

Área: Ciência de Alimentos

EFEITO DE ESTOCAGEM LABORATORIAL NA PRODUÇÃO DE FUMONISINA POR CEPAS DE *Fusarium verticillioides*

Luciana Pereira Bernd*, Angélica Tieme Ishikawa, Thiago Montagner Souza, Antônio Carlos Gerage, Elisabete Yurie Sataque Ono, Elisa Yoko Hirooka

Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina

*E-mail: luciana.bernd@bento.ifrs.edu.br

RESUMO

Fumonisinias produzidas por *Fusarium verticillioides*, patógeno primário de milho, desencadeiam patologias em humanos e animais. O trabalho teve como objetivo avaliar a toxigenicidade (produção de fumonisinias) em cinco cepas de *F. verticillioides* (103F, 113F, 119B, 119BR e 97K) submetidas a constantes repicagens desde o isolamento, com datas de repicagem no período de estocagem de 1991 a 2007. Os sub-cultivos (20 cepas) foram reativados em meio ágar batata dextrose e a toxigenicidade avaliada em substrato milho incubando-se a 25 °C por 15 dias. No decorrer destes anos de repicagem-estocagem, *F. verticillioides* testadas mantiveram produção de níveis detectáveis de fumonisinina, sendo que 90 % das cepas produziram FB1 (0,28 a 2610,6 µg g⁻¹) e 85 %, FB2 (0,03 a 781,1 µg g⁻¹); duas cepas apresentaram-se negativas perante produção destas micotoxinas. Não obstante, o decréscimo drástico na toxigenicidade das cepas sugere o efeito de repicagens aliado à estocagem das cepas na expressão de enzimas envolvidas na biossíntese de metabólitos secundários, indicando a necessidade de avaliar as características das culturas antes de proceder qualquer ensaio experimental toxicológico.

Palavras-chave: Fumonisinias, micotoxina, *Fusarium verticillioides*, milho.

1 INTRODUÇÃO

A conservação da viabilidade e das características morfológicas e fisiológicas é um requisito fundamental na preservação de microrganismos. Os fungos filamentosos em cultivo sob constante repicagem apresentam uma elevada tendência para a mudança espontânea, seja morfológica (setorização, por exemplo) ou fisiológica (produção de metabólitos secundários), provavelmente relacionada às condições de cultura, aliados ao número de gerações (SANTOS et al., 2002).

Inúmeros métodos disponíveis para a conservação microbiana dependem da natureza do organismo e sua futura utilização (RYAN et al., 2002). Dentre os métodos de conservação, citam-se os repiques sucessivos em meio de cultura para manter a viabilidade celular. Todavia, as múltiplas transferências afetam a integridade genética original e, muitas características podem ser modificadas ou perdidas por mutação (AZEVEDO, 1991).

Tradicionalmente, a avaliação rotineira de cultura fúngica em estoque envolve estimativa da viabilidade, observação das características morfológicas e fisiológicas, com atenção especial à manutenção da toxigenicidade, devido à importância em pesquisas referentes à segurança alimentar. Entre os fungos micotoxigênicos da cadeia produtiva de milho, o *Fusarium verticillioides* destaca-se na pós-colheita nas imediações da fase de pré-secagem, por gerar perdas no rendimento, valor nutricional, além de qualidade fitossanitária devido a produção de fumonisinas (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997). As fumonisinas são classificadas no grupo 2B, ou seja, possíveis carcinógenas ao homem pela Internacional Agency for Research on Cancer (IARC, 1993) e, tem sido responsável pela leucoencefalomalácia equina (SYDENHAM et al., 1992), edema pulmonar em suínos, hepatocarcinogenicidade e hepatotoxicidade em ratos (GELDERBLOM et al., 2004), carcinogenicidade em roedores (VOSS et al., 2002), redução da viabilidade e atividade fagocítica de macrófagos em aves (CHATTERJEE; MUKHERJEE, 1994).

O presente estudo analisou a produção de fumonisina (FB1 e FB2) em cinco cepas de *F. verticillioides* isoladas em 1991 de ração animal, submetidos a sucessivos subcultivos, com diferentes datas de reativação para nova estocagem até o ano de 2007.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Substrato e *Fusarium verticillioides*

O substrato utilizado para avaliar a toxigenicidade consistiu de milho híbrido simples P30F53 (Pioneer®), cultivado na safra 2007, disponibilizado pelo Instituto Agrônômico do Paraná.

Cepas de *F. verticillioides* 97K (1 cepa), 103F (14 cepas), 113F (3 cepas), 119B (1 cepa) e 119BR (1 cepa), com datas de repique entre 1991 a 2007, pertencentes à coleção de cepas do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina (UEL), foram originalmente isoladas de rações envolvidas em surtos de intoxicação animal no ano de 1991 no Estado do Paraná.

2.1.2 Procedimento operacional

As cepas de *F. verticillioides* foram isoladas de rações animais em 1991, empregando ágar peptona pentacloronitrobenzeno, ágar peptona dichloran cloranfenicol e PCNB 2-amino butano. Volume de 0,5 mL da suspensão de ração diluída em água peptonada 0,1 % (10^{-1} a 10^{-4}) foi plaqueada na superfície de ágar em duplicata e, 5 a 10 colônias representativas de *Fusarium* sp. em cada plaqueamento foram transferidas para tubo contendo ágar batata dextrose inclinado, para proceder cultura monoespórica. A cepa oriunda da cultura monoespórica foi inoculada em carnation leaf ágar - CLA, selecionando-se 42 cepas para prosseguir com identificação microscópica. A toxigenicidade de cepa foi avaliada imediatamente inoculando-se 10^6 propágulos mL⁻¹ em placa de Petri (90 x 20 mm) contendo 10 g de milho triturado e 10 mL de água destilada, submetidos previamente a duas autoclavagens (121 °C/30 min). As culturas foram incubadas a 25 °C por duas semanas e a fumonisina quantificada por CLAE (SHEPHARD et al., 1990, modificada por UENO et al., 1993). Ao longo dos anos seguintes, as mesmas cepas reativadas-repicadas permaneceram a 4 °C no meio água batata dextrose. Vinte destes sub-cultivos foram ativados em 2007 em ágar batata dextrose inclinado a 25 °C por 15 dias e, a produção de fumonisina avaliada conforme efetuado no ano de 1991.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O nível de fumonisina produzida no substrato milho por 42 cepas de *F. verticillioides* monoespóricas isoladas de ração envolvida em intoxicação animal, no estágio de recém-isolamento em 1991 mostrou-se elevado, atingindo faixas de 9,32 a 54,21 mg g⁻¹ de FB1 e 3,88 a 34,92 mg g⁻¹ de FB2, com ênfase à cepa 113F, com 89,13 mg g⁻¹ de fumonisina total.

Procedendo a análise de toxigenicidade, no ano de 2007, em 20 cepas de *F. verticillioides* originalmente isoladas em 1991 e mantidas sob sucessivos subcultivos, 90 % das cepas produziram níveis detectáveis de FB1 (0,28 a 2610,6 $\mu\text{g g}^{-1}$) e 85 %, de FB2 (0,03 a 781,1 $\mu\text{g g}^{-1}$), porém duas cepas perderam a capacidade de produção (Tabela 1). Conseqüentemente, no decorrer de dezesseis anos de sucessivas repicagens, as cepas de *F. verticillioides* que mantiveram maior toxigenicidade ($> 1000 \mu\text{g g}^{-1}$) foram a 103F (codificação 9 e 14), 119BR (codificação 18), 97K (codificação 20), com produção de fumonisina total (FBtotal) de 1662,73; 3391,72; 1000,43 e 1685,19 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente (Tabela 1). As cepas 113F e 119B (codificação 15, 16, 17 e 19) reduziram a capacidade de produção de fumonisinas, atingindo a faixa de não detectável (N.D.) a 0,34 $\mu\text{g g}^{-1}$.

FBtotal analisada em 2007 apresentou decréscimo de 96,3 %, 92,4 %, 96,8 % e 95,4 % nas cepas codificadas 9, 14, 18 e 20, respectivamente, em relação a mesmas cepas em 1991 (Tabela 1).

A diferença na produção de fumonisinas entre as cinco cepas de *F. verticillioides*, principalmente entre os 14 subcultivos de 103F (0,85 – 3391,72 $\mu\text{g g}^{-1}$ de FBtotal) ocorreu devido a constantes repicagens seqüenciais, aliado ao tempo prolongado de armazenamento, repercutindo provavelmente na patogenicidade. O subcultivo no meio esterilizado tem sido método simples e comum na manutenção de viabilidade celular, mas com possibilidade de alteração morfológica e/ou fisiológica aliado a perda de patogenicidade original (FIGUEIREDO; PIMENTEL, 1975). Recomenda-se iniciar a cultura com conídio monoespórico, assim como evitar meio rico em carboidrato para manter a estabilidade genética (NELSON, 1992).

O presente estudo demonstrou diferentes níveis de fumonisinas produzidos por diferentes cepas de *F. verticillioides*, provavelmente afetada por inadequação no subcultivo, aliado ao longo período de manutenção sob esta condição. Segundo Abramson et al. (1998), o gênero *Fusarium*, em cultivo, apresenta variabilidade morfológica e, repiques repetitivos em meios de cultura laboratorial podem desencadear mutação. Kim (1997) observou setorização, variação morfológica e pigmentação em cultura de *F. oysporum* submetido a repicagens sucessivas. Ryan et al. (2002) observaram comportamento similar em outros gêneros fúngicos, i.e. a formação de setores em *Mertarhizium anisopliae*, que diferiram da cultura parental na morfologia, produção de enzimas, metabólitos secundários e redução da esporulação.

Tabela 1. Redução da toxigenicidade em *F. verticillioides* submetidas a repiques-estocagem a 4 °C até 2007 em relação a mesmas cepas recém-isoladas em 1991

<i>F. verticillioides</i>		Ano 2007				% redução (1991-2007)
Cepas	Ano 1991 FB _{total} (µg g ⁻¹)	Código	Fumonisinias (µg g ⁻¹)			
			FB ₁	FB ₂	FB _{total}	
103F	44620,00	1	80,76	19,83	100,59	99,8
		2	32,77	11,25	44,02	99,9
		3	495,79	106,80	602,59	98,6
		4	351,73	95,52	447,25	99,0
		5	38,37	7,90	46,27	99,9
		6	145,74	57,70	203,44	99,5
		7	463,17	155,10	618,27	98,6
		8	468,06	141,25	609,31	98,6
		9	1.259,1	403,63	1.662,73	96,3
		10	298,71	73,98	372,69	99,3
		11	435,44	115,87	551,31	98,8
		12	330,44	103,22	433,66	99,0
		13	7,35	3,47	10,85	99,9
		14	2610,65	781,07	3391,72	92,4
113F	89130,00	15	0,28	0,03	0,31	100,0
		16	0,34	N.D.	0,34	100,0
		17	N.D.	N.D.	N.D.	100,0
119BR	31150,00	18	748,08	252,35	1.000,43	96,8
119B	33730,00	19	N.D.	N.D.	N.D.	100,0
97K	36790,00	20	1.171,17	514,02	1.685,19	95,4

N.D. = não detectável, isto é, abaixo do limite de detecção do método para FB₁ e FB₂, 27,5 e 35,3 ng g⁻¹, respectivamente.

3 CONCLUSÃO

A estabilidade de isolados fúngicos perante toxigenicidade em cultura é imprescindível para garantir os resultados experimentais, sendo que a coleção de culturas desempenha papel imprescindível para o patrimônio biológico.

REFERÊNCIAS

ABRAMSON D, GAN Z, CLEAR RM, GILBERT J, MARQUARDT RR. Relationships among deoxynivalenol, ergosterol and Fusarium exoantigens in Canadian hard and soft wheat. *International Journal of Food Microbiology*, v. 45, p. 217-224, 1998.

AZEVEDO JL. Melhoramento genético e preservação de fungos utilizados no controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. *Controle Biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna. Embrapa – CNPDA, p. 237-251, 1991.

CHATTERJEE D, MUKHERJEE SK. Contamination of Indian maize with fumonisin B1 and its effects on chicken macrophage. *Letters in Applied Microbiology*, v. 18, p. 251-253, 1994.

FIGUEIREDO MB, PIMENTEL PVC. Métodos utilizados para conservação de fungos na Micoteca da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico. *Summa Phytopatologica*, v. 1, p. 299-302, 1975.

GELDERBLOM WCA, RHEEDER JP, LEGOTT N, STOCKENSTROM S. Fumonisin contamination of a corn sample associated with the induction of hepatocarcinogenesis in rats – role of dietary deficiencies. *Food and Chemical Toxicology*, v. 42, p. 471- 479, 2004.

IARC – International Agency for Research on Cancer. Some naturally occurring substance: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *International Agency for Research on Cancer, World health Organization: França*, v. 56, p.599, 1993.

KIM DH. Induced change in DNA methylation of *Fusarium oxysporium* f. sp. *niveum* due successive transfer. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 30, p. 216-221, 1997.

MUNKVOLD GP, DESJARDINS AE. Fumonisin in maize: Can we reduce their occurrence? *Plant disease*, v. 81, p. 556-565, 1997.

NELSON PE. Taxonomy and Biology of *Fusarium verticillioides*. *Mycopathologia*, v. 117, p. 29-36, 1992.

SANTOS IM, ABRUNHOSA L, VENANCIO A, LIMA N. The effect of culture preservation techniques on patulin and citrinin production by *Penicillium expansum*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 35, p. 272–275, 2002.

SHEPHARD GS, SYDENHAM EW, THIEL PG, GELDERBLOM WCA. Quantitative determination of fumonisins B1 and B2 by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography*, v. 13, p. 2077–2087, 1990.

SYDENHAM EW, MARASAS WFO, SHEPARD GS, THIEL PG, HIROOKA EY. Fumonisin concentrations in brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 40, p. 994–997, 1992.

UENO Y, AOYAMA S, SUGIURA Y, WANG, DS, LEE US, HIROOKA EY, HARA S, KARKI T, CHEN G, YU SZ. A limited survey of fumonisin in corn and corn-based products in Asian countries. *Mycotoxin Research*, v. 9, p. 27–34, 1993.

VOSS KA, HOWARD PC, RILEY RT, SHARMA RP, BUCCI TJ, LORENTZEN RJ. Carcinogenicity and mechanism of action of Fumonisin B1: a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* (= *F. verticillioides*). *Cancer Detection and Prevention*, v. 26, p. 1–9, 2002.