

# Fungos toxigênicos em camarões marinhos cultivados e potenciais toxigênicos das cepas isoladas de *Aspergillus* seção *Flavi* e seção *Nigri*

## Toxigenic fungi in cultivated marine shrimp and the toxigenic potential of *Aspergillus* sections *Flavi* and *Nigri* strains

RIALA6/1515

Rodrigo Maciel CALVET\*, Maria Marlúcia Gomes PEREIRA, Amilton Paulo Raposo COSTA, Regina Célia de Jesus FIALHO, Maria Christina Sanches MURATORI

\*Endereço para correspondência: Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, CEP: 64049-550, Teresina, PI, Brasil.

Tel./Fax: (86) 3215-5754. E-mail: rodrigocalvet@hotmail.com

Recebido: 23.11.2011 – Aceito para publicação: 18.12.2012

### RESUMO

O objetivo do presente estudo foi quantificar, isolar e identificar a micobiota toxigênica em camarões marinhos cultivados no litoral do Piauí. Foram selecionadas, randomicamente, quatro propriedades (“A”, “B”, “C” e “D”), de onde foram coletadas 84 amostras de camarão de três fases de cultivo: “I”, “II” e “III”. A contagem de fungos foi realizada em ágar dicloran rosa de bengala cloranfenicol. As colônias isoladas de *Aspergillus* e *Penicillium* spp foram transferidas para tubos contendo ágar extrato de malte. As contagens de fungos nas amostras de camarões coletadas variaram de 1,85 a 2,73 UFC/g  $\log_{10}$  e não diferiram entre si em todas as fases de cultivo. Foram isoladas 64 cepas de fungos, e os gêneros mais prevalentes foram *Aspergillus* (34,4%) e *Penicillium* (25,0%). Foram identificadas dezoito cepas do gênero *Aspergillus*. Duas cepas de *A. ochraceus* e cinco cepas de *A. niger* foram produtoras de ocratoxina A. Uma cepa de *A. flavus* produziu aflatoxina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, respectivamente, nas concentrações de 14,8 ng/g, 4,3 ng/g, 2,6 ng/g e 1,1 ng/g, e foi classificada como *A. flavus* atípico. Os camarões cultivados no litoral piauiense, quando recentemente capturados, apresentaram baixas contagens fúngicas em todas as fases de cultivo.

**Palavras-chave.** *Litopenaeus vannamei*, fungos toxigênicos, *Aspergillus*, carcinicultura, micotoxinas.

### ABSTRACT

The aim of this study was to isolate and to identify the toxigenic mycobiota in marine shrimp raised in Piauí coast. Four farms were randomly selected (“A”, “B”, “C” and “D”), from whence eighty-four shrimp samples of three farming stages “I”, “II” and “III” were collected. The fungi count was done on dichloran rose bengal chloramphenicol agar. The isolated *Aspergillus* and *Penicillium* spp colonies were transferred into tubes containing malt extract agar. The fungi counts in shrimps samples ranged from 1.85 to 2.73 CFU/g  $\log_{10}$ , and they did not differ between them at all of the cultivation stages. Sixty-four fungi strains were isolated; and *Aspergillus* (34.4%) and *Penicillium* (25.0%) genus were mostly prevalent. Eighteen strains of *Aspergillus* genus were identified. Two *A. ochraceus* strains and five strains of *A. niger* aggregate were ochratoxin A producers. One *A. flavus* strain produced aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in concentrations of 14.8 ng/g, 4.3 ng/g, 2.6 ng/g and 1.1 ng/g, respectively, and it was classified as atypical *A. flavus*. When freshly captured, the shrimps raised in Piauí coast showed low fungal counts at all of the cultivation stages.

**Keywords.** *Litopenaeus vannamei*, toxigenic fungi, *Aspergillus*, shrimp culture, mycotoxins.

## INTRODUÇÃO

O Brasil produziu 80.000 toneladas de camarão em 2010, dos quais 78.399 toneladas foram absorvidas pelo mercado interno<sup>1</sup>. O Piauí foi um dos estados que contribuiu para essa produção e, em 2006, garantiu o oitavo lugar no ranking nacional em produtividade. A carcinicultura marinha foi introduzida no Piauí na década de 1980 e somente a partir da década de 1990, o *Litopenaeus vannamei* foi introduzido na região, tornando-se um marco para a carcinicultura piauiense<sup>2</sup>.

Entretanto, contaminações bacterianas, virais e fúngicas podem comprometer o desenvolvimento do setor, afetando diretamente a qualidade do produto final. Fungos são amplamente distribuídos na natureza e por esse motivo podem ser usados como parâmetro na avaliação microbiológica, determinando as condições higiênicas do ambiente de cultivo e do camarão cultivado, pois são utilizados como indicadores da qualidade higiênica<sup>3</sup>.

A pesquisa de fungos em alimentos é importante, pois algumas espécies são capazes de produzir micotoxinas e/ou causar deterioração<sup>4</sup>. No entanto, a RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, não estabelece valores para a quantificação desses micro-organismos em camarões, ou para a maioria dos alimentos de origem animal processados<sup>5</sup>. Desse modo, as contagens fúngicas não são mais realizadas como rotina para a avaliação da qualidade de alimentos, especialmente em produtos de origem animal. Desta forma, produtos que apresentem uma contagem fúngica significativa podem ser comercializados, mesmo comprometendo a saúde do consumidor pela possível presença de micotoxinas produzidas por fungos contaminantes do alimento, caso os fatores como temperatura e umidade não sejam controlados<sup>6,7</sup>.

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos, com baixo peso molecular, que possuem efeitos carcinogênicos, teratogênicos e imunossupressores, podendo causar convulsões, alucinações e hemorragias nos animais e seres humanos que consomem alimentos contaminados. Os gêneros de maior importância, por serem produtores desses metabólitos, são *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*<sup>6-9</sup>.

Reis et al.<sup>10</sup> obtiveram contagens de fungos filamentosos e leveduras em camarões frescos de água doce comercializados *in natura* sem gelo que variaram de 5,11 a 7,68 UFC/g. Eles justificaram esses resultados devido às variações de temperatura características das

regiões tropicais e subtropicais e também à contaminação da água.

Lin e Dianese<sup>11</sup> desenvolveram método para identificação de fungos micotoxígenos, que utiliza o ágar leite de coco, e baseia-se na produção de fluorescência azul-violeta e de pigmentação específica no meio de cultura quando a micotoxina está presente.

Yousefi et al.<sup>12</sup> isolaram *Aspergillus flavus* em camarões tigre verdes (*Penaeus semisulcatus*) e verificaram que duas cepas produziram fluorescência no ágar coco sob luz ultravioleta. Posteriormente, a capacidade toxigênica destes isolados foi confirmada por cromatografia líquida de alta eficiência<sup>12</sup>, apesar dos vários métodos utilizados para a detecção de fungos toxígenos que se baseiam na produção de micotoxina em extrato sólido ou líquido, extração da toxina com solventes orgânicos, purificação, concentração e detecção por cromatografia de camada delgada<sup>13</sup>.

Aflatoxinas são produzidas por cepas de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, que muitas vezes podem crescer em alimentos armazenados; estudos filogenéticos de *A. flavus* mostraram que eles se dividem em dois subgrupos. A linhagem "S" produz altos níveis de aflatoxinas, apresenta numerosos esclerócios pequenos, com média inferior a 400 µm de diâmetro, isolados e denominados como atípicos e também chamado var *A. flavus parvisclerotigenus*<sup>14</sup>.

A linhagem "L" produz menos esclerócios com tamanho maior que 400 µm de diâmetro e apresenta baixa produção de aflatoxina<sup>15,16</sup>. A maioria das cepas do grupo I produz aflatoxina B, e a maioria das cepas do grupo II produz tanto aflatoxina B como aflatoxina G<sup>17-19</sup>.

A carcinicultura é uma atividade em expansão no litoral piauiense e os camarões produzidos são congelados para distribuição no mercado interno e externo, para serem consumidos das mais diversas formas, inclusive crus e, portanto, as condições higiênicas e sanitárias devem ser avaliadas para verificar a segurança do produto final ao consumidor. Sendo assim, objetivou-se quantificar, isolar e identificar a microbiota toxigênica de camarões marinhos cultivados no litoral do Piauí, bem como avaliar o potencial toxigênico das cepas isoladas de *Aspergillus* seção *Flavi* e seção *Nigri*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Foram selecionadas, randomicamente, quatro das catorze propriedades carcinicultoras existentes no litoral

do Piauí (região delimitada entre 2° 55' 51,39"S – 2° 58' 04,31"S a 41° 20' 09,35"O – 41° 26' 33,52"O), identificadas para fins de pesquisa como "A", "B", "C" e "D", onde foram coletadas amostras de camarão das três fases de cultivo: "I" (pós-larva<sub>8</sub> – PL<sub>8</sub> a PL<sub>18</sub>), "II" (PL<sub>18</sub> a 90 dias) e "III" (90 a 120 dias), em delineamento fatorial 4x3 (quatro propriedades e três fases) representado por três amostras de 100 g de camarão, totalizando 84 amostras.

Após as coletas, as amostras foram armazenadas em sacos plásticos esterilizados Nasco Whirl-Pak<sup>®</sup> lacrados, identificados e transportados em recipientes isotérmicos contendo gelo reciclável até o Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamentos de Alimentos da Universidade Federal do Piauí.

#### Determinação da microbiota e identificação de espécies de *Aspergillus*

A contagem total de fungos foi realizada em ágar dicloran rosa bengala com cloranfenicol, de acordo com a metodologia recomendada por Pitt e Hocking<sup>9</sup> para estimar microbiota total. A enumeração foi realizada através do método de dispersão em superfície: 25 g de cada amostra foram homogeneizados em 225 mL de água peptonada a 0,1%, por 30 min, em um agitador orbital. Foram realizadas diluições seriadas (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-3</sup>) e retiradas alíquotas de 0,1 mL inoculadas em duplicata. As placas foram incubadas a 25 °C por cinco a sete dias. Após esse período, foram selecionadas placas contendo entre 10 a 100 UFC, conforme recomenda Dalcerro et al.<sup>20</sup>. Os resultados foram expressos em UFC/g de amostra. As colônias de *Aspergillus* e *Penicillium* spp foram transferidas para tubos contendo ágar extrato de malte (MEA). A identificação de espécies de *Aspergillus* foi realizada de acordo com as chaves taxonômicas de Klich<sup>21</sup>, conforme segue: preparou-se uma suspensão de conídios a partir de cada cepa em 0,5 mL de meio constituído de 0,2% de ágar-ágar e 0,05% de Tween 80TM, distribuídos em tubo de hemólise previamente esterilizado a 121 °C por 15 minutos<sup>9</sup>. A seguir, introduziu-se a agulha de platina na suspensão de conídios, transferindo-os para três pontos equidistantes nas placas contendo Czapek Yeast Extract Agar (CYA), Malt Extract Agar (MEA) e Czapek Yeast Extract Agar 20% Sucrose (CY20S). Uma placa de CYA, MEA e CY20S foi incubada a 25 °C, e uma placa de CYA a 37 °C, todas por um período de sete dias. Após a incubação, visando à identificação das espécies, foram observadas as estruturas micromorfológicas e as

características macroscópicas das colônias (diâmetro, textura, forma, aspecto da superfície e do reverso, pigmentação dos conídios e pigmento solúvel, produção e cor de exsudato).

#### Capacidade toxígena de *Aspergillus*

*Potencial toxígeno dos Aspergillus da seção Flavi e da seção Nigri em Ágar Coco*

O potencial toxigênico dos *Aspergillus* isolados foi avaliado pela inoculação em ágar leite de coco e incubação por sete dias a 25 °C. Posteriormente, verificou-se a pigmentação produzida pelo fungo no meio de cultura e a fluorescência através de um cromatovisor com luz ultravioleta (UV) de 366 nm. A fluorescência característica da produção de micotoxina foi expressa com o símbolo (+) para positividade e (-) para negatividade<sup>11</sup>.

#### *Produção de aflatoxinas por Aspergillus da seção Flavi*

Foi realizado um pré-teste utilizando uma cepa de *A. parasiticus* (NRRL 2999) para avaliar sua capacidade toxígena, sendo que essa cepa produziu 0,5 µg de aflatoxina B<sub>1</sub> por mL. Em seguida, todas as cepas de *Aspergillus* da seção *Flavi* isoladas foram testadas para produção de aflatoxina B<sub>1</sub>, seguindo metodologia recomendada por Geisen et al.<sup>22</sup>, conforme segue: as cepas foram cultivadas em placas de MEA a 28 °C por sete dias. Após o período de incubação, o micélio foi transferido para um microtubo e acrescido de 1.000 µL de clorofórmio. A mistura foi agitada em microcentrífuga por 10 min a 1.400 rpm; o micélio foi removido e o extrato clorofórmico evaporado sob fluxo de N<sub>2</sub>. O resíduo foi redissolvido em 200 µL de clorofórmio. A detecção e quantificação de aflatoxina B<sub>1</sub> dos extratos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando um cromatógrafo Shimadzu<sup>®</sup>, modelo Prominence, com detector de fluorescência modelo RF-10AXL SUPER, de acordo com a metodologia proposta por Trucksess et al.<sup>23</sup>. Uma alíquota de 200 µL do extrato da amostra foi derivatizada com 700 µL de ácido trifluoroacético:ácido acético:água (20:10:70, v/v/v). As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna de fase reversa (de sílica gel, 150 x 4,6 mm id., 5,0 µm de tamanho de partículas, Varian, Inc., Palo Alto, EUA). A fase móvel utilizada foi acetonitrila, metanol e água (17:17:66 v/v/v) a uma vazão de 1,5 mL.min<sup>-1</sup>. A fluorescência de derivados de aflatoxina foi gravada em comprimentos de onda de excitação e emissão de

360 nm e 460 nm, respectivamente. A curva padrão foi construída em diferentes níveis de padrão de AFB<sub>1</sub>, de 1,01 ng/mL, 2,02 ng/mL e 4,04 ng/mL (Sigma Aldrich<sup>®</sup> Co., St. Louis, MO USA, pureza > 99%). A toxina foi quantificada pela correlação das alturas dos picos do extrato da amostra com o da curva padrão ( $y = 0,0003x - 0,0077$ ;  $R^2 = 0,99$ ). O limite de detecção do método analítico foi de 0,4 ng/g, com base na relação do sinal-ruído (3:1) e o limite de quantificação foi estabelecido como sendo 3 vezes o limite de detecção (1,4 ng/g).

#### Produção de ocratoxina A por *Aspergillus* da seção *Nigri*

Todas as cepas de *Aspergillus* da seção *Nigri* isoladas foram testadas para verificar a capacidade de produção de ocratoxina A (OTA), determinada seguindo a metodologia descrita por Bragulat et al.<sup>24</sup>: as cepas foram cultivadas em CYA a 28 °C por sete dias. Três fragmentos do ágar foram retirados da área central da colônia, pesados e transferidos para um microtubo, acrescido de 1.000 µL de metanol. A amostra foi agitada em microcentrífuga por 10 min a 1.400 rpm, o sobrenadante filtrado e evaporado até a secura sob N<sub>2</sub>. O resíduo foi redissolvido em 1.000 µL de metanol. Os extratos foram analisados por cromatografia em camada delgada, conforme metodologia da AOAC Official Method 973.37 (Nesheim et al.<sup>25</sup>). A cromatografia foi desenvolvida em uma cuba contendo como solvente de corrida uma solução de tolueno:metanol:ácido acético (90:5:5). Posteriormente, foram observados sob luz UV (365 nm), determinando somente a positividade ou negatividade<sup>11</sup> para OTA por comparação visual com um padrão de concentração conhecida (Sigma Aldrich<sup>®</sup> Co., St. Louis, MO USA, pureza > 99%). Para a confirmação da presença de OTA utilizou-se uma solução alcoólica de bicarbonato de sódio, borrifada sobre a mancha. O limite de detecção foi de 0,5 µg/kg.

#### Análise Estatística

Os resultados foram transformados em log<sub>10</sub> e realizou-se a análise de variância e aplicação do teste de SNK para comparação das médias de contagens fúngicas utilizando o Pacote Estatístico SIGMA STAT<sup>26</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As contagens fúngicas dos camarões das fazendas pesquisadas não diferiram entre si em todas as fases de cultivo (Tabela 1), caracterizadas em função do crescimento e ganho de peso dos animais.

**Tabela 1.** Médias das contagens de fungos nos camarões produzidos no litoral piauiense em três fases de cultivo

Fases de Cultivo	Propriedades			
	"A"	"B"	"C"	"D"
I	2,73 <sup>a</sup>	1,85 <sup>a</sup>	2,40 <sup>a</sup>	2,13 <sup>a</sup>
II	2,38 <sup>a</sup>	2,01 <sup>a</sup>	1,98 <sup>a</sup>	2,11 <sup>a</sup>
III	2,65 <sup>a</sup>	1,82 <sup>a</sup>	2,03 <sup>a</sup>	1,85 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> = letras iguais representam resultados semelhantes ( $p < 0,05$ ); UFC/g = unidade formadoras de colônias por grama em log<sub>10</sub>.

Os camarões analisados eram recém-capturados, bem nutridos, sadios e possuíam boa imunidade. As baixas contagens fúngicas observadas nas diferentes fases de cultivo podem estar relacionadas a diversos fatores, dentre os quais o equilíbrio da microbiota externa do corpo do animal e o tempo decorrido entre a coleta das amostras e a análise. Porém, existe a possibilidade dos fungos presentes nos camarões multiplicarem-se após a despesca e durante o processamento do produto, caso seja armazenado em temperatura inadequada, pois, ao encontrarem condições ideais, os fungos possuem um importante papel no processo de deterioração, ocasionando perdas da qualidade do produto final e produção de micotoxinas conforme Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods<sup>4</sup>.

A legislação vigente não possui parâmetros para a quantificação de fungos e leveduras para pescado processado e expostos à venda<sup>5</sup>, por isso não é possível comparar os resultados encontrados aos padrões de referência. No entanto, as contagens fúngicas nos camarões das diferentes fases recém-despedidos são relativamente baixas quando comparadas aos resultados de Reis et al.<sup>10</sup>, e a manipulação indevida, posterior à despesca, pode acrescentar novos micro-organismos contaminantes, assim como favorecer o desenvolvimento de fungos preexistentes.

Foram isoladas 64 cepas de fungos pertencentes a sete gêneros (Tabela 2) nas amostras de camarão das diferentes fases de cultivo, sendo que as espécies prevalentes pertenciam aos gêneros *Aspergillus* (34,4%) e *Penicillium* (25,0%). Reis et al.<sup>10</sup> afirmam que camarões podem ser contaminados por fungos pela água do ambiente, no caso dos rios. A contaminação fúngica observada nos camarões cultivados no litoral piauiense pode ter ocorrido pela presença desses fungos na ração contaminada que se adaptou às condições de cultivo pela sua ampla difusão na natureza.

**Tabela 2.** Frequência absoluta e relativa de fungos filamentosos isolados de camarões cultivados no litoral piauiense

Gênero fúngico	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
<i>Aspergillus</i> spp	22	34,4
<i>Penicillium</i> spp	16	25,0
<i>Trichoderma</i> spp	09	14,1
<i>Cladosporium</i> spp	08	12,5
<i>Fusarium</i> spp	02	3,1
<i>Alternaria</i> spp	02	3,1
<i>Curvularia</i> spp	02	3,1
Total	64	100,0

Foram identificadas dezoito cepas do gênero *Aspergillus*, pertencentes às seções *Circundati*, *Terrei*, *Nigri* e *Flavi*. As espécies isoladas estão descritas na Tabela 3. Destas, duas cepas de *A. ochraceus* e cinco cepas de *A. agregados niger* apresentaram resultados positivos para a produção de OTA em cromatografia de camada delgada. Por ser uma análise qualitativa, não foi quantificada a concentração da produção de OTA.

Uma cepa de *A. flavus* produziu aflatoxina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> na concentração de 14,8 ng/g, 4,3 ng/g, 2,6 ng/g e 1,1 ng/g, respectivamente e foi classificada como *A. flavus* atípico<sup>14-19</sup>. Essa cepa apresentou todas as características morfológicas macroscópicas e microscópicas de um *A. flavus* diferenciando morfológicamente do *A. parasiticus*<sup>21</sup>. Esses dados assemelham-se aos estudos realizados por Saito e Tsuruta<sup>14</sup>, Geiser et al.<sup>15</sup>, Tran-Dinh et al.<sup>16</sup>, Pildain et al.<sup>17</sup>, Barros et al.<sup>18</sup> e Perrone et al.<sup>19</sup>, que identificaram morfológicamente *A. flavus* atípicos do grupo II (Linhagem “S”) que são produtores de aflatoxinas B e G. Assim, a classificação e identificação molecular e filogenética dessa cepa torna-se necessária posteriormente, pois não há resultados relativos a

essa variedade de fungos no Brasil, podendo ser uma variedade da seção *Flavi*, como afirmam Varga et al.<sup>27</sup>, que identificaram duas novas espécies da seção *Flavi* produtoras de aflatoxinas, e Gonçalves et al.<sup>28</sup>, que analisaram por biologia molecular cepas dessa seção isoladas de castanhas do Brasil.

Durante a despesca dos viveiros os camarões são transferidos para recipientes contendo água do canal de abastecimento, metabissulfito de sódio e gelo para manter a temperatura próxima a 0,0 °C. Em seguida, esses depósitos são conduzidos para a indústria, onde os camarões são lavados com água clorada a 5,0 ppm, congelados a -35 °C e armazenados a -20 °C até expedição. A concentração de cloro utilizada é eficiente como bactericida, entretanto, não há comprovação da eficácia em fungos presentes em camarões.

Santos et al.<sup>29</sup> e Veloso et al.<sup>30</sup>, ao testarem diferentes concentrações de metabissulfito de sódio e cloro em fungos do gênero *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp isolados de diferentes etapas de beneficiamento de camarões, concluíram que concentrações de 6,0% de metabissulfito inibiram o crescimento *in vitro* desses gêneros, enquanto 5,0 ppm de cloro não inibiu o crescimento fúngico.

Assim, os sulfitos podem ser utilizados como fungicidas para fungos fitopatogênicos produtores de esclerócitos<sup>31</sup> e as temperaturas utilizadas durante o processamento dos camarões inibem o desenvolvimento dos fungos e sua consequente produção de micotoxinas<sup>32</sup>. As amostras de camarão analisadas apresentaram espécies de fungos micotoxígenos, e sua presença no produto não indica necessariamente a existência de micotoxinas, pois, para isso, é preciso que o fungo encontre condições ideais para seu crescimento<sup>6-7</sup>, portanto as amostras analisadas são consideradas seguras para o consumo.

**Tabela 3.** Espécies do gênero *Aspergillus* isoladas de camarões cultivados no litoral piauiense

Seção	Números de isolados	Ocorrência (%)	AFB <sub>1</sub> (ng/g)	AFB <sub>2</sub> (ng/g)	AFG <sub>1</sub> (ng/g)	AFG <sub>2</sub> (ng/g)	OTA
Seção <i>Nigri</i>							
<i>A. agregados niger</i>	07	38,9					05(+)
Seção <i>Circundati</i>							
<i>A. ochraceus</i>	04	22,2					02(+)
Seção <i>Terrei</i>							
<i>A. terreus</i>	04	22,2					
Seção <i>Flavi</i>							
<i>A. flavus</i> *	02	11,1	14,8	4,3	2,6	1,1	
<i>A. oryzae</i>	01	5,6					
Total	18	100,0			01(+)		07(+)

AFB<sub>1</sub> = aflatoxina B<sub>1</sub>; AFB<sub>2</sub> = aflatoxina B<sub>2</sub>; AFG<sub>1</sub> = aflatoxina G<sub>1</sub>; AFG<sub>2</sub> = aflatoxina G<sub>2</sub>; OTA = ocratoxina A; (+) = produção de micotoxina; \* = *A. flavus* atípica do grupo II (Linhagem “S”)

As rações contaminadas por fungos micotoxígenos preexistentes na matéria-prima são consideradas como fontes de micotoxinas em carcinicultura, como afirmam Villarreal-Cavazos et al.<sup>33</sup> e Calvet et al.<sup>34</sup>, detectaram níveis de aflatoxina B<sub>1</sub> que variaram de 30 µg/kg a 360 µg/kg. Isto se deve ao fato das rações possuírem substratos potenciais para crescimento fúngico e produção desses metabólitos quando são armazenadas e expostas a fatores ambientais. Os fungos também podem contaminar os camarões cultivados, interferir na vida de prateleira pela sua capacidade proteolítica e consequentemente diminuir a qualidade do produto final.

No entanto, não existem padrões referenciais quanto à prevalência de fungos micotoxígenos em alimentos, necessitando um aprofundamento nas pesquisas com intuito de verificar a potencialidade dessas espécies, a possível presença de micotoxinas em camarões cultivados e os danos que podem causar para os consumidores do produto final.

Concluiu-se que os camarões cultivados no litoral piauiense, quando recém-capturados, apresentaram baixas contagens fúngicas em todas as fases de cultivo e os fungos prevalentes pertenceram aos gêneros *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp. Também foram isolados os gêneros *Trichoderma* spp, *Cladosporium* spp, *Fusarium* spp, *Alternaria* spp e *Curvularia* spp.

As espécies de *A. ochraceus* e *A. agregados niger* isoladas em camarões eram produtoras de OTA.

Foi isolada uma cepa de *A. flavus* atípica do grupo II (Linhagem "S") produtora de aflatoxina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> com diferenças macroscópicas e microscópicas do *A. parasiticus*, que necessitará, posteriormente, de uma identificação molecular para saber se não é uma cepa de *A. parasiticus* ou var *A. flavus parvisclerotigenus*<sup>14</sup>, pois até o momento deste estudo não há resultados relativos a essa variedade de fungos no Brasil.

#### AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA.

Ao Laboratório de Micologia e Micotoxicologia do Instituto de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Ao Laboratório de Micologia da Universidad Nacional de Río Cuarto.

#### REFERÊNCIAS

1. ABCC. Associação Brasileira de Criadores de Camarão. Censo da produção anual de 2004. [Acesso 2011 set 24]. Disponível em: [http:// www.abccam.com.br/censo\_2010].
2. Moraes AM. Agronegócio do camarão no Piauí. Carta CEPRO. 2001;20(3):7-12.
3. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu; 2008. 182p.
4. ICMSE. Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganismos de los alimentos: características de los patógenos microbiano. Zaragoza: Acirbia; 1996.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília (DF); 10 jan 2001; Seção 1(7-E):45-53.
6. Pereira MMG, Carvalho EP, Prado G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Bol CEPPA. 2002;20(1):141-56.
7. Pereyra CM, Cavaglieri LR, Chiacchiera SM, Dalcerro AM. Fungi and mycotoxins in feed intended for sows at different reproductive stages in Argentina. Vet Med Int. 2010;01:1-7.
8. Ritter AC, Noll IB. Diferentes pré-inóculos, temperaturas e tempos de incubação na produção aflatoxina B1 em arroz. Cienc Rural. 2008;38(9):2552-6.
9. Pitt JI, Hocking AD. Fungi and Food Spoilage. 3. ed. Londres: Springer Dordrecht Heidelberg; 2009.
10. Reis JA, Hoffmann P, Marcos LM, Taddei FG, Gonçalves TMV, Hoffmann FL. Estudo higiênico-sanitário dos camarões dulcícolas *Macrobrachium amazonicum* e *M. jelskii*. Hig Aliment. 2004;18(116/117):57-8.
11. Lin MT, Dianese JC. A coconut-agar medium rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. Phytopathol. 1976;66:1466-9.
12. Yousefi S, Dadgar S, Safara M, Zaini F. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* isolates from green-tiger shrimps (*Penaeus semisulcatus*). Iran J Microbiol. 2009;01(4):18-22.
13. Filtenborg O, Frisvad JC. A simple screening: method for toxigenic moulds in pure cultures. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie. 1980;13:128-30.
14. Saito M, Tsuruta O. A new variety of *Aspergillus flavus* from tropical soil in Thailand and its aflatoxin productivity. Proc Jpn Assoc Mycotocol. 1993;37:31-6.
15. Geiser DM, Pitt JI, Taylor JW. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin producing fungus *Aspergillus flavus*. Proc Natl Acad Sci. 1998;95:388-93.
16. Tran-Dinh N, Pitt JI, Carter DA. Molecular genotype analysis of natural toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. Mycol Res. 1999;103(11):1485-90.
17. Pildain, MB, Vaamonde G, Cabral D. Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. Int J Food Microbiol. 2004;93:31-40.
18. Barros G, Torres A, Chulze S. *Aspergillus flavus* population isolated from soil of Argentina's peanut-growing region.

- Sclerotia production and toxigenic profile. *J Sci Food Agricult*. 2005;85(14):2349-53.
19. Perrone G, Susca A, Cozzi G, Ehrlich K, Varga J, Frisvad JC, et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *St Mycol*. 2007;59:53-66.
  20. Dalcerro A, Magnoli C, Chiacchiera S, Palacios G, Reynoso M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B<sub>1</sub>, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. *Mycopathol*. 1997;137(3):179-84.
  21. Klich MA. A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Sidney: CSIRO – Division of Food Processing; 2002.
  22. Geisen, R. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. *J Off Appl Microbiol*. 1996;19:388-92.
  23. Trucksess MW, Stack ME, Nesheim S, Albert RH, Romer TR. Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts and pistachionuts: collaborative study. *J AOAC Int*. 1994;6:1512-21.
  24. Bragulat MR, Abarca ML, Cabañes FJ. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *Int J Food Microbiol*. 2001;71:139-44.
  25. Nesheim S, Hardin NF, Francis OJ, Langham WS. Analysis of ochratoxin A and B and their esters in barley: using partitions and thin-layer chromatography. I Development of the method. *J AOAC Int*. 1973;56:817-21.
  26. Sigma Stat for windows version 1.0. Jandel Corporation; 2000.
  27. Varga J, Frisvad JC, Samson RA. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *St Mycol*. 2011;69:57-80.
  28. Gonçalves JS, Ferracin LM, Vieira MLC, Lamanaka BT, Taniwaki MH, Fungaro MHP. Molecular analysis of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. *World J Microb Biot*. 2012;28(4):1817-25.
  29. Santos YFM, Muratori MCS, Rosa CAR, Calvet RM, Nunes EMCG, Marques ALA, et al. Sobrevivência do *Aspergillus* spp *in vivo* e *in vitro* submetido a diferentes concentrações de metabissulfito de sódio e cloro usado no beneficiamento do camarão. *In: XVIII Seminário de Iniciação Científica e I Seminário em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da UFPI*; nov 2009; Teresina.
  30. Veloso APB, Muratori MCS, Rosa CAR, Calvet RM, Nunes EMCG, Marques ALA, et al. Sobrevivência do *Penicillium* spp *in vivo* e *in vitro* submetido a diferentes concentrações de metabissulfito de sódio e cloro usado no beneficiamento do camarão. *In: XVIII Seminário de Iniciação Científica e I Seminário em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da UFPI*; nov 2009; Teresina.
  31. Patsoukis N, Georgiou CD. Effect of sulfite-hydrosulfite and nitrite on thiol redox state, oxidative stress and sclerotial differentiation of filamentous phytopathogenic fungi. *Pestic Bio Physiol*. 2007;88(2):226-35.
  32. Jay JM. *Microbiologia de alimentos*. 6. ed. São Paulo: Artmed; 2005.
  33. Villarreal-Cavazos DA, Barbosa CG, Ezquerria-Brauer JM, Scholz U, Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D. Efecto de las micotoxinas em la nutrición de camarones peneidos. *In: VII Memorias del Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, VII Avances em Nutrición Acuícola*; 2004; Hermosillo. p. 463-479.
  34. Calvet RM, Muratori MCS, Pereira MMG, Rosa CAR, Costa APR, Dalcerro AM. Aflatoxinas B<sub>1</sub> em ração de camarão cultivados no litoral do Piauí. *In: II Congresso Latino-Americano de Analistas de Alimentos, VIII Encontro Nacional de Analistas de Alimentos*; jun 2009; Belo Horizonte.