

SUPRESSÃO DE *ASPERGILLUS* PRODUTORES DE AFLATOXINAS E ÁCIDO CICLOPIAZONICO POR OZÔNIO

OTNIEL FREITAS-SILVA^{1,2}; ARMANDO VENÂNCIO²

1. Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, Rio de Janeiro-RJ, ofreitas@deb.uminho.pt

2. IBB- Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal. avenan@deb.uminho.pt

ABSTRACT: FREITAS-SILVA, O.; VENÂNCIO, A. Aflatoxins and cyclopiazonic acid producer strains suppressed by aqueous ozone. Ozone is a potential antioxidant substance with effect against microorganism. Four ozone concentrations (0, 1, 10 and 20 mg/L) were applied for 10 minutes to *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* spores suspensions (10^3 cfu/mL). Aqueous ozone was effective against both isolates at the lowest ozone concentration tested. Under the tested conditions, spores inactivation was from 91 to 100%. All ozone treatments performed effective fungi control. The two isolates used in these assays were screened for mycotoxin production by HPLC. The *A. flavus* strain produced cyclopiazonic acid and Aflatoxin B₁ and the *A. parasiticus* strain produced Aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂. The ozone effect on these mycotoxins was not evaluated.

Keywords: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and aqueous ozone.

INTRODUÇÃO

O ozônio é um gás com alto poder oxidante, conferido pela formação de radicais hidroperóxido (HO_2), hidroxila (OH) e superóxido (O_2), possui efeitos antimicrobianos (KIM *et al.*, 1999). Inicialmente, seu uso se deu em processos de purificação da água (TORRES *et al.*, 1996). Em 1982, o ozônio foi declarado pelo FDA (Food and Drug Administration) como uma substância reconhecidamente segura (GRAS - *Generally Recognized as Safe*), com uso permitido apenas como sanificante para água engarrafada (FDA, 2008). Alguns anos mais tarde, sua utilização foi estendida aos alimentos (KIM *et al.*, 1999; GIL; TOMÁS-BARBERÁN, 2005). Atualmente, o ozônio vem ganhando destaque na sanificação de alimentos em substituição ao cloro, já que este apresenta problemas de contaminação ambiental e ocupacional, devido a formação de subprodutos altamente tóxicos e cancerígenos: os trihalometanos (THMs). Entretanto, para que esta substituição ocorra de forma segura sob o ponto de vista microbiológico, econômico e de saúde são necessários estudos adicionais. Em temperaturas ambiente e refrigerada, o ozônio é um gás com odor característico podendo ser detectado pelo olfato humano, em concentrações que variam entre 0,02 e 0,04 ppm (KIM *et al.*, 1999; KHADRE, *et al.*, 2001). Sua alta capacidade oxidante é conferida por seu potencial de oxidação de -2,07 volts (V), que o torna 1,5 vezes mais forte e eficaz que o cloro e outros sanificantes contra várias espécies de microorganismos (FORNEY, 2003; KIM *et al.*, 1999; XU, 1999). A solubilidade do ozônio em água não ocorre completamente e depende de fatores como pressão parcial e temperatura, pureza da água; na medida em que a presença de minerais e matéria orgânica pode exercer a função de catalizadores do ozônio aumentando sua decomposição (KHADRE *et al.*, 2001). Com meia-vida curta, aproximadamente 20 minutos em temperatura ambiente (XU, 1999), sua estabilidade em soluções aquosas é afetada pelo valor do pH, numa relação inversamente proporcional. O tipo de microorganismo, bem como a idade da cultura, a densidade da população tratada, presença de compostos na solução com

demanda de O₃, formas de aplicação do O₃, acuracidade dos métodos de quantificação de ozônio e procedimento para avaliar a eficácia antimicrobiana são aspectos apontados por alguns estudos que podem interferir na sensibilidade do microorganismo ao O₃ (KIM *et al.*, 1999; KHADRE, *et al.*, 2001). Quanto ao efeito do ozônio nas micotoxinas foi evidenciado o potencial do ozônio gás e aquoso nas aflatoxinas B₁, e G₁ (Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems, 2003; MCCKENZIE *et al.*, 1997,), em milho contaminado houve uma redução de 92% das aflatoxinas, sem recontaminação de micotoxinas após o tratamento com o ozônio (PRUDENTE JR.; KING, 2002). Tendo em vista que o ozônio é um potente sanitizante de aplicação promissora e que algumas agroindústrias já vêm utilizando-o em seu processo de sanificação, este trabalho busca avaliar o efeito do ozônio em solução aquosa sobre a inativação de esporos de *Aspergillus flavus* e de *A. parasiticus*, produtores de aflatoxinas e de ácido ciclopiazônico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Dois isolados de *Aspergillus* do grupo flavus, provenientes de castanha-do-brasil, foram utilizados na verificação dos efeitos fungicida de Ozônio. As culturas fungicas foram crescidas em MEA (extrato de malte ágar), por 7 dias/25 °C. Os fungos foram testados quanto a produção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico em Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi preparada em água peptonada uma suspensão de conídios com cerca de 300 esporos, separadas em duas alíquotas: uma para tratamento com Ozônio e outra de controle. Um mL de suspensão de esporos foi filtrada e adicionada ozônio aquoso, a diferentes concentrações. Após 10 minutos de contacto, a suspensão foi filtrada (filtro 0,2 µm) e o filtro plaqueado diretamente em MEA (extrato de malte ágar). Após 5 dias, determinou-se as unidades formadoras de colônia e calculou-se a taxa de inativação, pelo quociente entre os valores obtidos para cada tratamento e o valor no controle. A concentração de ozônio em água foi de 20, 10 e 1 mg/L, além do controle 0 mg/L (água destilada refrigerada). A água saturada com ozônio foi preparada por borbulhamento de gás, gerado pela passagem de oxigênio extra seco através de um reator (Modelo COM-CD-HF-4) durante 10 min (potência do gerador a 100%; caudal gasoso de 25 L/hora) em frasco com 1000 mL de água ultrapura autoclavada e refrigerada em banho de gelo, de modo a manter a solução a uma temperatura de 2 °C. A concentração de final de ozônio em água foi determinada pelo índice colorimétrico em espectrofotometro, com medição a 258 nm (BADER; HOIGNE, 1981).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolado cast1 (*A. flavus*) produziu ácido ciclopiazônico e AFB₁, enquanto o isolado cast 2 (*A. parasiticus*) produziu AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, características comuns aos fungos testados. Quanto ao uso do ozônio, as taxas de inativação obtidas (Tabela 1) variaram entre entre 91 e 100%, para as concentrações de ozônio testadas. Os resultados obtidos foram similares aos de BEUCHAT *et al.* (1999) quando avaliaram a sensibilidade de *A. flavus* e *A. parasiticus* ao vapor de ozônio. O que permite concluir que o ozônio é eficaz no controle das estirpes testadas. Por ter o ozônio demonstrado eficaz controle de conídios de *A. flavus* e *A. parasiticus*, o uso do mesmo em solução aquosa pode ser recomendado para o controle de *Aspergilli* produtores de micotoxinas. Entretanto, são necessários experimentos adicionais para o ajuste do método para utilização em *packing house* de castanha-do-brasil. Principalmente, quanto ao ajuste da concentração do produto em relação a matriz

vegetal, contabilização do custo / benefício e limitações, entre as quais o comprometimento da vida útil do produto tratado, a saúde das pessoas expostas ao ozônio no ambiente de trabalho e ajuste de dosagem e monitorização das concentrações, para o controle efetivo de fungos produtores de aflatoxinas.

Tabela 1- Taxas de inativação de conídios em função da concentração de Ozônio aquoso (média de duas determinações)

Concentrações de Ozônio (mg /L)	Taxa de Inativação (%)	
	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>
1	94	91
10	96	100
20	92	98

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BADER, H.; HOIGNE, J. Determination of ozone in water by the indigo method. **Water Research**, v.15, p. 449–456, 1981.

BEUCHAT, L.R. ; CHMIELEWSKI, R.; KESWANI, J.; LAW, S.E.;FRANK, J.F. Inactivation of aflatoxigenic *Aspergilli* by treatment with ozone. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 202–205, 1999.

FDA (Food and Drug Administration). **Direct Food Substances Affirmed as Generally Recognized as Safe**. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184.1563>>. Acesso em: 08 mai. 2008.

FORNEY, C.F. Postharvest Response of Horticultural Products to Ozone. In: Hodges, D.M. **Postharvest Oxidative Stress in Horticultural Crops**. N. Y.:Food Products Press, 2003. Cap. 2, p. 13 -53.

GIL, M.I.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Uso de ozono en la conservación. In: AGUILAR, G. A. G.; GARDEA, A. A.; NAVARRO, F. C. **Nuevas Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados**. 1ª ed., Espanha, CIAD, 2005. Cap. 18, p. 400 – 412.

KHADRE, M.A.; YOUSEF, A.E.; KIM, J.G. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. **Journal of Food Science**. v.66, n.9, p.1242-1252, nov., 2001.

KIM, J.G.; YOUSEF, A.E.; DAVE, S.A. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. **Journal of Food Protection**. v.62, p.1071-1087, 1999.

Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems By the Task Force on Mycotoxins. **Council for Agricultural Science and Technology**, 4420 W Lincoln Way, Ames, IA 50014-3447. ISBN 1-887-38322-0. 199 pp.; 2003.

MCKENZIE K.S., SARR, A.; MAYURA, K.; BAILEY, R.H.; MILLER, D.R.; ROGERS, T.D.; NORRED, W.P.; VOSS, K.A.; PLATTNER, R.D.; PHILLIPS, T.D. Chemical degradation of diverse mycotoxins using a novel method of ozone production. **Food Chem Toxicol**, v. 35, p.807–20, 1997.

PRUDENTE JR., A.D.; KING, J.M Efficacy and Safety Evaluation of Ozonation to Degrade Aflatoxin in Corn. **Journal of Food Science**, v. 67, n.8, p.2866–2872, 2002

TORRES, E.A.F.S., *et al.* Estudo das Propriedades Desinfetantes do Ozônio em Alimentos. **Higiene Alimentar**. v.10, n.42, p.18 – 23, mar.- abr., 1996.

XU, L. Use of Ozone to Improve the Safety of Fresh Fruits and Vegetables. **Food Technology**. v.53, n.10, p. 58 – 62, oct., 1999.