

revista Higiene Alimentar

Jan / Jun de 2022

Volume 36 – No. 294



ISSN 2675-0260

Indexada nas seguintes bases de dados:
CAB ABSTRACTS (Inglaterra)
LILACS-BIREME (Brasil)
PERI-ESALQ (Brasil)
BINAGRI-Mapa (Brasil)
Afiliação:
Associação Brasileira de Editores Científicos e



HIGIENISTAS ALIMENTARES ANALISAM DESAFIOS FUTUROS DA CADEIA AGROALIMENTAR.

Retornando após a pandemia é encontro obrigatório dos profissionais que militam na vastíssima área das ciências alimentares, para debater problemas e soluções inerentes à produção, industrialização e distribuição dos alimentos.



X CONGRESSO LATINO-AMERICANO
E XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE

HIGIENISTAS DE ALIMENTOS

VIII ENCONTRO DO SISTEMA BRASILEIRO DE INSPEÇÃO
DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

ANAIS OFICIAIS DOS CONGRESSOS

Esta EDIÇÃO ESPECIAL apresenta, na íntegra, 111 trabalhos selecionados e aprovados, que serão registrados (a pedido) no *Digital Object Identifier* (DOI).





X CONGRESSO LATINO-AMERICANO
E XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE

HIGIENISTAS DE ALIMENTOS

VIII ENCONTRO DO SISTEMA BRASILEIRO DE INSPEÇÃO
DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

26 A 29
ABRIL
2022

FOZ DO
IGUAÇÚ - PR

HIGIENE E SEGURANÇA DOS ALIMENTOS Produtos de Origem Vegetal e Bebidas



AÇÃO ANTIFÚNGICA E ANTIAFLATOXINAS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO SOB *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999

ANTIFUNGAL AND ANTIAFLATOXINS ACTION OF ZINC OXIDE NANOPARTICLES AGAINST *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999

Mariana Paiva Rodrigues^a, Raul Roque de Souza Dias^a, Ricardo Mathias Orlando^b, Ruben Dario Sinisterra Millán^b, Kelly Moura Keller^{a*}

^a Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Avenida Antônio Carlos nº 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. 30123-970.

^b Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais. Avenida Antônio Carlos nº 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. 30123-970.

Resumo

Fungos micotoxigênicos representam risco à saúde humana e animal, portanto, é relevante a prevenção e controle destes nos alimentos. Nanopartículas de óxido de zinco (NPs ZnO) são promissoras como método alternativo por possuírem propriedades antifúngicas e antioxidantes. O estudo avaliou a ação de NPs ZnO, nas concentrações 0, 1, 3 e 5 mg mL⁻¹, sobre o crescimento de *Aspergillus parasiticus* e produção de aflatoxinas (AFs). A taxa de crescimento foi avaliada através da medição diária dos diâmetros das colônias. A detecção de AFs se deu por cromatografia líquida de alta eficiência. *Aspergillus parasiticus* sofreu redução significativa do crescimento nas três concentrações. Já a produção de AFG2, AFB2 e AFB1 apresentou redução significativa. Esses resultados confirmam as NPs ZnO como uma alternativa viável ao controle de *A. parasiticus*.

Palavras-chave Micotoxinas, Contaminação, Fungos.

Introdução

Fungos são organismos sapróbios que têm a capacidade de crescer em diversos tipos de matéria orgânica (CAST, 2003), sendo os alimentos substratos favoráveis à esse crescimento. Esta contaminação é indesejável na maioria dos casos, pois acarreta em possíveis perdas nutricionais, alterações da textura, sabor, aroma e qualidade dos alimentos. Além disso, alguns desses fungos contaminantes são capazes de produzir fatores alergênicos e micotoxinas (ROCHA et al., 2014).

As micotoxinas são produzidas por alguns gêneros de fúngicos quando se encontram em situações de estresse oxidativo, sendo os três principais *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp. As principais micotoxinas são as aflatoxinas, fumonisinas, zearalenona, ocratoxina A e tricotecenos (PITT; HOCKING, 2009). A absorção dessas micotoxinas pelo organismo, seja por quaisquer vias, como oral, transdérmica, respiratória, pode acarretar danos à saúde animal e humana (BENNET, 1987; CAST, 2003). Aflatoxinas (AFs) são metabólitos secundários tóxicos produzidos principalmente pelas espécies, comumente isoladas de grãos e cereais, *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Essa última tendo grande relevância pois as cepas toxigênicas têm o potencial de produzir as quatro principais aflatoxinas: B1, B2, G1 e G2 (FERRE, 2016). As AFs acarretam efeitos adversos sérios ao organismo animal, como hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, imunossupressão, problemas reprodutivos, teratogenicidade. Sendo importante salientar que a molécula de AF mais tóxica, a aflatoxina B1, é considerada como grupo 1, ou seja, carcinogênica para seres humanos e animais, de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) (IARC, 2012; OSTRY et al., 2017).

A implementação de boas práticas seja durante os processos pré e/ou pós-colheita, apesar de serem recomendados e acarretarem na redução da contaminação fúngica, por si

só não impedem o crescimento e produção de micotoxinas. Outro ponto desfavorável é que muitos dos métodos preconizados são onerosos e/ou inviáveis aos pequenos e médios produtores rurais. Sendo assim a busca por novos aditivos fungicidas e/ou fungistáticos com potencial antimicrobiano e antioxidante, e que sejam inócuos à saúde animal, humana e ambiental, vem crescendo.

Nanopartículas, materiais com dimensão $\leq 100\text{nm}$, devido ao reduzido tamanho possuem grande relação superfície/volume, isso confere características físicas e químicas particulares a essas estruturas. Essas nanopartículas têm sido pesquisadas e empregadas em funções biológicas, como interações bioquímicas e/ou físico-químicas, agente antimicrobiano, mecanismo facilitador de administração de fármacos (MODY et al., 2010; ROTELLO, 2017). As nanopartículas de óxido de zinco (NPs ZnO) por serem constituídas de um mineral essencial à saúde de humanos e animais, se utilizadas em quantidades dentro dos limites máximos permitidos para cada espécie, apresentam caráter inócuo à saúde. Além disso, também estão presentes no solo, e por isso, não apresentam risco de contaminação ambiental. Essas NPs ZnO se destacam pela característica inócua e por possuírem caráter antimicrobiano, antioxidante, anti-inflamatório (VASILACHE et al., 2011; ESPITIA et al., 2012). Essas propriedades se dão, principalmente, pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), O_2 , O_2^- , H_2O_2 e OH^- , mas também pela internalização das NPs, a liberação de cátions Zn^+ e por fim através interações eletrostáticas (SIRELKHATIM et al., 2015).

Sendo assim, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos de nanopartículas de óxido de zinco (*in vitro*) sobre o crescimento de *Aspergillus parasiticus* e a produção dos principais tipos de aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2).

Material e Métodos

A avaliação do efeito de nanopartículas de óxido de zinco sobre o crescimento *in vitro* de *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, foi feita através da determinação da fase lag e taxa de crescimento micelial da cepa sob diferentes concentrações, 0 (controle), 1, 3 e 5 mg mL^{-1} de NPs ZnO. Essas concentrações foram incorporadas ao meio de cultivo ágar batata dextrose (BDA) pelo método *pour plate*, em triplicata. Posteriormente, um poço central foi feito em todas as placas através da utilização de um *punch*, nesse foi pipetado 100 μL de inóculo previamente preparado na concentração de 10^6 UFC/mL. As placas foram então incubadas à 25°C, por 14 dias, durante esse período, os diâmetros das colônias foram medidos diariamente.

A análise do potencial antimicotoxinas, foi realizada utilizando as mesmas placas feitas para a avaliação do crescimento, após os 14 dias de incubação. Para a análise da produção de aflatoxinas foi feito um processo de extração adaptado de Geisen (1996). No qual três plugues de micélio + ágar foram retirados da colônia e transferidos para microtubos. Então, 500 μL de clorofórmio foi adicionado e os microtubos centrifugados a 4000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos e 14000 rpm por 5 minutos. Após centrifugação, a fase clorofórmica foi transferida para um novo microtubo que ficou aberto até que houvesse a completa evaporação da fase líquida. Em seguida foi feita a ressuspensão do extrato seco em fase móvel, e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de acordo com Truckess et al. (1994).

Os intervalos de crescimento e a quantificação de micotoxinas foram submetidos a análise de variância (ANOVA). O nível de significância para informar as diferenças foi de $p < 0,05$. As comparações estatísticas serão realizadas entre os controles e os tratamentos (SAMPAIO, 2007).

Resultados e Discussão

A velocidade de crescimento (mm/dia) e fase lag (h) de *A. parasiticus* frente a ação de NPs ZnO se encontram descritas na Tabela 1. Esses parâmetros de crescimento revelaram o potencial antifúngico das nanopartículas de óxido de zinco nas três concentrações testadas; pois houve uma redução estatisticamente significativa do crescimento de *A. parasiticus* nas concentrações 1, 3 e 5 mg mL^{-1} , frente ao controle.

Trabalhos Apresentados

Tabela 1: Média e desvio padrão dos parâmetros de crescimento de *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 frente às diferentes concentrações de nanopartículas de óxido de zinco.

Parâmetros	Concentrações (mg mL ⁻¹)			
	0	1	3	5
Velocidade de crescimento (mm/dia)	2,55 ± 0,11 ^a	2,13 ± 0,04 ^b	1,86 ± 0,12 ^b	1,59 ± 0,21 ^b
Fase lag (h)	0,37 ± 4,20 ^a	24,77 ± 7,97 ^b	27,4 ± 3,7 ^b	49,17 ± 9,5 ^c

^{a-c} Dados significativamente diferentes pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)

As nanopartículas de óxido de zinco, nas três concentrações testadas, reduziram significativamente a produção das aflatoxinas B1, B2 e G2. Entretanto a aflatoxina G1 apresentou estabilidade de produção na maior concentração (5 mg mL⁻¹), e aumento significativo nas concentrações 1 e 3 mg mL⁻¹ (Tabela 2), em relação ao controle.

Tabela 2: Produção média de aflatoxinas (G2, G1, B2, B1), em ppb, por *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 sob diferentes concentrações de nanopartículas de óxido de zinco.

Aflatoxinas (AFs) (ppb)	Concentrações (mg mL ⁻¹)			
	0	1	3	5
AF G2	41,39 ± 4,89 ^a	7,12 ± 2,79 ^b	6,57 ± 0,73 ^b	2,58 ± 1,09 ^b
AF G1	531,30 ± 41,26 ^c	476,57 ± 126,09 ^d	318,20 ± 14,63 ^d	253,61 ± 84,57 ^c
AF B2	41,86 ± 10,83 ^e	8,69 ± 3,59 ^f	8,08 ± 0,37 ^f	2,87 ± 1,10 ^f
AF B1	1020,98 ± 341,76 ^g	354,58 ± 78,50 ^h	350,26 ± 176,88 ^h	214,29 ± 46,96 ^h

^{a-h} Dados significativamente diferentes pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)

Apesar de não haver um consenso sobre qual o mecanismo de ação das nanopartículas de óxido de zinco frente ao crescimento de fungos filamentosos e a interferência na produção de micotoxinas, através desse estudo foi possível observar um potencial antifúngico e antimicotoxinas promissor. Os resultados mostrados tanto para o crescimento fúngico quanto para produção de micotoxinas estão em concordância com estudos realizados em outras espécies fúngicas. Savi et al. (2013) relataram a atividade antifúngica de nanopartículas de óxido de zinco frente ao crescimento de *Fusarium verticillioides*. Também detectaram a completa inibição da produção de fumonisina B1 pela cepa analisada (SAVI et al., 2003). Outra espécie de *Fusarium* sp., *F. graminearum*, além de *Aspergillus flavus* e *Penicillium citrinum* também apresentaram crescimento reduzido, dependente da concentração e tempo. Além disso, a produção de deoxinivalenol e aflatoxina B1 também apresentaram redução significativa, entretanto a produção de citrinina se manteve estável (SAVI; BORTOLUZZI; SCUSSEL, 2013). A concentração de 12 mmol L⁻¹ NPs ZnO também foi a mais efetiva para inibir a produção de ácido fusárico e patulina por *F. oxysporum* e *P. expansum* (YEHIA; AHMED, 2013).

Outros fungos contaminantes como *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum* também apresentaram o crescimento inibido de maneira concentração-dependente, sendo 12 mmol L⁻¹ de ZnO NPs a concentração máxima analisada (HE et al., 2011). O fungo contaminante de café *Erythricium salmonicolor* teve seu crescimento reduzido sob 9 mmol L⁻¹ NPs ZnO, além disso, essa colônia apresentou mudanças morfológicas, margens, textura, área e forma, significativas (ARCINIEGAS-GRIJALBA et al., 2017). Jamdagni, Khatri e Rana (2018) observaram efeitos antifúngicos sob *Alternaria alternata*, *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *P. expansum*, tendo a melhor concentração inibitória mínima sido de 16 µg mL⁻¹ para *A. niger*

Trabalhos Apresentados

(JAMDAGNI; KHATRI; RANA, 2018). Por outro lado, Consolo, Torres-Nicolini, Alvarez (2020) não detectaram atividade antifúngica significativa de NPs ZnO nas espécies fitopatogênicas *Alternaria alternata* e *Pyricularia oryzae* (CONSOLO; TORRES-NICOLINI; ALVAREZ, 2020). Entretanto, é importante salientar, que o tamanho, forma e método de síntese das nanopartículas afetam diretamente as suas propriedades, e em consequência, a capacidade antifúngica. Portanto, a discordância detectada entre os diferentes trabalhos apenas evidencia a necessidade de se buscar entender melhor o mecanismo de ação das NPs e quais as características ideais para se ter um produto eficiente.

Conclusão

As nanopartículas de óxido de zinco possuem um potencial antifúngico e antiaflatoxigênico relevante, podendo se tornar uma nova alternativa viável para a utilização como controle e prevenção de fungos e micotoxinas.

Referências Bibliográficas

ARCINIEGAS-GRIJALBA, P.A.; PATIÑO-PORTELA, M.C.; MOSQUERA-SÁNCHEZ, L.P.; GUERRERO-VARGAS, J.A.; RODRÍGUEZ-PÁEZ, J.E. ZnO nanoparticles (ZnO-NPs) and their antifungal activity against coffee fungus *Erythricium salmonicolor*. **Applied Nanoscience**. v. 7, p. 225-241. 2017.

BENNET, J.W. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and Mycopathologia. **Mycopathologia**. v.100, p.3-5, 1987.

CAST. **Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems**. n. 139, Iowa: CAST, 2003. p. 199.

CONSOLO, V.F.; TORRES-NICOLINI, A.; ALVAREZ, V.A. Mycosynthetized Ag, CuO and ZnO nanoparticles from a promising *Trichoderma harzianum* strain and their antifungal potential against important phytopathogens. **Scientific Reports**. v. 10, n. 20499, p. 1-9.

ESPITIA, P.J.P.; SOARES, N.F.F.; COIMBRA, J.S.R.; ANDRADE, N.J.; CRUZ, R.S.; MEDEIROS, E.A.A. Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications. **Food Bioprocess Technol**. v. 5, p. 1447–1464. 2012.

FERRE, F. S. Worldwide occurrence of mycotoxins in rice. **Food Control**. v. 61, p. 291-298, 2016.

GEISEN, R. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 19, n. 3, p. 388-392, 1996.

HE, L.; LIU, Y.; MUSTAPHA, A.; LIN, M. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. **Microbiological Research**. v. 166, p. 207-215. 2011.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Monograph of Aflatoxins. Disponível em: <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F-23.pdf>. Acessado em: 24 de Dezembro de 2021.

JAMDAGNI, P.; KHATRI, P.; RANA, J.S. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using flower extract of *Nyctanthes arbor-tristis* and their antifungal activity. **Journal of King Saud University – Science**. v. 30, p. 168-175. 2018.

MODY, V.V.; SIWALE, R.; SINGH, A.; MODY, H.R. Introduction to metallic nanoparticles. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**. v. 2, n. 4, p. 282–289, 2010.

Trabalhos Apresentados

OSTRY, V.; MALIR, F.; TOMAN, J.; GROSSE, Y. Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. **Mycotoxin Research**. v. 33, n. 1, p. 65-73, 2017.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 2nd ed. Cambridge: Chapman & Hall. 1997.

ROCHA, M.E.B; FREIRE, F.C.O.; MAIA, F.E.F.; GUEDES, M.I.F.; RONDINA, D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**. v. 36, p. 159–165, 2014.

ROTELLO, V.M. Special Issue: Interfacing Inorganic Nanoparticles with Biology. **Bioconjugate Chem**. n. 28, p. 1–2. 2017.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. 3. ed. Belo Horizonte: FEP-MVZ. v. 1. p. 264. 2007.

SAVI, G.D.; BORTOLUZZI, A.J.; SCUSSEL, V.M. Antifungal properties of Zinc-compounds against toxigenic fungi and mycotoxin. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 48, p. 1834-1840. 2013.

SAVI, G.D.; VIROTINO, V.; BORTOLUZZI, A.J.; SCUSSEL, V.M. Effect of zinc compounds on *Fusarium verticillioides* growth, hyphaealterations, conidia, and fumonisin production. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 93, p. 3395-3402. 2013.

SIRELKHATIM, A; MAHMUD, S.; SEENI, A.; KAUS, N.H.M.; ANN, L.C.; BAKHORI, S.K.M.; HASAN, H.; MOHAMAD, D. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. **Nano-Micro Letters**. v. 7, n. 3, p. 219–242. 2015.

VASILACHE, V.; POPA, C.; FILOTE, C.; CRETU, M.; BENTA, M. Nanoparticles applications for improving the food safety and food processing. **7th International Conference on Materials Science and Engineering**. v. 12, n. 1 (31). p. 77-81 2011.

YEHIA, R.S.; AHMED, O.F. *In vitro* study of the antifungal efficacy of zinc oxide nanoparticles against *Fusarium oxysporum* and *Penicillium expansum*. **African Journal of Microbiology Research**. v.7, n. 19, p. 1917-1923. 2013.

Autor(a) a ser contatado: Kelly Moura Keller, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Avenida Antônio Carlos nº 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. 30123-970. kelly.medvet@gmail.com