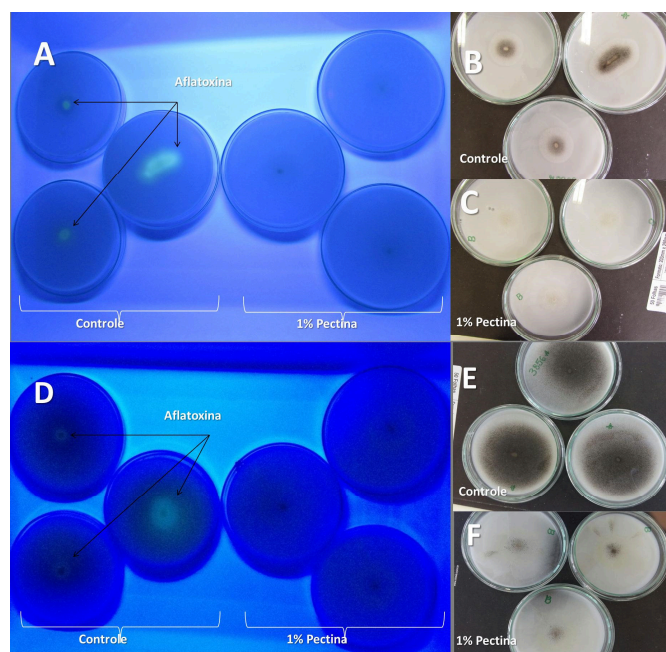


Figura 1. Produção de aflatoxina por *Aspergillus niger* URM3856. (A) verificação após 3 dias de incubação sob raios UV, (B) controle após 3 dias, (C) teste com 1% de pectina após 3 dias. (D) verificação após 7 dias de incubação sob raios UV, (E) controle após 7 dias, (F) teste com 1% de pectina após 7 dias

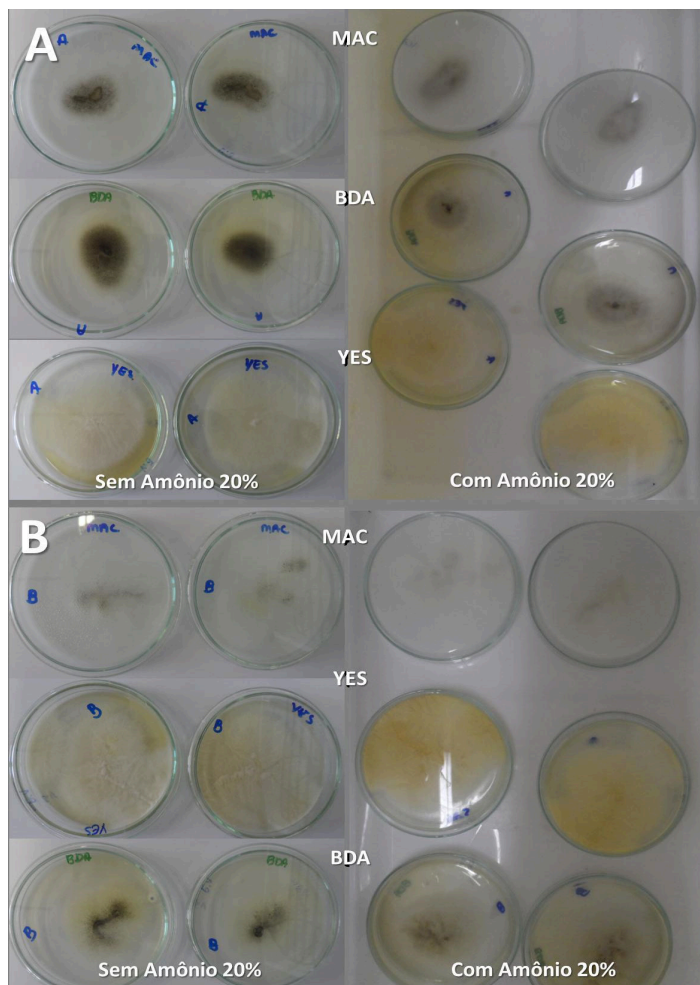


Figura 2. Produção de ocratoxina 'A' por *Aspergillus niger* URM3856. (A) verificação após 3 dias de incubação e (B) após 7 dias de incubação a 30°C

Quando *Aspergillus niger* URM3856 foi inoculado novamente no meio Czapek com pectina 1% para a produção de micotoxina, foi observado a presença da toxina como mostra a Figura 3.

Isso mostrou que o micro-organismo ainda produziu a aflatoxina, entretanto, o meio contendo pectina cítrica diminuiu sua biodisponibilidade no meio. Produção de aflatoxinas é grandemente afetada pela identidade e concentração de fontes de carbono disponíveis (LUCHESE e HARRIGAN, 1993).

Segundo Holmes, Boston e Payne (2008) a maioria dos inibidores da biossíntese aflatoxina atua em um dos três níveis: alteram o ambiente fisiológico ou outras entradas de sinalização percebidas pelo fungo, interferem nas redes de transdução de sinal de regulação e expressão do gene a montante da biossíntese de aflatoxina, ou bloqueiam a atividade enzimática de uma enzima de biossíntese.

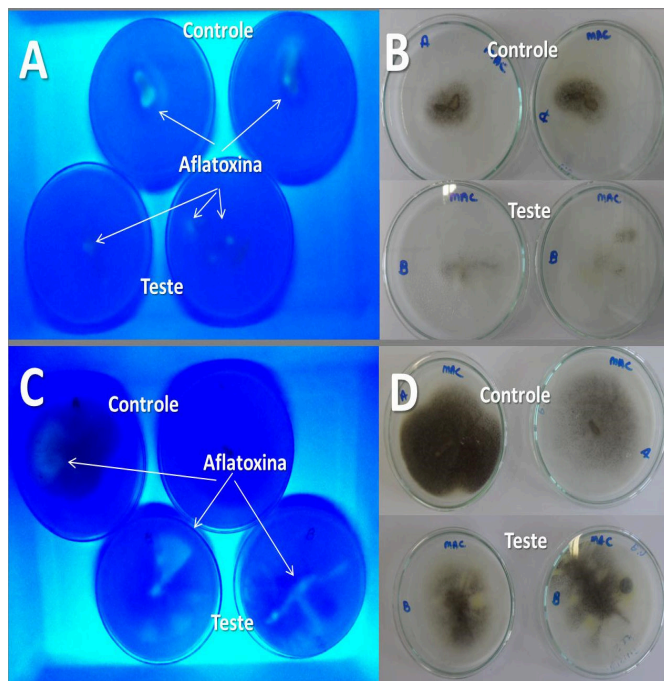


Figura 3: Segundo teste de presença da aflatoxina produzida por *Aspergillus niger* URM3856. (A e B) verificação após 3 dias e (C e D) após 7 dias de incubação a 30°C

## CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste trabalho pôde-se observar que o *Aspergillus niger* URM3856 produziu apenas aflatoxina. A pectina cítrica diminuiu a produção de aflatoxina, pois não foi detectado a micotoxina até o sétimo dia de incubação no meio MAC submetido aos raios UV. Esses resultados confirmaram que a pectina cítrica tem função de diminuir a produção de micotoxinas por parte do micro-organismo. Este trabalho mostrou que a pectina cítrica pode ser utilizada para impedir a contaminação por micotoxina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL, F. I. As micotoxinas. Revista Food Ingredients Brasil. Editora Insumos Ltda. n. 7, p. 32–40, 2009.

BUENO, M. C.; PERES, M. F. S.; GATTÁS, E. A. DE L. Produção de poligalacturonase por três linhagens de *Aspergillus* isolados do solo. Aim. Nutr. Araraquara, v. 16, n. 3, p. 253–257, 2005.

BUCHANAN, R. L.; LEWIS D. F. Caffeine inhibition of aflatoxin synthesis probable site of action. Appl

Environ Microbiol. v 47, p. 1216–1220. 1984.

CALVO, A. M.; WILSON, R. A.; BOK, J. W.; KELLER, N. P. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 66, n. 3, p. 447–459, 2002.

CASTRO, I. C. DI. Aspectos sobre as micotoxinas na produção de suínos. 2014.

ESTEBAN, A.; ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CABAÑES, F. J. Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black *Aspergilli*. *Research in Microbiology*. v. 155, p. 861–866, 2004.

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. Micotoxinas: Importância na alimentação e na saúde humana e animal. *Emprapa Agroindustria Tropical*, v. 129, n. 1, p. 48, 2007.

FRAGA, M. E.; CURVELLO, F.; GATTI, M. J.; CAVAGLIERI, L. R.; DALCERO, A. M.; ROSA, C. A. R. Potential aflatoxin and ochratoxin A production by *Aspergillus* species in poultry feed processing. *Veterinary Research Communications*. v. 31, p. 343–353, 2007.

HOLMES, R. A.; BOSTON, R. S.; PAYNE, G. A. Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*. v. 78, p. 559–572, 2008.

KNOWMYCOTOXINS. Adsorventes e ligantes de micotoxina. Disponível em: <<http://http://www.knowmycotoxins.com/pt/npoultry14.htm>> Acesso em: 22 novembro 2015.

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

LUCHESE, R. H.; HARRIGAN, W. F. Biosynthesis of aflatoxin- the role of nutritional factors. *Journal of Applied Bacteriology* v. 74, p. 5-14, 1993.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.12, n.1, p.89-99, 2010.

MARTINEZ, H. E. P.; CLEMENTE, J. M.; LACERDA, J. S.; NEVES, Y. P.; PEDROSA, A. W. Nutrição mineral do cafeeiro e qualidade da bebida. *Rev. Ceres*, v. 61, p. 838–848, 2014.

MAHONEY, N.; MOLYNEUX, R. J. Phytochemical inhibition of aflatoxigenicity in *Aspergillus flavus* by constituents of walnut (*Juglans regia*). *J Agric Food Chem*. v. 52, p. 1882–1889, 2004.

MUNHOZ, C. L.; SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J.; SOARES-JÚNIOR, M. S. Extração de pectina de goiaba desidratada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 1, p. 119–125, 2010.

NORTON, R. A. Effect of carotenoids on aflatoxin B1 synthesis by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*. v 87, p. 814–821, 1997.

PERRONE, G.; MULE, G.; SUSCA, A; BATTILANI, P.; PIETRI, A.; LOGRIECO, A. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72. n. 1, p. 680–685, 2006.

ROZE, L. V.; CALVO, A. M.; GUNTERUS, A.; BEAUDRY, R.; KALL, M.; LINZ, J. E. Ethylene modulates development and toxin biosynthesis in *Aspergillus* possibly via an ethylene sensor-mediated signaling pathway. *J Food Protect*. v. 67, p. 438–447, 2004.

SAITO, M.; MACHIDA, S. A. Rapid Identification method for aflatoxin producing strains of *A. flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. *Mycoscience*. v. 40, p. 205-211. 1999.

SAKUDA, S.; ONO, M.; FURIHATA, K.; NAKAYAMA, J.; SUZUKI, A.; ISOGAI, A. Aflastatin A, a novel inhibitor of aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*, from *Streptomyces*. *J Am Chem Soc*. v. 118, p. 7855–7856, 1996.

TAMURA, C.; NAKAUMA, M.; FURUSAWA, H.; KADOTA, T.; KAMATA, Y.; NISHIJIMA, M.; ITOH, S.; SUGITA-KONISHI, Y. Formulation of a pectin gel that efficiently traps mycotoxin

deoxynivalenol and reduces its bioavailability. *Carbohydrate Polymers*. v. 93, p. 747–752, 2013.

TJAMOS, S. E.; ANTONIOU, P. P.; KAZANTZIDOU, A., ANTONOPOULOS, D. F.; PAPAGEORGIOU, I. TJAMOS, E. C. *Aspergillus niger and Aspergillus carbonarius* in corinth raisin and wine-producing vineyards in Greece: population composition, ochratoxin A production and chemical control. *J. Phytopathology*. v. 152, p. 250–255, 2004.

VAN SOEST, P. J., ROBERTSON, J. B., LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. v. 74, p. 3583–3597, 1991.