

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**Bruno Ludvig Tracz**

**AÇÃO DO ISOTIOCIANATO DE ALILA SOBRE FUNGOS  
MICOTOXIGÊNICOS E DETERIORANTES DE ALIMENTOS**

**SÃO JOSÉ DOS PINHAIS**

**2015**

**BRUNO LUDVIG TRACZ**

**AÇÃO DO ISOTIOCIANATO DE ALILA SOBRE FUNGOS  
MICOTOXIGÊNICOS E DETERIORANTES DE ALIMENTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Fernando B. Luciano  
Coorientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.Renata E. F. Macedo

**SÃO JOSÉ DOS PINHAIS**

**2015**

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	Vi
<b>FORMATO DA DISSERTAÇÃO.....</b>	Viii
<b>RESUMO GERAL.....</b>	Ix
<b>ABSTRACT.....</b>	Xi
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	Xiii
<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	Xiv
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	Xv

### **CAPÍTULO 1**

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
--------------------------	----------

### **CAPÍTULO 2**

<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1 PERDAS POR DETERIORAÇÃO DOS ALIMENTOS E CUSTOS RELACIONADOS COM A CONTAMINAÇÃO POR MICOTOXINAS.....	4
2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS MICOTOXINAS.....	5
2.3 DEFINIÇÃO E CONSERVAÇÃO DE QUEIJO MUÇARELA.....	12
2.3.1 Deterioração do queijo muçarela por fungos filamentosos.....	14
2.4 DETERIORAÇÃO DO MILHO POR FUNGOS FILAMENTOSOS.....	16
2.5 CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS.....	18
2.5.1 Óleos essenciais.....	19
2.5.1.1 Óleos essenciais derivados de glucosinolatos e sua atividade biológica.....	20

### **CAPÍTULO 3**

<b>3 DISPOSITIVOS CONTENDO ISOTIOCIANATO DE ALILA CONTRA O CRESCIMENTO DE FUNGOS DETERIORANTES E MICOTOXIGÊNICOS EM QUEIJO MUÇARELA.....</b>	<b>24</b>
Resumo.....	24
Abstract.....	26
3.1 INTRODUÇÃO.....	27
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.2.1 Microrganismos e compostos químicos.....	28
3.2.2 Modelos do filtro, adesivo e sachê antimicrobiano.....	29
3.2.3 Contaminação fúngica e embalagem do queijo muçarela.....	30
3.2.4 Procedimentos para a extração das micotoxinas.....	31
3.2.5 Determinação de micotoxinas por LC-MS/MS.....	32
3.2.6 Análise estatística.....	33
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
3.4 CONCLUSÃO.....	38

#### **CAPÍTULO 4**

<b>4 ISOTIOCIANATO DE ALILA COMO AGENTE DE PREVENÇÃO NA PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS EM MILHO CONTAMINADO COM DIFERENTES ESPÉCIES FÚNGICAS.....</b>	<b>39</b>
Resumo.....	39
Abstract.....	40
4.1 Introdução.....	41
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.2.1 Compostos químicos e cepas fúngicas.....	43
4.2.2 Condições do milho e das culturas fúngicas.....	43
4.2.3 Procedimento de extração das micotoxinas.....	44
4.2.4 Determinação de micotoxinas por LC-MS/MS.....	44
4.2.5 Análise Estatística.....	45

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.4 CONCLUSÃO.....	51

## **CAPÍTULO 5**

<b>5 CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>52</b>
-------------------------------	-----------

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>
-------------------------	-----------

## **AGRADECIMENTOS**

**Eu gostaria de agradecer ao Professor Fernando Bittencourt Luciano, por todo o apoio, paciência, incentivo e dedicação que recebi durante todo o período do mestrado. Todas as oportunidades de trabalho proporcionadas por ele me fizeram perceber a importância da seriedade, do comprometimento e da ética no campo da pesquisa.**

**À minha co-orientadora Professora Renata E. F. Macedo, por sempre estar disponível para auxiliar e sanar as minhas dúvidas durante todo o período do meu trabalho no laboratório.**

**Ao Professor Giuseppe Meca e à Professora Guadalupe García Llata, por me receberem de braços abertos na Universitat de Valencia e por proporcionarem momentos extremamente importantes no âmbito da minha vida pessoal e profissional.**

**Aos meus colegas de laboratório no Brasil e na Espanha (Suellen Henrichs, Natália Maia, Rachel Rigotti, Hanna Wolupeck, Samara Moraes, Tiago de Melo Nazaré, Valério Colasante, Valentina Cognolato, Khaoula Chamari, Steffi Kö, Francesco Cinquina e Marta Passoni) por tornarem as horas dentro do laboratório divertidas e as horas do café mais e mais atrativas.**

**Aos meus colegas “micointoxicados”, Irene Marco, Juan Manuel Beses, Maria Montero Mondría e Paula Pastor Giner, por auxiliarem em todos os processos da minha pesquisa.**

**Aos meus pais, que foram os primeiros a incentivarem a seguir o caminho da pesquisa e por sempre apoiarem em todas as decisões da minha vida. Obrigado**

por ensinarem que “se eu fizer tudo com amor, o resultado sempre será positivo”.

E finalmente à Larissa Duda, minha querida namorada, obrigado pelo seu apoio, pela incansável dedicação e carinho durante todo o mestrado.

## FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos.

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral dos objetivos desta dissertação.

O capítulo 2 trata-se de uma revisão de literatura.

O capítulo 3 refere-se aos estudos experimentais desenvolvidos sobre a ação de dispositivos antimicrobianos contendo isotiocianato de alila sobre fungos deteriorantes e micotoxigênicos de queijos e que é base de um artigo que será submetido para um periódico científico.

O capítulo 4 refere-se aos estudos experimentais desenvolvidos sobre a ação do isotiocianato de alila para reduzir a produção de micotoxinas por fungos filamentosos em milho e que é base de um artigo que será submetido para um periódico científico.

O capítulo 5 finaliza esta dissertação com conclusões gerais deste trabalho e sugerindo estudos futuros.

As referências de todos os capítulos se encontram em lista única ao final da dissertação.

## RESUMO GERAL

A presença de fungos e suas toxinas em alimentos podem provocar alterações sensoriais nestes produtos e problemas de saúde nos consumidores, podendo acarretar em grandes perdas econômicas para o setor agro-industrial. Para evitar estes problemas, muitos alimentos são adicionados de conservantes sintéticos, que possuem uma imagem ruim perante o público consumidor. A alternativa de substituir os conservantes sintéticos por conservantes naturais é amplamente estudada, sendo de grande relevância a aplicação de óleos essenciais que possuem ação bactericida, fungicida, antiparasitária e inseticida. Em decorrência da necessidade de proteger os alimentos contra contaminações fúngicas, esta dissertação teve como objetivos: analisar a ação antifúngica do isotiocianato de alila (AIT), principal composto do óleo essencial de mostarda marrom e negra; verificar a capacidade do AIT em reduzir a quantidade de micotoxinas produzidas por fungos; validar a utilização de dispositivos antimicrobianos para aumentar a vida de prateleira e a segurança alimentar de queijo muçarela; e prevenir o crescimento de fungos micotoxigênicos em grãos de milho. No primeiro trabalho experimental, foram testados três dispositivos antimicrobianos contendo AIT contra o crescimento de *Penicillium digitatum* e *Aspergillus parasiticus* inoculados em fatias de queijo muçarela. As fatias foram embaladas em saco ou em bandeja compostos por plástico de alta retenção de oxigênio e hermeticamente fechados. As embalagens receberam os seguintes dispositivos antimicrobianos: papel filtro com AIT, adesivo com AIT ou sachê contendo farinha de mostarda oriental e água. O AIT foi adicionado em concentrações de 2, 4, 8 ou 16 ppm (o cálculo teórico de produção de AIT foi feito para os sachês contendo farinha de mostarda e água). Os tratamentos foram comparados com um controle ausente de AIT. O dia em que o crescimento dos fungos foi visualmente detectável foi considerado como fim da vida útil destes produtos. As embalagens foram inspecionadas diariamente por 60 d. O crescimento visual de *P. digitatum* no grupo controle foi observado após  $19,2 \pm 1,4$  d em bandeja e  $26,6 \pm 2,1$  d em saco plástico, enquanto que o crescimento de *A. parasiticus* foi perceptível após  $41,4 \pm 1,7$  d e  $28,4 \pm 1,5$  d em bandeja e saco plástico, respectivamente. Todos os queijos tratados com AIT não apresentaram crescimento fúngico visual por 60 d. No entanto, AFB<sub>1</sub> estava presente no controle ( $6,93 \pm 1,23$  mg/kg) e nos grupos tratados com 2 ppm de AIT: papel filtro com  $0,030 \pm 0,004$  mg/kg; adesivos com  $0,56 \pm 0,127$  mg/kg; e sachê com  $2,015 \pm 0,049$  mg/kg. Estes resultados demonstram que os três dispositivos antimicrobianos testados foram capazes de aumentar a vida de prateleira do queijo muçarela fatiado e que reduzem a produção de AFB<sub>1</sub> por *A. parasiticus*, aumentando a segurança alimentar deste produto, quando utilizado em doses de 4 ppm ou superiores. A capacidade do AIT em prevenir o crescimento de fungos micotoxigênicos (*Aspergillus parasiticus*, *Fusarium tricinctum*, *Fusarium verticillioides*, *Alternaria alternata* e *Gibberella zeae*) em grãos de milho também foi avaliada. Para tanto, os grãos de milho foram tratados com AIT gasoso na concentração de 50, 100 ou 500 ppm durante 48 h em frascos herméticos. Então, o AIT foi liberado durante 24 h e 100 g de milho foram inoculados com  $10^5$  conídios/g de uma espécie fúngica (cada fungo foi inoculado em 3 frascos distintos para cada dose). Os frascos foram mantidos a 23°C durante 30 d, e então o milho foi processado para a quantificação de micotoxinas por LC-MS. As micotoxinas foram produzidas em todos os

grupos controle (sem tratamento com AIT): 119,74 mg/kg de aflatoxinas; 10,84mg/kg de eniatinas; 4,18 mg/kg de fumonisina B<sub>1</sub>; 3,59 mg/kg de alternariol; 2,73 mg/kg de HT-2 e 3,28 mg/kg de zearalenona. Todas as doses de AIT foram capazes de penetrar o grão de milho e as doses residuais que permaneceram nos grãos após as 24 h em que os frascos ficaram abertos foram capazes de inibir a produção de micotoxinas pelas espécies fúngicas testadas. Nesta dissertação foi demonstrado que o AIT pode ser incorporado em embalagens bioativas para aumentar o prazo de validade e a segurança de queijo muçarela. Além disso, sugere-se que baixas doses de AIT ( $\leq 50$  ppm) poderiam ser utilizadas para fumigar embalagens ou silos de estocagem de milho para evitar a produção de micotoxinas nestes produtos.

**Palavras-chave:** Óleo essencial; queijo; milho; deterioração fúngica; micotoxinas.

## ABSTRACT

The occurrence of fungi and their toxins in food can cause changes in sensory properties in the products, health problems for consumers, resulting in a huge economic loss for the agro-industrial sector. To avoid these problems, in lot of foods are added synthetic preservatives, wich have a bad image for the consumers. The alternative to replace chemical preservatives by natural preservatives is extensively studied by applying various essential oils that have some characteristics like bactericides, fungicides, pesticides and antiparasitic. Due to the need to protect food against fungal contamination, this thesis aimed to: analyze the antifungal action of allylthiocyanate (AITC), main compound of mustard essential oil and oriental mustard flour; verify the ability of this compound to reduce the amount of mycotoxins produced by fungi; validating the use of antimicrobial devices to increase the shelf-life of sliced mozzarella cheese; prevent the growth of fungi in maize. In the first project we tested three antimicrobial devices containing allylthiocyanate (AITC) against growth of *Penicillium digitatum* and *Aspergillus parasiticus* inoculated in sliced mozzarella cheese. The slices were packaged in either a thermo-sealed plastic bag or a hermetically closed plastic tray. The packages received the following devices: filter paper added AITC, sticker containing AITC and sachet containing mustard meal and water. The AITC was added at concentrations of 2, 4, 8 or 16 ppm (theoretical calculation of AITC production were made with mustard flour and water). The treatments were compared to a control that was not added AITC. The day when the fungal growth was visually detectable was considered as the end of the product's shelf life. Packages were inspected daily for 60 days. Visual growth of *P. digitatum* for the control was observed after  $19.2 \pm 1.4$  days in bags and  $26.6 \pm 2.1$  days in trays, whereas *A. parasiticus* was visually detectable after  $41.4 \pm 1.7$  days and  $28.4 \pm 1.517$  days in bags trays, respectively. All AITC – treated cheese did not present visual fungal growth for 60 days. However, AFB<sub>1</sub> was present in control ( $6.93 \pm 1.23$ mg / kg) and in the groups treated with AIT at 2ppm: paper filter with  $0.030 \pm 0.004$  mg/kg; sticker with  $0.56 \pm 0.127$  mg/kg; and meal with water  $2.015 \pm 0.049$  mg/kg. These results demonstrate that all three antimicrobial devices tested were able to increase the shelf life of the sliced mozzarella and to reduce the production of AFB<sub>1</sub> by *A. parasiticus*, increasing the food security of this product. The ability of AITC in preventing mycotoxigenic fungi (*Aspergillus parasiticus*, *Fusarium tricinctum*, *Fusarium verticillioides*, *Alternaria alternata* and *Gibberella zeae*) was evaluated in corns. Therefore, the corn kernels were treated with gaseus AITC at concentration of 50, 100 and 500ppm in sealed flasks for 48 hours, then the AITC was released during 24 hours and 100g of maize were inoculated with  $10^5$ conidia/g of either fungal species (each fungal specie was inoculated in 3 different flasks for each dose). The flasks were kept at 23 ° C for 30 days prior to quantification of mycotoxins analyses by LC-MS. Doses of mycotoxin were produced in all control groups (no AITC treatment): 119,74mg/kg of aflatoxins, 10,84 mg/kg of enniatins; 4,18 mg/kg of fumonisin B<sub>1</sub>; 3,59 mg/kg of alternariol; 2,73mg/kg of HT-2 and 3,28 mg/kg of zearalenone. All doses of AIT were able to penetrate the corn grain and the residual dose remained in the grains after 24 h, the flasks were open and were able to completely inhibit the production of mycotoxins form the fungal species tested. This thesis has been demonstreded the ability of AITC

incorporated in antimicrobial devices to increase the shelf life of mozzarella cheese. Furthermore, it's proposed that low doses of AITC ( $\leq 50$  ppm) could be used as a fumigant in packaging or in grains store silo to prevent the growth of mycotoxigenic fungi in these products.

**Keywords:** Essential oil; cheese; corn; fungal deterioration; mycotoxins

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
Tabela 2.1 Limites máximos toleráveis de micotoxinas em milho, leite e derivados lácteos de acordo com <i>FDA – Regulatory Guidance for Mycotoxins/2011</i> ; RDC nº7,2011 da Anvisa; e Comissão Europeia nº 1881/2006.....	6
Tabela 2.2 Principais micotoxinas e classificação em função da sua carcinogenicidade.....	7
Tabela 2.3 Algumas espécies produtoras de micotoxinas e a sua temperatura ideal de crescimento.....	17
Tabela 3.1 Validade do queijo muçarela inoculado com o <i>Penicillium digitatum</i> , tratado com filtro, adesivo e sachê de farinha contendo isotiocianato de alila (AIT), e embalados em bandejas e plástico de alta retenção de oxigênio.....	34
Tabela 3.2 Validade do queijo muçarela inoculado com o <i>Aspergillus parasiticus</i> , tratado com filtro, adesivo e sachê de farinha contendo isotiocianato de alila (AIT), embalados em bandejas e plástico de alta retenção de oxigênio.....	35
Tabela 3.3 Concentrações de AFB <sub>1</sub> em amostras de queijos muçarela embaladas em plásticos de alta retenção de oxigênio e adicionadas sem (controle) e com os dispositivos antimicrobianos (filtro, adesivo e sachê com farinha).....	37
Tabela 4.1 Identificação e quantificação de micotoxinas em grãos de milho tratados com diferentes concentrações de isotiocianato de alila (AIT).....	47

## LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1	Exemplos de micotoxinas, suas características químicas e patogenicidade.....	12
------------	--	----

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 2.1 Estrutura química da aflatoxina B <sub>1</sub> (AFB <sub>1</sub> ).....	8
Figura 2.2 Estrutura química da zearalenona (ZEA).....	9
Figura 2.3 Estrutura química da fumonisina B <sub>1</sub> (FB <sub>1</sub> ).....	10
Figura 2.4 Estrutura química da desoxinivalenol (DON).....	11
Figura 2.5 Estrutura química da eniatina B (ENB).....	11
Figura 2.6 Tipos e percentual quantitativo de queijos produzidos no Brasil em 2011.....	13
Figura 2.7 Aumento anual das áreas plantadas e no respectivo rendimento de diferentes grãos.....	16
Figura 2.8 Estrutura geral dos glucosinolatos e os seus produtos de degradação enzimática.....	21
Figura 3.1 Modelo do adesivo antimicrobiano contendo papel contatc, filtro com AIT e plástico de baixa retenção de oxigênio.....	29
Figura 3.2 Modelo do sachê antimicrobiano contendo farinha de mostarda e água.....	30
Figura 3.3 Cromatograma da aflatoxina B <sub>1</sub> (AFB <sub>1</sub> ) presente no grupo controle do queijo muçarela.....	38
Figura 4.1 Cromatogramas das micotoxinas presentes nos grupos controle dos grãos de milho; a) fumonisina B <sub>1</sub> (FB <sub>1</sub> ), b) alternariol (AOH) e HT-2, c) eniatina A (ENA), eniatina A <sub>1</sub> (ENA <sub>1</sub> ), eniatina B (ENB) e eniatina B <sub>1</sub> (ENB <sub>1</sub> ), d) zearalenona (ZEA) e e) aflatoxina B <sub>1</sub> (AFB <sub>1</sub> ), aflatoxina B <sub>2</sub> (AFB <sub>2</sub> ), aflatoxina G <sub>1</sub> (AFG <sub>1</sub> ) e aflatoxina G <sub>2</sub> (AFG <sub>2</sub> ).....	50

# CAPÍTULO 1

## 1 INTRODUÇÃO

Os fungos podem contaminar várias *commodities* agrícolas e são os principais responsáveis pela deterioração desses produtos. Além disso, muitos desses microrganismos são capazes de produzir metabólitos secundários conhecidos como micotoxinas, os quais, em sua generalidade, apresentam alta toxicidade e estabilidade térmica, podendo causar sérios danos à saúde humana e dos animais (Abbaszadeh et al., 2014). Os principais gêneros produtores de micotoxinas em alimentos e rações são *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Alternaria*.

A *Food and Agriculture Organization* (FAO) relatou que mais de 120 países possuem regulamentação específica para a presença de micotoxinas em alimentos (FAO, 2004). De acordo com o relatório anual do *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF), as principais notificações de rejeição de alimentos por alerta e perigo em 2012 na União Europeia foram causadas pela presença de micotoxinas em grãos (principalmente as associadas às aflatoxinas) (Marin et al., 2013).

A correta avaliação das perdas econômicas causadas pela contaminação por micotoxinas é difícil de realizar, pois ainda não há um modelo de notificação prático e coerente, com critérios a serem avaliados e considerados de maneira uniforme por todos os países. Esse modelo deve estabelecer uma relação direta entre as perdas agrícolas, o consumo de alimentos contendo micotoxinas e as doenças crônicas apresentadas por humanos e animais. Segundo Marroquín-Cardona (2014), estas perdas econômicas estão associadas com a redução da qualidade de alimentos para seres humanos, com as perdas na produção animal (baixo ganho de peso animal) e com o custo para o tratamento de micotoxicoses. Além disso, são contabilizados os gastos relacionados à detecção, identificação e quantificação dessas micotoxinas em alimentos contaminados, aliados a estratégias para reduzir a exposição dos alimentos a esses fungos deteriorantes.

A agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) estimou os custos anuais dos EUA pela perda de grãos contaminados por micotoxinas em US\$ 932 milhões (CAST, 2003). Custos adicionais por esforços na prevenção ou redução da contaminação foram calculadas em US\$ 466 milhões. Além disso, a União Européia publicou recentemente novos limites máximos de micotoxinas em diferentes produtos, o que gerou uma redução na importação de milho americano, argentino e chinês de aproximadamente US\$ 300 milhões (valor três vezes maior do que se fossem adotados os padrões norte-americanos) (Wu, 2014).

Dentro da cadeia de produção alimentar há três etapas que podem auxiliar na intervenção de contaminação por fungos e, conseqüentemente, por micotoxinas em alimentos (Leibetseder, 2006). As etapas se resumem em: prevenir a ocorrência de qualquer contaminação por microrganismos, determinar os pontos críticos de controle e estabelecer os limites críticos. A maioria dos esforços devem ser concentrados nas duas primeiras etapas, visto que, uma vez presentes nos alimentos, é extremamente difícil a eliminação de micotoxinas de forma prática.

Algumas abordagens para prevenir a produção de micotoxinas e o crescimento fúngico incluem estratégias de pré e pós-colheita, sendo utilizados métodos biológicos, físicos e químicos. Os métodos físicos de controle, como a refrigeração e a aplicação de embalagens sob atmosfera modificada (redução de O<sub>2</sub>) são eficazes para a inibição do crescimento fúngico, porém pouco viáveis para a estocagem de grãos e farináceos (Holley e Patel, 2005).

Diferentes produtos químicos têm contribuído como conservantes na preservação dos alimentos e na inibição de microrganismos patogênicos (Burt, 2004; Bakkali et al., 2008). Os principais conservantes utilizados pela indústria de alimentos para reduzir o crescimento fúngico são os sais derivados dos ácidos sórbico, benzóico e propiônico (Guynot et al., 2005). Além destes, também são utilizados o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT) e o propilparabeno (Da Cruz et al., 2013). Contudo, muitos desses conservantes químicos têm sido relacionados com efeitos carcinogênicos e de sensibilidade em consumidores (Chen et al., 2014). Muitos autores também têm relatado alta incidência de resistência fúngica frente a estes antimicrobianos

(Abdelillahet al., 2013; Zabka et al., 2013; Abbaszdeh et al., 2014; Prakash et al., 2015). Como alternativa para a utilização dos conservantes químicos em alimentos, está sendo estudada a aplicação de diversos óleos essenciais derivados de plantas (Regnault-Roger et al., 2012). Estes óleos têm sido usados como agentes bactericidas, fungicidas, antiparasitários e inseticidas, com aplicações medicinais e cosméticas (Bakkali et al., 2008). Plantas da família *Brassicaceae* possuem compostos com propriedades antimicrobianas relatadas desde a década de 1930 (Walker et al., 1937). O isotiocianato de alila é um destes compostos, sendo um óleo volátil capaz de inibir o crescimento de bactérias (Shofram et al., 1998; Nadarajah et al., 2005); fungos (Harvey et al., 2002; Dhingra et al., 2004) e protozoários (Lage, 2009). Este composto pode ser utilizado tanto na forma líquida quanto como agente de fumigação (Meca et al., 2012).

Em vista da necessidade de se preservar melhor os alimentos contra a contaminação por fungos micotoxigênicos e deteriorantes, este trabalho teve como principais objetivos 1) analisar a ação antifúngica do isotiocianato de alila e da farinha de mostarda oriental; 2) verificar a capacidade destes antimicrobianos em reduzir a quantidade de micotoxinas produzidas por fungos; 3) validar a utilização de dispositivos antimicrobianos para aumentar o prazo de validade e a inocuidade do queijo muçarela e 4) evitar o crescimento de fungos micotoxigênicos em milho.

## CAPÍTULO 2

### 2 REVISÃO DA LITERATURA

#### 2.1 PERDAS POR DETERIORAÇÃO DOS ALIMENTOS E CUSTOS RELACIONADOS COM A CONTAMINAÇÃO POR MICOTOXINAS

Mesmo com os avanços nos programas de saneamento e serviços de inspeção, ainda há grande risco no potencial de contaminação dos alimentos por microrganismos patogênicos durante toda a cadeia de produção (colheita, processamento, armazenamento e distribuição) tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento (Silveira et al., 2012).

Diversos produtos alimentares, principalmente grãos e farináceos, são frequentemente contaminados por fungos tanto na pré quanto na pós-colheita, o que pode resultar na perda da composição nutricional e no valor de mercado desses produtos (Prakash et al., 2015). A situação é mais crítica em regiões tropicais e subtropicais por serem ambientes favoráveis ao crescimento de fungos e à produção de micotoxinas. Além disso, se cuidados específicos não forem tomados durante o transporte, armazenamento e nos processos de produção, pode ocorrer um aumento do estresse oxidativo nos fungos contaminantes de produtos agrícolas, aumentando a biosíntese de micotoxinas (Prakash et al., 2015).

A contaminação agrícola por fungos produtores de micotoxinas leva a uma perda de 10% da produção de diversos grãos (Gerk e Braus, 2014). Robens e Cardwell (2003) relataram que a perda de milho, amendoim e trigo pela contaminação por aflatoxinas, fumonisinas e desoxinivalenol nos EUA é estimada entre US\$ 0,5 e 1,5 bilhão. Já Vardon et al. (2003) estimam uma perda de US\$ 500 milhões por grãos deteriorados nos EUA. Para os países africanos, com a regulamentação para as aflatoxinas, houve uma perda de US\$ 670 milhões para os produtores de alimentos (Wu, 2014).

Os limites máximos de micotoxinas presentes nos grãos e cereais se tornaram mais restritos em diversos países, principalmente na Comunidade Europeia (Wu, 2006). Desta maneira, duas consequências estão previstas para os países exportadores, a primeira é a de que os alimentos de melhor qualidade serão exportados, mantendo os grãos de menor qualidade no mercado interno, resultando em alto risco de exposição às micotoxinas pela população local, em consequência dos rígidos limites de exportação aplicados, os melhores grãos de países menos desenvolvidos poderão ser rejeitados, sinalizando desta forma, uma desvalorização do produto no mercado internacional (Wu, 2006).

## 2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS MICOTOXINAS

A palavra “micotoxina” é derivada das palavras gregas *mikes* e *toxina*, que significam fungo e veneno, respectivamente. Esses compostos se formam quando a fase de crescimento do mofo chega a sua etapa final, estando muitas vezes associada com a diferenciação celular e a esporulação (Soriano, 2007). Mais de 400 micotoxinas já foram identificadas, porém as que recebem maior atenção são as que possuem propriedades carcinogênicas, hepatotóxicas, e teratogênicas (Iqbal et al., 2014).

Atualmente, mais de 100 países estabeleceram limites máximos para as principais micotoxinas em diversos alimentos (Wu, 2014). De maior importância para o presente estudo, são apresentados na Tabela 2.1 os limites máximos tolerados para diversas micotoxinas em milho e em leite e derivados pelas legislações americana (FDA, 2011), brasileira (RDC N°7, ANVISA, 2011) e europeia (EC, 2007).

Algumas micotoxinas são consideradas mais importantes na atualidade devido à sua reconhecida toxicidade como as aflatoxinas (AFs), fumonisinas (FBs), zearalenona (ZEA), ocratoxina (OTA), patulina (PAT) e alguns tricotecenos. Contudo, existe também um grupo de compostos bioativos chamados de emergentes ou micotoxinas menores, pois não são rotineiramente analisadas e não são legisladas. No entanto, observa-se que a sua presença como contaminantes de alimentos é bastante recorrente (Vaclavikova et al., 2013). Neste grupo, estão classificadas micotoxinas como as

eniatinas (eniatina A, eniatina A<sub>1</sub>, eniatina B, eniatina B<sub>1</sub>), fusaproliferina (Fusa), beauvericina (BEA), esterigmatocistina, citrinina e o ácido ciclopiazônico (ACP) (Richard et al., 2009).

**Tabela 2.1** - Limites máximos toleráveis de micotoxinas em milho, leite e derivados lácteos de acordo com FDA – *Regulatory Guidance for Mycotoxins/2011*; RDC nº7, 2011 da ANVISA; e Comissão Europeia nº 1881/2006.

Legislação	Alimentos	Micotoxinas	Teores Máximos (µg/kg)
<b>Americana</b>			
	Leite	Aflatoxina M <sub>1</sub>	0,5
	Grãos de milho	Aflatoxinas B <sub>1</sub> ,B <sub>2</sub> ,G <sub>1</sub> ,G <sub>2</sub>	20
	Alimentos a base de milho	Aflatoxinas B <sub>1</sub> ,B <sub>2</sub> ,G <sub>1</sub> ,G <sub>2</sub>	20
	Farinha de milho*	Fumonisininas B <sub>1</sub> ,B <sub>2</sub> ,B <sub>3</sub>	2,000
	Farinha de milho**	Fumonisininas B <sub>1</sub> ,B <sub>2</sub> ,B <sub>3</sub>	4,000
	Milho para pipoca	Fumonisininas B <sub>1</sub> ,B <sub>2</sub> ,B <sub>3</sub>	3,000
	Grãos de milho na alimentação	Desoxinivalenol	5,000
<b>Brasileira</b>			
	Leite fluído	Aflatoxina M <sub>1</sub>	0,5
	Leite em pó	Aflatoxina M <sub>1</sub>	5,0
	Queijos	Aflatoxina M <sub>1</sub>	2,5
	Milho	Aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	20
	Milho em grão	Aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>1</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	20
	Milho de pipoca	Fumonisininas (B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> )	2,000
	Farinha de milho	Fumonisininas (B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> )	1,500
	Alimentos a base de milho*	Fumonisininas (B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> )	1,000
	Amido de milho e produtos a base de milho	Fumonisininas (B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> )	1,000
	Milho em grãos para processamento	Fumonisininas (B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> )	5,000
	Milho de pipoca	Zearalenona	150
	Alimentos a base de milho	Zearalenona	300
	Milho em grãos para processamento	Zearalenona	400
	Milho em grão	Desoxinivalenol	3,000
	Milho em grão para processamento	Desoxinivalenol	3,000
<b>Europeia</b>			
	Leite cru	Aflatoxinas M <sub>1</sub>	0,050
	Derivados lácteos	Aflatoxinas M <sub>1</sub>	0,050
	Milho para processamento	Aflatoxina B <sub>1</sub>	5,0
	Milho para processamento	Aflatoxina B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> ,G <sub>1</sub> ,G <sub>2</sub>	10
	Milho não transformado	Desoxinivalenol	1,750
	Frações > 500 micron de milho	Desoxinivalenol	750
	Frações ≤ 500 micron de milho	Desoxinivalenol	1,250
	Milho não transformado	Zearalenona	350
	Milho para consumo direto	Zearalenona	100
	Frações > 500 micron de milho	Zearalenona	200
	Frações ≤ 500 micron de milho	Zearalenona	300
	Milho não transformado	Fumonisininas (B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> )	4,000
	Milho para consumo direto	Fumonisininas (B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> )	1,000
	Frações > 500 micron de milho	Fumonisininas (B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> )	1,400
	Frações ≤ 500 micron de milho	Fumonisininas (B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> )	2,000

\* Farinha de milho com teor de gordura < 2,25% da base em matéria seca.

\*\* Farinha de milho com teor de gordura ≥ 2,25% da base em matéria seca.

No ano de 1993, a *International Agency of Research on Cancer* (IARC) classificou várias micotoxinas de acordo com os seguintes grupos: Grupo 1) agente cancerígeno para os seres humanos; Grupo 2) agente provavelmente cancerígeno para os seres humanos; existem evidências limitadas para seres humanos, mas suficientes para animais; Grupo 2B) agente possivelmente cancerígeno; a evidência em seres humanos é limitada e não há provas suficientes em animais experimentais; Grupo 3) Não classificável como agente cancerígeno para os seres humanos e não pode ser incluído em um outro grupo; Grupo 4) Agente provavelmente não cancerígeno para humanos; há evidências que sugerem a falta de carcinogenicidade em humanos e em animais experimentais (IARC, 2014). A Tabela 2.2 apresenta a classificação das principais micotoxinas segundo a sua carcinogenicidade e os fungos produtores.

**Tabela 2.2** - Principais micotoxinas e classificação em função da sua carcinogenicidade.

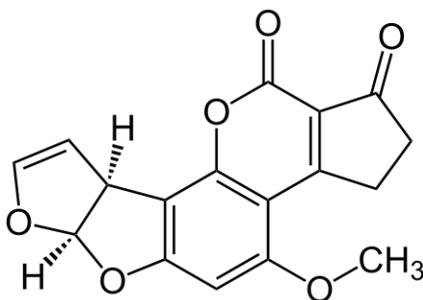
Micotoxinas	Espécies micotoxigênicas	Classificação IARC
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Aspergillus nomius</i>	1
Fumonisinias B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub>	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>Fusarium proliferatum</i> , <i>Fusarium moniliforme</i>	2B
OTA	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>	2B
T-2 e HT-2	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>Fusarium poae</i> , <i>Fusarium equisetie</i>	3
DON	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Trichotecium sp.</i> , <i>Myrothecium sp.</i>	3
ZEA	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium tricinctum</i>	3

Ocratoxina (OTA), DON (desoxinivalenol), ZEA (zearalenona). Fonte: IARC, 2014.

A presença e o perigo associado com a ingestão de uma micotoxina podem ser determinados somente depois da sua extração e quantificação, porque a presença do fungo não garante a presença de uma micotoxina. Além disso, uma micotoxina pode continuar presente no produto alimentar mesmo após a erradicação do fungo por uso de antimicrobianos ou processos térmicos. Alguns fungos também são capazes de

produzir mais de uma micotoxina e uma determinada micotoxina pode ser formada por mais de uma espécie fúngica (Carrillo, 2003).

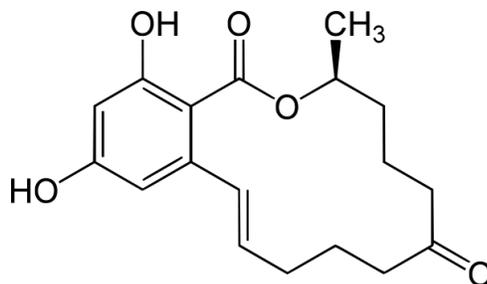
As contaminações de alimentos por aflatoxinas têm sido analisadas com frequência desde o início da década de 1960 devido ao seu alto poder carcinogênico e de genotoxicidade. Entre as aflatoxinas, a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) é a mais tóxica para os mamíferos, podendo causar hepatite tóxica, hemorragias, edemas, imunossupressão e carcinoma hepático (Iqbal et al., 2014). As aflatoxinas são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* sp., mais especificamente *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius* (Ashiq, 2014). As micotoxinas produzidas por esses fungos são AFB<sub>1</sub> (figura 2.1), AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>. As aflatoxinas M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> são as formas oxidadas da AFB<sub>1</sub>, formadas no trato digestório de ruminantes e encontradas no leite, urina e fezes desses animais (Heidtmann-Bemvenuti et al., 2011). O *Aspergillus flavus* produz somente aflatoxinas B, enquanto as outras duas espécies produzem ambas aflatoxinas B e G (Kiesling, 1986; Wu, 2006; Ashiq, 2014).



**Figura 2.1** - Estrutura química da aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>).

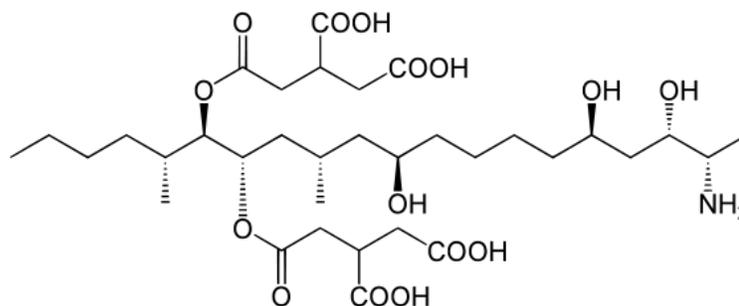
A zearalenona (ZEA) (figura 2.2), previamente conhecida como toxina F-2, é uma micotoxina estrogênica não-esteroidal sintetizada por alguns fungos do gênero *Fusarium* em países de clima quente ou temperados. Os fungos produtores de ZEA contaminam, em sua grande maioria, o milho, mas também são encontrados em cevada, aveia, trigo, sorgo, mileto e arroz (Warth et al., 2013). Esta micotoxina é capaz de estimular o crescimento de células do câncer de mama humano que são dependentes de estrogênio (Ahamed et al., 2001). Esta micotoxina é também imunotóxica e genotóxica, capaz de induzir a formação de ligações químicas no DNA

de culturas *in vitro* de linfócitos bovinos e fragmentação do DNA em células DOK, Vero e Caco-2 (Borchers et al., 2010; Ashiq, 2014).



**Figura 2.2** Estrutura química da zearalenona (ZEA).

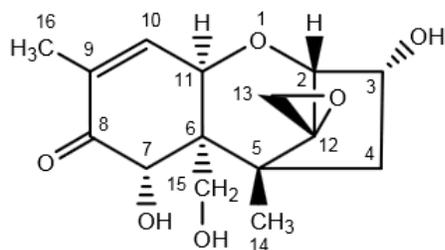
As fumonisinas (FBs) são micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium*, especialmente o *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*. Desde o descobrimento das FBs em 1998, 28 moléculas desta família foram descritas. Os compostos classificados na série B, fumonisinas B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) (figura 2.3), B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) e B<sub>3</sub> (FB<sub>3</sub>), são as mais abundantes e comumente encontrados em grãos. A FB<sub>1</sub> é o composto mais tóxico deste grupo e é responsável por 70% da contaminação de alimentos por fumonisinas no mundo (Scott, 2012). Estas micotoxinas são associadas com a leucoencefalomalácia (LEM) equina, edema pulmonar em suínos e hepatocarcinoma em ratos, além de estarem relacionadas com a inibição da síntese de esfingolípídios e proporcionarem maior risco de câncer de esôfago em humanos. Considerando todos esses fatores em conjunto, a IARC descreveu a FB<sub>1</sub> como pertencente à classe 2B, ou seja, possivelmente carcinogênica para humanos. O *F. verticillioides* e *F. proliferatum* são patógenos de cereais encontrados em todo o mundo, que causam doenças durante a germinação, causando o apodrecimento da raiz, do caule e do grão (Cendoya et al., 2014).



**Figura 2.3** Estrutura química da fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>).

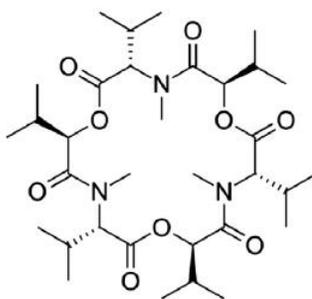
O termo tricoteceno é derivado de tricotecina, que foi um dos primeiros membros caracterizados desta família. Todos os tricotecenos contêm um esqueleto 12,13-epoxitricoteceno e uma ligação olefínica em comum, com várias substituições em suas cadeias laterais. Os tricotecenos constituem uma família de mais de 60 metabólitos sesquiterpenóides produzidos por uma variedade de gêneros fúngicos, incluindo *Fusarium*, *Myrothecium*, *Phomopsis*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* e *Trichothecium* (Escrivá, Font e Manyes, 2015). As toxinas T-2 e HT-2 pertencem aos tricotecenos do grupo A, e são encontradas em trigo, milho, aveia, cevada, arroz, feijão e soja. Estas micotoxinas são produzidas pelas espécies *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium poae*, *Fusarium equisetie*, *Fusarium acuminatum* (Heidtmann-Bemvenuti et al., 2011).

O desoxinivalenol (DON), também conhecido como vomitoxina, é uma micotoxina pertencente ao tipo B dos tricotecenos. O DON (figura 2.4) é encontrado predominantemente em trigo, cevada e milho, e com menor frequência em aveia, arroz, centeio e sorgo. Esta micotoxina pode ter efeitos adversos agudos e crônicos. Após a administração aguda, o DON produz dois efeitos toxicológicos característicos: diminuição do consumo de alimento (anorexia) e êmese. Apesar de ter menor toxicidade do que outros tricotecenos, o DON é a toxina deste grupo que apresenta maior prevalência (Richard et al., 2009). Os efeitos crônicos da DON estão relacionados com o sistema imunológico e citotoxicidade em uma variedade de espécies animais. Nos suínos, o baixo desempenho produtivo ocorre pelas alterações nos níveis bioquímicos e hematológicos, induzindo diarreia hemorrágica e choque circulatório (Streit et al., 2012; Gerez et al., 2015).



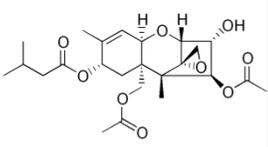
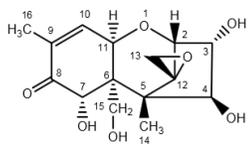
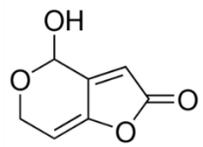
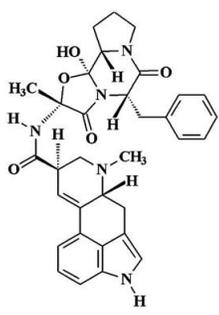
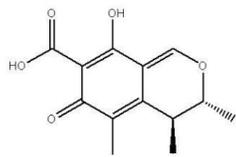
**Figura 2.4** Estrutura química do desoxinivalenol (DON).

As eniatinas (Figura 2.5) foram descobertas em 1947, através de uma cepa de *Fusarium oxysporum* (Gammelsrud et al., 2012). São sintetizadas por diferentes espécies de *Fusarium* (*F. avenaceum*; *F. poae* e *F. tricinctum*) (Logrieco et al., 2002) e encontradas em diversos grãos (Blesa et al., 2012). São compostos lipofílicos e com propriedades ionóforas, facilmente incorporadas nas membranas celulares em baixas concentrações. Estas micotoxinas atuam formando estruturas diméricas que transportam íons monovalentes através das membranas celulares, particularmente da membrana mitocondrial, alterando o equilíbrio iônico e o pH fisiológico. Dentro da célula, as forças eletroquímicas conduzem as toxinas para as organelas mitocondriais, induzindo a apoptose celular (Uhlig et al., 2006; Gammelsrud et al., 2012). Existem outros grupos de micotoxinas importantes que não são regulamentadas que estão descritas no Quadro 2.1.



**Figura 2.5** Estrutura química da eniatina B (ENB).

**Quadro 2.1** Exemplos de micotoxinas, suas características químicas e patogenicidade.

Nome da micotoxina	Fungo produtor	Efeito na saúde humana e animal	Estrutura química	Referências
T-2	Gênero <i>Fusarium</i> ( <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. equisetie</i> , <i>F. acuminatum</i> )	Imunossupressora, degeneração de condrócitos em frangos de corte.		Nascimento et al., 2001; Heidtmann-Bemvenuet et al., 2011; Escrivá, Font e Manyes, 2015.
Nivalenol (NIV)	Gênero <i>Fusarium</i> ( <i>F. cerealis</i> , <i>F. crookwellence</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. culmorum</i> e <i>F. graminearum</i> )	Aumento da incidência do câncer no esôfago e no estômago; inibição da produção de células de defesa em humanos.		Tatsuno et al., 1968; Hsia et al., 2004; Luongo et al., 2008.
Patulina (PAT)	Gêneros <i>Penicillium</i> ( <i>P. expansum</i> ), <i>Aspergillus</i> e <i>Byssoschlamys</i>	Problemas no trato gastrointestinal, rins e fígado, danos celulares (citotoxicidade e apoptose) além de sinais neurotóxicos.		Liu et al., 2007; Mohan et al., 2012; Ismaiel e Tharwat., 2014; Zhang e Talalay, 1994; Cunha et al., 2014; Zhu et al., 2015.
Alcalóides de ergot	Gêneros <i>Claviceps</i> ( <i>C. purpúrea</i> ) e <i>Neotyphodium</i> ( <i>N.coenophialum</i> , <i>N. lolii</i> )	Alteração no sistema nervoso central, contrações musculares, alterações na pressão sanguínea, imunossupressão, redução na lactação, problemas no sistema reprodutor, alucinações, vasoconstrição e gangrena.		Desjardins e Hohn, 1997; Lorenz et al., 2009; Panaccione, 2005; Richard, 2009.
Citrinina	<i>Monascus purpureus</i> ; <i>P. citrinum</i> ; <i>P. expansum</i> ; <i>P. verrucosum</i> e <i>Aspergillus</i> sp.	Alteração no sistema renal (túbulos proximais), toxicidade celular e estímulo ao citocromo C.		Yu et al. 2006; Bouslimi et al. 2008; Jia et al. 2010; Liao et al. 2014.

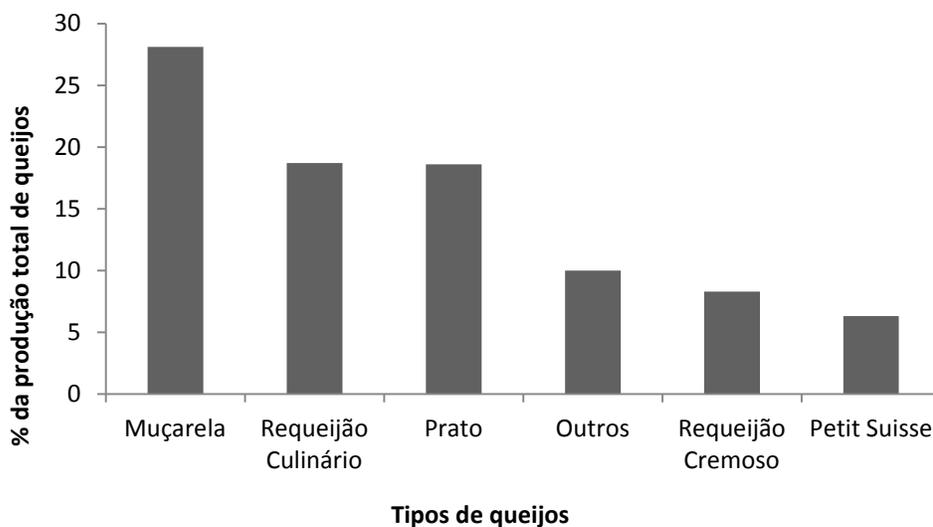
## 2.3 DEFINIÇÃO E CONSERVAÇÃO DE QUEIJO MUÇARELA

O principal tipo de queijo de massa filada produzida no Brasil é a muçarela, a qual é frequentemente utilizada no preparo de pratos quentes, sanduíches e pizzas. Este

tipo de queijo necessita apresentar propriedades funcionais, como o bom fatiamento, derretimento e estiramento (Coelho, 2012; Pizaia et al., 2003; do Valle et al., 2004).

O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) de 1952, em seu Art. 598, define o queijo como produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite constituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, enzimas específicas de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e materiais corantes.

A Associação Brasileira de Indústrias de Queijo (ABIQ) informou que foram produzidos 867,1 mil toneladas de queijos no Brasil em 2011, sendo o queijo muçarela o tipo de queijo mais produzido (conforme a figura 2.6). Em 2013, foram consumidas 1,032 milhão de toneladas de queijos no Brasil, sendo apenas 3% deste total em queijos importados (ABIQ, 2014).



**Figura 2.6** Tipos e percentual quantitativo de queijos produzidos no Brasil em 2011. Fonte: ABIQ, 2014.

Para manter os padrões de higiene e inibir o crescimento de microrganismos patogênicos em queijo muçarela, a indústria pode utilizar compostos como o nitrato de

sódio e o nitrato de potássio (Perry, 2004; Silva, 2005). Ao final da produção, o queijo muçarela é embalado com materiais plásticos que diminuem ou retiram por completo o oxigênio que está em contato com o queijo, inibindo o crescimento de bactérias proteolíticas e de fungos filamentosos. Além disso, esse queijo deve ser armazenado em ambientes sob refrigeração. No final do seu processamento, o queijo muçarela deve apresentar em média 43% a 46% de umidade, 22% a 24% de gordura, 1,6% a 1,8% de teor de NaCl e o pH entre 5,1 a 5,3 (Furtado e Lourenço Netto, 1994; Silva, 2005).

### 2.3.1 DETERIORAÇÃO DO QUEIJO MUÇARELA POR FUNGOS FILAMENTOSOS

Durante a transformação do leite em queijo, ocorre além da oxidação da lactose, a redução do oxigênio dissolvido, transformando o seu interior em um ambiente anaeróbico. Portanto, microrganismos aeróbicos estritos como *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus* e fungos filamentosos só conseguem se desenvolver na superfície dos queijos (Perry, 2004). Apesar de que a grande maioria dos queijos em bloco é embalada à vácuo, é uma prática comum no Brasil o fracionamento destas peças em fatias, que são acondicionadas aerobicamente em bandejas. Assim, a contaminação por fungos em queijo muçarela é bastante comum, provocando problemas significativos de qualidade neste produto e gerando perdas econômicas para a indústria, o comércio e o consumidor final. Além disso, muitos destes fungos podem ser produtores de micotoxinas, representando assim um grande risco para a saúde do consumidor (Kure et al., 2001; Banjara, Suhr e Hallen-Adams, 2015). Mesmo os queijos em forma de blocos embalados a vácuo, podem conter partículas de oxigênio devido à perda de impermeabilidade ou por falha no momento da retirada do oxigênio da embalagem, permitindo assim, o crescimento de fungos (Kure et al., 2001).

A contaminação microbiana dos queijos pode ser proveniente de diversas fontes, como a salmoura, os pisos, os materiais de embalagens, as facas e utensílios de corte, a câmara fria e até o ar ambiente das salas de produção (Kousta et al., 2010). De

acordo com o Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 1996) os queijos devem ser inspecionados em todas as fases, desde o seu local de origem (produção leiteira), indústrias e nos locais onde serão vendidos ou consumidos.

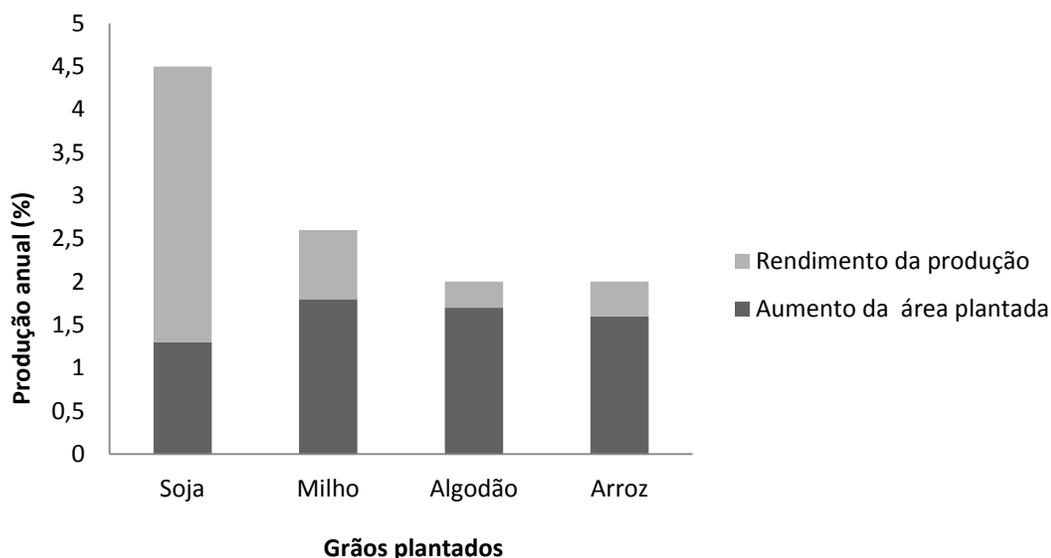
A presença de micotoxinas nos queijos é resultante de três razões: presença da aflatoxina AFM<sub>1</sub> no leite, proveniente de animais que se alimentaram de rações contaminadas com AFB<sub>1</sub> (Heidtmann-Bemvenuti et al., 2011); a síntese de micotoxinas por esporos fúngicos que estão presentes no ambiente das fábricas e a produção de micotoxinas por fungos que são utilizados na fabricação de queijos curados (O'Brien et al., 2004).

Há um número limitado de espécies de fungos que são capazes de provocar deterioração no queijo, pois essas são bem adaptadas ao teor de gordura e ao ambiente de baixo pH (Hocking, 1992). O gênero *Penicillium sp.* é o maior causador de deterioração em queijo muçarela por conta da sua adaptação e crescimento nesta matriz alimentar (Noori et al., 2012), sendo ele encontrado em 60 a 80% dos queijos contaminados (Varnam et al., 1994). A espécie mais importante é o *P. nordicum*, um dos principais fungos isolados no queijo muçarela e um dos produtores de ocratoxina (Hymery et al., 2014), uma micotoxina estável no queijo (Pattono et al., 2011). Além dessa, outras espécies podem ser encontradas, como o *P. commune*; *P. digitatum*; *P. glabrum*; *P. nalgiovense*; *P. verrucosum*; *P. solitum*; *P. roqueforti*; *P. crustosum*; *P. atramentosum*; *P. chrysogenum*, além do gênero *Aspergillus* (*A. versicolor*; *A. parasiticus*), *Cladosporium* (*C. cladosporioides* e *C. herbarum*) e *Phoma sp.* (Hocking e Faedo, 1992; Sengunet al., 2008).

O ambiente das fábricas de queijos pode ser caracterizado como uma fonte de contaminação dos queijos ali produzidos (Basilico et al., 2001). No trabalho de Kure (2001), foram confirmadas as cepas de *Penicillium commune*, *Penicillium palitans*, *Penicillium roqueforti* e *Penicillium solitum* nos blocos de queijos. Todas as cepas foram encontradas no começo e no final da linha de produção, nos aparelhos utilizados para o corte e no sistema de ar da fábrica. Já nos setores de matéria prima e embalagens, os níveis de contaminação foram baixos.

## 2.4 DETERIORAÇÃO DO MILHO POR FUNGOS FILAMENTOSOS

A produção de cereais (incluindo o trigo, soja, arroz e o milho) desempenha um papel extremamente importante para o fornecimento mundial de alimentos, visto que estes produtos representam cerca de 50% do total da ingestão de calorias pelos seres humanos (FAO, 2003). A figura 2.7 demonstra o aumento das áreas na produção de diversas *commodities* e o rendimento da produção.



**Figura 2.7** Aumento anual das áreas plantadas e no respectivo aumento do rendimento de diferentes grãos. Fonte: FAO, 2003.

A produção brasileira de grãos da safra 2014/2015 pode chegar a 204,5 milhões de toneladas, acréscimo de 5,6% (10,9 milhões de toneladas a mais) em relação à safra de 2013/2014, quando alcançou 193,62 milhões de toneladas (CONAB, 2015).

De acordo com a LSPA (Levantamento Sistemático da Produção Agrícola) o arroz, milho e soja, são os principais grãos da safra de 2015, resultando em 91,6% da estimativa da produção e respondendo por 85,5% da área de plantio (LSPA, 2015). O Departamento de Economia Rural (DERAL) estima que a colheita da safra de milho no estado do Paraná em 2015 será de aproximadamente 10,78 milhões de toneladas, 3,8% acima das 10,39 milhões de toneladas colhidas no ano anterior. O valor bruto da

produção (VBP) no Paraná em 2014 alcançou R\$ 5,3 bilhões (DERAL, 2015). No consumo de milho destinado à produção de ração animal, estima-se que 51,0% deste total seja direcionado ao setor avícola; 33,0% à suinocultura; 11,0% à pecuária, principalmente de leite; e 5,0% à produção da ração para as outras espécies animais (Embrapa, 2015).

A exposição dos grãos de milho aos fungos do ambiente acontece desde o campo devido ao contato com microrganismos presentes no solo e água, trazidos pelo vento e por processos de irrigação, respectivamente (Millis, 1989). Após o crescimento destes fitopatógenos nas sementes do milho, muitas características de qualidade são afetadas, reduzindo o desempenho na germinação e no vigor, além de promover uma deterioração mais rápida dos grãos durante o seu armazenamento (Smith e Berjak, 1995).

Muitos fungos também se encontram no ambiente de estocagem (Tabela 2.3) e o crescimento destes organismos é determinado por fatores ambientais, como altas temperaturas (entre 15°C a 30°C), alta umidade relativa do ar (entre 60 e 95%), alta atividade de água do grão (superior a 0.9) e a concentração do agente patogênico no ambiente (Pezzini et al., 2005; Santin et al., 2010; Dionello et al., 2012).

**Tabela 2.3** Algumas espécies produtoras de micotoxinas e a sua temperatura ideal de crescimento.

<b>Espécies</b>	<b>Micotoxinas</b>	<b>Temperatura para crescimento °C</b>
<i>Alternaria alternata</i>	Alternariol	25
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxinas	33
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ocratoxina A	25-30
<i>Penicillium verrucosum</i>	Ocratoxina A	25
<i>Fusarium graminearum</i>	Deoxinivalenol	30
<i>Fusarium culmorum</i>	Deoxinivalenol	26
<i>Fusarium oxysporum</i>	Zeralenona	28
<i>Fusarium acuminatum</i>	HT-2	20-30
<i>Fusarium poae</i>	T-2	20-30
<i>Fusarium thapsinum</i>	Moniliformina	25-30

Fonte: Jimenez (1996), Medina e Margan (2011), Popovski (2013).

De acordo com Santin (2010), a contaminação dos grãos pode ocorrer em diferentes momentos da produção, onde a presença de fungos do gênero *Fusarium* e *Alternaria* são encontrados no campo e os fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* são encontrados nos ambientes de secagem e estocagem.

## 2.5 CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

Nos últimos anos, os consumidores estão se tornando mais conscientes sobre a qualidade da sua alimentação e estão atentos ao excesso de conservantes e aditivos químicos por parte das indústrias de alimentos. Apesar de eficientes para combater o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos, estes compostos são percebidos como prejudiciais à saúde humana. Assim, existe atualmente uma incessante procura por produtos naturais capazes de substituir os conservantes sintéticos (Militello et al., 2011).

Visando a segurança alimentar e a preservação da sua qualidade nutricional e sensorial, técnicas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de prevenir o crescimento e a proliferação de microrganismos patogênicos na superfície e no interior dos alimentos (Tunc et al., 2007). Atualmente, na indústria de alimentos, para evitar a contaminação por esporos fúngicos, adota-se o uso de técnicas de preservação de alimentos com o uso de embalagens em atmosfera modificada, radiação e a adição de ácidos orgânicos como ácidos propiônico, benzóico e sórbico (Passarinho et al., 2014).

A incorporação de antimicrobianos junto aos materiais de embalagens é um tema bastante atual, que permite a gradual difusão do composto antimicrobiano no ambiente da embalagem, diminuindo a necessidade de adicionar conservantes diretamente no alimento. Contudo, as aplicações de compostos antimicrobianos em embalagens são limitadas por fatores como a viabilidade dos compostos antimicrobianos, a dificuldade em encontrar bons polímeros que sirvam como embalagem e carreadores do antimicrobiano concomitantemente, e pela burocracia legislativa de diversos países (Jin et al., 2011).

Outro fator que compromete a vida de prateleira dos alimentos é a presença de oxigênio em alimentos embalados. O oxigênio é responsável pela oxidação dos componentes alimentares e proliferação de bactérias e fungos aeróbios, resultando em perdas de qualidade devido a mudanças no sabor, cor, textura e valor nutritivo do alimento (Realini e Marcos, 2014). Estes problemas podem ser evitados ou reduzidos com a utilização de embalagens em atmosfera modificada (vácuo ou troca do ar por outros gases, como N<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>). No entanto, nem sempre a retirada do oxigênio é completa (Véronique, 2008). O uso combinado de sequestradores de oxigênio com a embalagem de atmosfera modificada ou embalagem a vácuo garante a remoção de quase 100% do oxigênio no espaço interno da embalagem (Realini e Marcos, 2014).

O interesse por compostos naturais com propriedades antimicrobianas está crescendo, por serem considerados mais saudáveis e sustentáveis em relação ao uso de compostos sintéticos (Davidson, Critzer e Taylor, 2013). Muitos destes compostos possuem boas características para serem utilizados em embalagens bioativas de alimentos contra o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos (Balaguer et al., 2013).

### 2.5.1 Óleos Essenciais

Muitas plantas são ricas em óleos essenciais biologicamente ativos, que apresentam atividade antibacteriana, antifúngica, antiparasitária e inseticida (Turgis et al., 2012; Prakash et al., 2015). Estes metabólitos secundários auxiliam na defesa das plantas contra patógenos e demonstram uma excelente inibição contra diversas espécies de bactérias, fungos e insetos (Davidson et al., 2013).

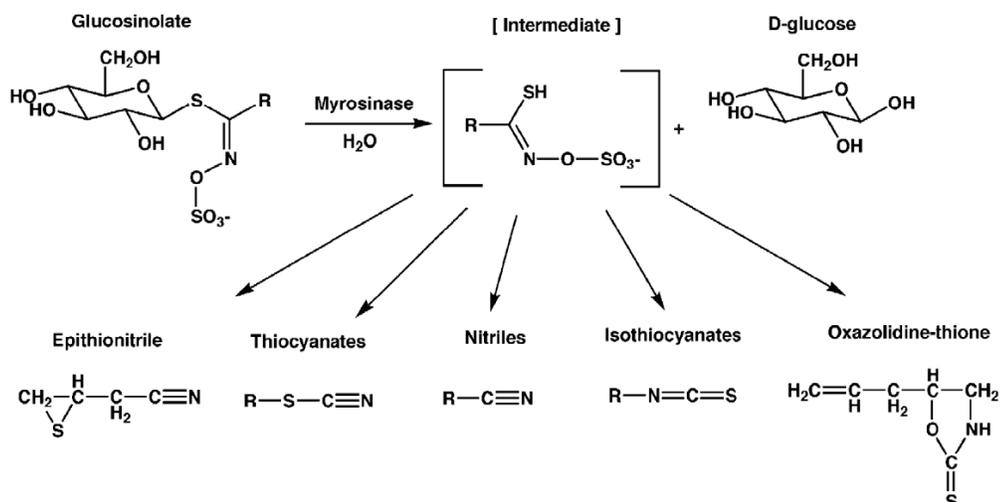
Os óleos essenciais são compostos naturais de grande interesse para a indústria de alimentos por serem um grupo de antimicrobianos de amplo espectro e devido ao seu status de segurança para o consumo - GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (Chen et al., 2014). Vários mecanismos de ação têm sido propostos para explicar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. Devido à sua lipofilicidade, os óleos essenciais promovem danos à membrana celular tornando-a mais permeável,

causando um desequilíbrio eletrolítico, alterando o pH e a homeostase celular, levando ao extravasamento do conteúdo intracelular (Silveira et al., 2012).

#### 2.5.1.1 Óleos essenciais derivados de glucosinolatos e sua atividade biológica

Os glucosinolatos (GLs) são metabólitos secundários presentes em vegetais da ordem *Brassica* derivados de aminoácidos, com a adição de enxofre e uma molécula de glicose (Hounsome et al., 2008). Os glucosinolatos possuem a particularidade de serem os precursores dos isotiocianatos (ITCs), um grupo que possui substâncias naturais com grande interesse científico por suas numerosas propriedades bioativas. O consumo de alimentos ricos em GLs é relacionado com a prevenção de determinados tipos de câncer. Os ITCs promovem uma proteção contra o estresse oxidativo e a ativação de enzimas relacionadas com a desintoxicação de agentes carcinogênicos (Johnson, 2002).

Nas células vegetais, os glucosinolatos se encontram armazenados em vacúolos e são liberados quando ocorre algum dano celular. Então, esses compostos entram em contato com a enzima mirosinase ( $\beta$ -tioglicoseglucohidrolase, EC 3. 2. 1. 147), que se encontra ligada à membrana plasmática. A mirosinase converte os GLs em ITCs na presença de água (Dai & Lim, 2014). Devido à grande variedade de glucosinolatos e à elevada especificidade entre enzima e substrato, existem distintas mirosinases em função do tipo do vegetal. Como exemplo, as mirosinases obtidas a partir de sementes de mostarda branca (*Sinapis alba*) tem atividade ótima em pH entre 4,2 e 6,0 e temperatura de 60°C (Travers-Martin et al., 2008). A figura 2.8 demonstra a estrutura geral dos glucosinolatos e os seus produtos de degradação enzimática.



**Figura 2.8** Estrutura geral dos glucosinolatos e os seus produtos de degradação enzimática (Vig, 2009).

Quando a mirosinase degrada os glucosinolatos, forma-se uma molécula intermediária (aglicona), altamente instável, que se rearranja formando diferentes produtos finais dependendo das condições do ambiente, como epitionitrilos, nitrilos, tiocianatos e isotiocionatos. Estes últimos possuem uma potente atividade fungicida, bactericida, inseticida e nematocida (Vig et al., 2009).

O isotiocianato de alila (AIT), o qual é derivado do glucosinolato sinigrina, é o produto mais estudado dessa família de compostos. O AIT é um composto volátil, característico das sementes de mostarda marrom (*Brassica juncea*) e negra (*Brassica nigra*), com sabor e odor altamente pungentes. Este composto é capaz de inibir o crescimento de fungos toxigênicos dos gêneros *Penicillium* (Tunc et al., 2007), *Alternaria*, *Fusarium* e *Aspergillus* (Meca et al., 2012; Azaiez et al., 2013; Hontanaya et al., 2015), assim como as bactérias *Escherichia coli* O157:H7 (Nadarajah et al., 2005), *Listeria monocytogenes* (Lara-Lledó et al., 2012) e *Salmonella* (Chen et al., 2014).

No ano de 2005, a empresa Mitsubishi desenvolveu um dossiê científico para demonstrar ao *Food and Drug Administration* que o AIT é um composto seguro para o uso na indústria alimentícia (GRAS). As conclusões foram positivas e o AIT foi isento dos requisitos de aprovação prévia para comercialização (Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation, 2005). O uso do isotiocianato de alila tem sido avaliado por um comitê composto por especialistas da *Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives* e

pela agência de segurança alimentar europeia (EFSA). A EFSA emitiu um parecer científico sobre a segurança do uso de isotiocianato de alila como conservante de alimentos através de sua adição em embalagens. Uma das conclusões deste parecer científico foi o estabelecimento da Ingestão Diária Admissível (IDA) do isotiocianato de alila em 0,02mg/kg de peso corporal/dia (EFSA, 2010).

A ação antimicrobiana do AIT acontece principalmente por conta da sua estrutura química altamente reativa, que, através de seu carbono central eletrofílico, pode reagir com aminas, tióis e hidroxilas de aminoácidos, peptídeos e proteínas, formando carbamatos, tiocarbamatos e tioureia (Zhang e Talay, 1994; Verma, 2003; Cejpek, Valušek e Velíšek, 2000). Kojima e Ogawa (1971) demonstraram que o AIT é capaz de inibir a ação do citocromo C, uma enzima essencial da cadeia fosforilativa de elétrons, e conseqüentemente poderia inibir a formação de ATP. Além disso, foi comprovado que o AIT inibe a catálise da tioredoxina redutase e do acetato quinase de *Escherichia coli*, enzimas que estão relacionadas com a formação de ácidos nucleicos e ATP, respectivamente (Luciano e Holley, 2009). Também foi demonstrado que o AIT causa desestabilização da membrana de bactérias, interferindo no metabolismo energético desses organismos (Eun-Sook Ahn et al., 2001).

O uso do isotiocianato de alila na sua forma volátil vem sendo aplicado em embalagens ativas, como no trabalho de Lee (2005), onde o AIT foi aprisionado em ciclodextrinas para evitar a sua volatilização. Quando a embalagem foi exposta a condições de elevada umidade, as ciclodextrinas alteraram a sua estrutura, para liberar o agente antimicrobiano na atmosfera que envolve o alimento. O AIT está sendo aplicado como um agente antimicrobiano em diversas matrizes alimentícias, como nos grãos de milho (Azaiez et al., 2013), arroz (Isshiki et al., 1992), queijos (Pires et al., 2009) e até em frutas (Ugolini et al., 2014).

Tendo em vista o potencial do AIT contra o desenvolvimento fúngico, bem como a inibição da produção de micotoxinas, esta dissertação está dividida em dois projetos. O primeiro projeto teve como objetivo desenvolver e testar três dispositivos antimicrobianos contendo isotiocianato de alila contra o crescimento de *Penicillium digitatum* e *Aspergillus parasiticus* inoculados em fatias de queijo muçarela. O segundo

projeto teve como objetivo avaliar o AIT como um agente de fumigação contra o crescimento e a produção de toxinas dos fungos *Aspergillus parasticus*, *Fusarium tricinctum*, *Fusarium verticillioides*, *Alternaria alternata* e *Gibberella zeae* em grãos de milho.

### CAPÍTULO 3

## DISPOSITIVOS CONTENDO ISOTIOCIANATO DE ALILA CONTRA O CRESCIMENTO DE FUNGOS DETERIORANTES E MICOTOXIGÊNICOS EM QUEIJO MUÇARELA

### RESUMO

Fatias de queijo muçarela são muito susceptíveis à contaminação por fungos, e o crescimento visual desses microrganismos é um fator determinante para a vida útil desse produto e para o consumo humano. Fungos do gênero *Penicillium* são alguns dos mais prevalentes no queijo muçarela fatiado, mas outros fungos potencialmente perigosos podem crescer em versões mais sofisticadas, como o queijo muçarela adicionado de castanhas ou frutas desidratadas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e testar três dispositivos antimicrobianos contendo isotiocianato de alila (AIT) para controlar o crescimento de *Penicillium digitatum* e *Aspergillus parasiticus* (produtor de aflatoxina B<sub>1</sub>) inoculados em fatias de queijo muçarela. Fatias de queijo muçarela, de aproximadamente 18g, foram inoculadas com cada um dos gêneros de fungos em 9 pontos equidistantes utilizando 10 µl de uma solução contendo 10<sup>6</sup> esporos/mL. As fatias de muçarela foram embaladas em sacos plásticos ou em bandejas de plástico, hermeticamente fechados. As embalagens receberam os seguintes dispositivos antimicrobianos: 1) papel filtro adicionado com AIT; 2) adesivo contendo AIT e 3) sachê contendo farinha de mostarda e água (para a produção intrínseca de AIT). O AIT foi adicionado nas concentrações de 2, 4, 8 ou 16 ppm. A quantidade de mostarda adicionada ao sachê foi calculada para gerar os mesmos níveis de AIT dos outros dispositivos. Cada tratamento foi composto por quatro repetições. Os tratamentos foram comparados com um controle, o qual não recebeu tratamento com AIT. O dia em que o crescimento dos fungos foi visualmente detectável foi considerado como fim da vida útil dos produtos. As embalagens foram inspecionadas diariamente por 60 d. No final do experimento, foi realizada a quantificação de aflatoxinas nas amostras contendo *A. parasiticus*. O crescimento visual de *P. digitatum* foi observado após 19,2 ± 1,4 d no grupo controle embalado em bandeja e após 26,6 ± 2,1 d em saco plástico, enquanto *A. parasiticus* foi perceptível após 41,4 ± 1,7 d e 28,4 ± 1,5 d em bandeja e saco plástico, respectivamente. Todas as fatias tratadas com AIT não apresentaram crescimento fúngico visual por 60 d. A AFB<sub>1</sub> estava presente no controle (6,93 ± 1,23mg/kg) e nos grupos tratados com 2ppm de AIT em papel filtro (0,030 ± 0,004mg/kg), 2 ppm em adesivo (0,56 ± 0,127 mg/kg) e 2 ppm em sachê (2,015 ± 0,049 mg/kg). Estes resultados demonstram que todos os dispositivos antimicrobianos testados foram capazes de aumentar significativamente a vida de prateleira do queijo muçarela fatiado e que reduziram a produção de AFB<sub>1</sub> por *A. parasticus*, em doses maiores que 2 ppm de AIT. Portanto, esses dispositivos demonstraram um grande potencial para serem utilizados pela indústria de alimentos para melhorar a segurança alimentar e reduzir a deterioração fúngica de queijo muçarela fatiado.

**Palavras-chave:** Embalagem bioativa; queijo; aflatoxina; deterioração fúngica; óleo essencial

## ABSTRACT

Sliced mozzarella cheese is very susceptible to mold contamination, and visual fungal growth is a determinant factor for the shelf life of these products. *Penicillium* species are some of the most prevalent microorganisms found in sliced mozzarella, but other potentially dangerous fungi may grow in novelty products such as mozzarella added with nuts or dried fruits. The objective of this study was to develop and test three antimicrobial devices containing allyl isothiocyanate (AIT) against the growth of *Penicillium digitatum* and *Aspergillus parasiticus* (aflatoxin B<sub>1</sub> producer) inoculated in sliced mozzarella. Each slice of mozzarella (approx. 18g) was inoculated with either fungus in 9 equidistant points with 10 µl of a solution inoculated containing 10<sup>7</sup> spores/mL. Slices of mozzarella were packaged in either a thermo-sealed plastic bag or a hermetically closed plastic tray. The packages received one of the following antimicrobial devices: 1) filter paper added with AIT; 2) sticker containing AIT; or 3) sachet containing mustard meal and water (for intrinsic production of AIT). AIT was added at different concentrations, namely 2, 4, 8 and 16 ppm. The quantity of mustard meal added to the sachet was calculated to provide the same AIT levels. Each treatment was composed by 9 repetitions. Treatments were compared to a control that was not added AIT. The day when the fungal growth was visually detectable was considered as the end of the product's shelf life. Packages were inspected daily for 60 days. At the end of the experiment, samples containing *A. parasiticus* used for aflatoxin quantification. Visual growth of *P. digitatum* for the control was observed after 19.2±1.4 days in bags and 26.6 ± 2.1 days in trays, where as *A. parasiticus* was visually detectable after 41.4 ± 1.7 days and 28.4 ± 1.517 days in bags and trays, respectively. All AIT- treated cheese did not present visual fungal growth for 60 days. However, AFB<sub>1</sub> was present in the control (6.93± 1.23 mg/Kg) and in the groups treated with AIT at 2 ppm: paper filter with 0.030 ± 0.004 mg/kg; sticker with 0.56 ± 0.127 mg/kg; and meal with 2.015 ± 0.049 mg/kg. These results show that all three antimicrobial devices tested were able to significantly increase the shelf life of sliced mozzarella and to reduce the production of AFB<sub>1</sub> by *A. parasiticus*. Therefore, these devices could potentially be used by the food industry to enhance food safety and decrease the deterioration of the sliced mozzarella cheese.

**Keywords:** Bioactive packaging; cheese; aflatoxin; mold deterioration; essential oil.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A Associação Brasileira de Indústrias de Queijo (ABIQ) registrou o consumo de 1,032 milhão de toneladas de queijos no Brasil em 2013, sendo apenas 3% deste total em queijos importados (ABIQ, 2014). Os principais tipos de queijos produzidos foram o muçarela, requeijão culinário, prato, requeijão cremoso e o *petit suisse*, sendo o queijo muçarela utilizado principalmente no preparo de pratos quentes, sanduíches e pizzas (Pizaia et al., 2003; do Valle et al., 2004; Coelho, 2012). Durante a transformação do leite em queijo, ocorre além da oxidação da lactose, a redução do oxigênio, transformando o seu interior em um ambiente anaeróbico. Portanto, microrganismos aeróbicos estritos como *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus* e fungos filamentosos só conseguem se desenvolver na superfície dos queijos (Perry, 2004). Apesar da grande maioria dos queijos em bloco ser embalada a vácuo, uma prática comum no Brasil, é o fracionamento dessas peças em fatias, que são acondicionadas aerobicamente em bandejas, para sua posterior comercialização. Assim, a contaminação por fungos em queijo muçarela é bastante comum, provocando problemas significativos de qualidade nesse produto e gerando perdas econômicas para a indústria, comércio e consumidor final. Além disso, muitos destes fungos podem ser produtores de micotoxinas, representando assim um grande risco para a saúde do consumidor (Kure et al., 2001; Banjara, Suhr e Hallen-Adams, 2015). Os principais fungos causadores de deterioração fúngica em queijos pertencem aos gêneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Mucor* e *Trichoderma* (Sengun, 2008).

As contaminações podem ocorrer pelo processamento (salmoura ou cultura *starter* contaminada), pelo contato com equipamentos contaminados (facas, utensílios de corte e materiais de embalagens) ou pela presença de microrganismos contaminantes no ambiente (pisos, câmara fria e ar das salas de produção) (Kousta et al., 2010). O uso de embalagens sob atmosfera modificada e conservantes sintéticos (derivados do ácido sórbico, propiônico e benzóico) são os principais métodos para inibir o crescimento fúngico em queijo muçarela (Guynot et al., 2005). Contudo, este produto é normalmente comercializado em condição de aerobiose e muitos fungos são capazes

de crescer mesmo na presença de conservantes. Além disso, muitos destes conservantes sintéticos têm sido considerados potencialmente carcinogênicos e associados a episódios alérgicos em humanos (Chen et al., 2014). Assim, existe uma grande pressão pública para a substituição destes conservantes por produtos naturais e inócuos à saúde humana (Militello et al., 2011). O isotiocianato de alila (AIT) é o principal componente antimicrobiano do óleo essencial de mostarda marrom (*Brassica juncea*), sendo capaz de inibir o crescimento fúngico em diversas matrizes alimentares (Isshiki et al., 1992; Pires et al., 2009; Azaiez et al., 2013; Ugolini et al., 2014). Por ser um composto altamente volátil, o AIT pode ser utilizado como um agente de fumigação em sistemas de embalagem bioativa. Ao entrar na fase gasosa, este composto entra em contato com os fungos inibindo o seu crescimento e, conseqüentemente, aumentando o prazo de validade de produtos alimentares (Azaiez et al., 2013; Hontanaya et al., 2015).

Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação de três dispositivos antimicrobianos contendo AIT sobre o desenvolvimento de *Penicillium digitatum* e *Aspergillus parasiticus* em queijo muçarela fatiado embalado em sacos plásticos ou bandejas hermeticamente fechados.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Microrganismos e compostos químicos

Foram utilizados fungos da espécie *Penicillium digitatum* CECT 2954 e *Aspergillus parasticus* CECT 2681, fornecidos pela Coleção Espanhola de Cultivos Tipo (CECT, Valência, Espanha). A farinha de mostarda oriental (*Brassica juncea*) foi obtida da empresa GS Dunn Ltd (Hamilton, ON, Canadá). O tipo de farinha utilizada continha sementes integralmente moídas. Foi utilizado também o isotiocianato de alila, que foi obtido da empresa Sigma-Aldrich Chemistry (St. Louis, EUA). O metanol foi adquirido da Fisher Scientific (New Hampshire, EUA), água deionizada (< 18 MΩ cm resistividade) foi obtida a partir do sistema milli-Q de purificação (Millipore, Bedford,

MA, EUA). Os solventes da cromatografia e a água foram desgaseificados durante 20 minutos usando um banho ultrassônico Branson 5200 (Branson Ultrasonic Corp., CT, EUA).

### 3.2.2 Modelos do filtro, adesivo e sachê antimicrobiano

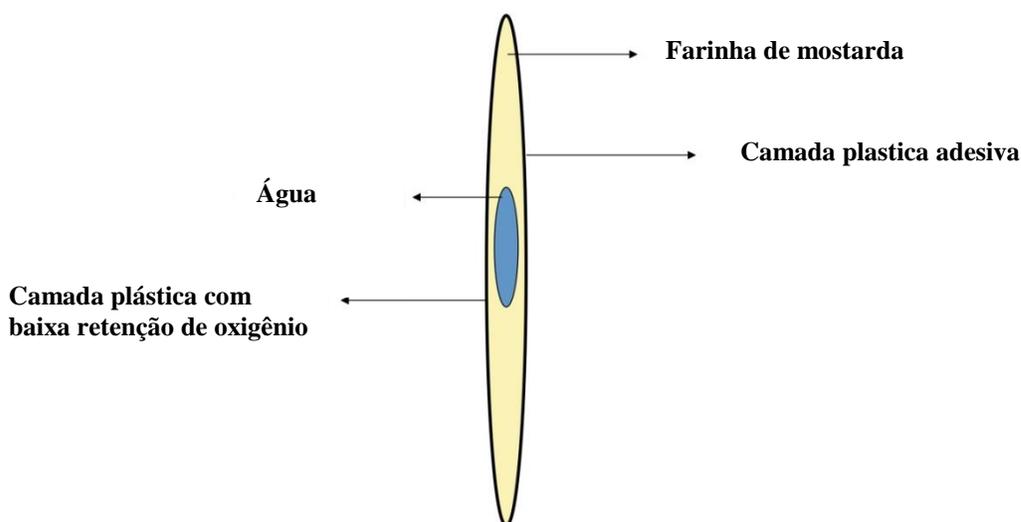
Para a confecção dos filtros antimicrobianos, foi utilizado um papel filtro, nas dimensões de 2,5 cm x 2,5 cm, que recebeu a quantidade de AIT líquido, suficientes para resultar em concentrações de 2, 4, 8 e 16 ppm no interior da embalagem. Os filtros foram fixados na parte interna da embalagem com o auxílio de fita adesiva.

Para a confecção dos adesivos antimicrobianos (figura 3.1), foram utilizados polietileno (taxa de transmissão de oxigênio =  $6509 \text{ cm}^3/\text{mil}/\text{m}^2/24\text{h}$ ), papel filtro com dimensão de 2,5 cm x 2,5 cm e vinil autoadesivo. A parte interna do adesivo foi composta por um plástico de baixa retenção de oxigênio (taxa de transmissão de oxigênio =  $20 \text{ cm}^3/\text{mil}/\text{m}^2/24\text{h}$ ) e a parte externa, que estava em contato com a embalagem, era composta por vinil autoadesivo. Uma máquina seladora foi utilizada para selar as extremidades. Entre as camadas plásticas, foi adicionado o filtro (2,5 cm x 2,5 cm) que foi inoculado com isotiocianato de alila líquido momentos antes da utilização do adesivo. Assim, o AIT logo era volatilizado para dentro da embalagem e entrava em contato com o alimento. Os adesivos continham quantidades suficientes de AIT para resultar em concentrações de 2, 4, 8 ou 16 ppm de isotiocianato de alila no interior da embalagem.



**Figura 3.1** Modelo do adesivo antimicrobiano contendo papel contact, filtro com AIT e plástico de baixa retenção de oxigênio.

Os sachês antimicrobianos (figura 3.2) foram confeccionados com polietileno (taxa de transmissão de oxigênio =  $6509 \text{ cm}^3/\text{mil}/\text{m}^2/24\text{h}$ ) e adicionados de farinha de mostarda oriental e 2 mL de água. Uma máquina seladora Sammis TS-150 (Basarte, Espanha) foi utilizada para selar as extremidades do sachê. O AIT foi formado ao misturar a água, que entrou em contato com a farinha e promoveu a conversão de sinigrina em AIT. Testes preliminares utilizando a cromatografia líquida foram realizados com a farinha de mostarda oriental para quantificar a concentração de sinigrina. Foi encontrada 5,04% de sinigrina e 24,95% desta sinigrina foi capaz de se transformar em AIT. Assim, cada grama da farinha pode resultar em  $12,57 \mu\text{L}$  de AIT. A quantidade de farinha de mostarda utilizada foi calculada em relação ao conteúdo de sinigrina basal para proporcionar as mesmas concentrações de AIT dos adesivos e filtros. Para 2 ppm de AIT foram utilizados 160,330 mg; para 4 ppm foram utilizados 320,661 mg; para 8 ppm foram utilizados 641,322 mg e para os 16 ppm foram utilizados 1282,64 mg de farinha de mostarda oriental.



**Figura 3.2** Modelo do sachê antimicrobiano contendo farinha de mostarda e água.

### **3.2.3 Contaminação fúngica e embalagem do queijo muçarela**

As fatias de queijo muçarela foram adquiridas no comércio varejista da cidade de Valência, Espanha e pertenciam ao mesmo lote de fabricação. As fatias possuíam  $8,5 \times$

8,5 x 0,2 cm, com peso aproximado de 18 g. Cada fatia de queijo muçarela foi inoculada com um dos fungos em 9 pontos equidistantes, utilizando 10µL de uma solução contendo 10<sup>6</sup> esporos/mL. As fatias foram embaladas em sacos plásticos de alta retenção de oxigênio ou em bandejas com tampas de plástico de alta retenção de oxigênio, sendo que ambos eram hermeticamente selados, com o uso de uma termoseladora. As embalagens receberam os seguintes dispositivos antimicrobianos: 1) papel filtro adicionado com AIT; 2) adesivo contendo AIT e 3) sachê contendo farinha de mostarda e água (para a produção intrínseca de AIT). Os dispositivos ficaram do lado de dentro da embalagem, porém sem entrarem em contato direto com as fatias de queijo. Os tratamentos foram comparados com o controle, o qual não recebeu tratamento com AIT. O dia em que o crescimento dos fungos foi visualmente detectável foi considerado como fim da vida útil dos produtos. As embalagens foram armazenadas em uma câmara a 4°C e inspecionadas diariamente durante 60 d. Ao final do experimento, foi realizada a quantificação de aflatoxinas nas amostras contendo *Aspergillus parasiticus*.

### **3.2.4 Procedimentos para a extração das micotoxinas**

Transcorridos 60 d de armazenamento, foram realizadas a extração e a quantificação das aflatoxinas presentes no queijo inoculado com *Aspergillus parasiticus* (CECT 2681). A extração das aflatoxinas foi realizada de acordo com os protocolos de D'Arco et al. (2009) e Jestoi (2008) com algumas modificações. As fatias de queijo foram homogeneizadas em stomacher IUL (Barcelona, Espanha) com 162 mL de água peptonada 0,1%. Posteriormente foi iniciada a extração líquido-líquido com 100 mL de acetato de etila, utilizando um funil de separação. Após a separação das fases, a fase lipofílica foi depositada em um balão de vidro para rotaevaporador e os solventes foram evaporados em um rotaevaporador Buchi R-200 a 23 °C (Postfach, Suíça). A extração líquido líquido com o acetato de etilo foi repetida duas vezes, para otimizar a extração das aflatoxinas. Os resíduos sólidos foram ressuspensos com 10mL de metanol e transferidos para um tubo de 15 mL e introduzidos em um equipamento turbovap com

uma corrente de nitrogênio a 5 atm (TurboVap LV, Hopkinton, USA) para secagem do solvente. Os tubos ficaram em um banho maria com temperatura de 40°C durante a secagem. O resíduo foi reconstituído com 1mL de metanol, agitado em vórtex e filtrado em fitro de nylon com poro de 0,22 µm. As amostras foram colocadas em frascos de vidro e condicionadas para análises por LC-MS/MS.

### **3.2.5 Determinação de micotoxinas por LC-MS/MS**

A separação por cromatografia líquida foi realizada com uma coluna analítica Gemini C18 (150 mm, 4,6 mm, 2,1 µm) (Phenomenex, Madrid, Espanha) precedido por um cartucho de segurança C18 (4 mm, 2 mm ,5 µm) (Phenomenex). As amostras foram separadas usando um gradiente de eluição com água como fase A e metanol como fase B, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico e 5mM de formato de amônio. Iniciou-se a cromatografia com 65% da fase B por 3 min, que foi aumentada gradualmente para 95% em 4 min, a qual foi mantida constante por 3 min. A análise foi realizada no modo de íons positivos. Os valores da fonte foram: tensão capilar 3,20kV; cone 50V; extrator 3 V; lente de RF 0,2V; temperatura da fonte 125°C; fluxo de gás (nitrogênio com 99,99% de pureza), 500l/h; e cone (fluxo de gás) de 50l/h. As configurações do analisador foram: resolução de 12,0 (resolução de unidade) para a primeira e terceira quádruplas; energia de íon em 0,5; entrada e saída de energias foram 3 e 1; multiplicador a 650V; pressão de gás em 99,99%; colisão a 3,74 mbar; atraso de 0,02 segundos; tempo total de varredura de 1,0 s. Foi utilizado um espectrômetro de massa TQ Quattro LC Micromass (Manchester, UK) equipado com um sistema de cromatografia líquida CL 2695 (Waters, Milford, MA), contendo um mostruário, uma bomba quaternária, uma sonda pneumática e para o processamento de dados, foi utilizado o software de massa Lynx NT 4.1. O espectrômetro de massa foi operado no modo “acompanhamento de reação selecionada” e as transições dos íons precursores foram de m/z 313,3 / 241,3 – 228,5; m/z 315,3 / 259,0 – 288,4; m/z 329,7/ 243,3 – 200,5; m/z 331,9/ 189,3 – 217,1 para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>

respectivamente. O limite de detecção das aflatoxinas foi de 0,1 µg/kg e o limite de quantificação foi de 1,0 µg/kg.

### 3.2.6 Análise estatística

A homogeneidade de variância dos dados obtidos para o estudo do isotiocianato de alila em queijo muçarela foi analisada pelo teste de Bartlett e suas médias comparadas pelo teste *t* de *Student*. Os dados são apresentados por média ± desvio padrão. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como diferenças significativas entre o controle e os grupos. Cada tratamento foi composto por quatro repetições. Na quantificação das micotoxinas, foi utilizado o teste de Tukey para analisar as diferenças estatísticas entre os tratamentos. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software STATGRAPHICS Centurion XVI versão 16.1.11.

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 3.1 demonstra o prazo de validade das fatias de queijo muçarela inoculadas com a cepa *Penicillium digitatum* embaladas em bandejas e sacos plásticos de alta retenção de oxigênio. As embalagens receberam um dos três tipos de dispositivos antimicrobianos (filtro, sachê com farinha ou adesivo), contendo as concentrações de 2, 4, 8 ou 16 ppm de AIT na fase gasosa. No grupo embalado em bandeja, o prazo de validade visual das fatias de queijo muçarela inoculadas com o *Penicillium digitatum* aumentou de  $19 \pm 1,48$  d (fatias do grupo controle) para mais de 60 d (fatias que receberam os tratamentos antimicrobianos) ( $p < 0,05$ ). No grupo embalado em saco plástico de alta retenção de oxigênio, houve também diferença significativa entre o controle e os tratamentos ( $p < 0,05$ ), onde o prazo de validade aumentou de  $26,06 \pm 2,07$  d para mais de 60 d. Estes resultados demonstram que o AIT liberado pelos três dispositivos foi igualmente capaz de inibir o crescimento visual de *P. digitatum* durante os 60 d de experimento. A inibição do crescimento visual é uma

importante medida avaliada pelo consumidor como o prazo de validade final, visto que ao se deparar com um alimento contendo crescimento fúngico, este já é descartado.

**Tabela 3.1** Validade visual do queijo muçarela inoculado com o *Penicillium digitatum*, tratado com filtro, adesivo e sachê de farinha contendo isotiocianato de alila (AIT), e embalados em bandejas e saco plástico de alta retenção de oxigênio.

<b>Validade (dias) - <i>Penicillium digitatum</i></b>					
<b>Embalagem</b>		<b>AIT</b>	<b>Filtro</b>	<b>Adesivo</b>	<b>Sachê com farinha</b>
<b>Bandeja</b>	Controle		19 ± 1,48 <sup>a</sup>	19 ± 1,48 <sup>a</sup>	19 ± 1,48 <sup>a</sup>
	2ppm		> 60 <sup>b</sup>	> 60 <sup>b</sup>	> 60 <sup>b</sup>
	4ppm		> 60 <sup>b</sup>	> 60 <sup>b</sup>	> 60 <sup>b</sup>
	8ppm		> 60 <sup>b</sup>	> 60 <sup>b</sup>	> 60 <sup>b</sup>
	16ppm		> 60 <sup>b</sup>	> 60 <sup>b</sup>	> 60 <sup>b</sup>
<b>Saco plástico de alta retenção de oxigênio</b>	Controle		26,06 ± 2,07 <sup>a</sup>	26,06 ± 2,07 <sup>a</sup>	26,06 ± 2,07 <sup>a</sup>
	2ppm		> 60 <sup>b</sup>	> 60 <sup>b</sup>	> 60 <sup>b</sup>
	4ppm		> 60 <sup>b</sup>	> 60 <sup>b</sup>	> 60 <sup>b</sup>
	8ppm		> 60 <sup>b</sup>	> 60 <sup>b</sup>	> 60 <sup>b</sup>
	16ppm		> 60 <sup>b</sup>	> 60 <sup>b</sup>	> 60 <sup>b</sup>

Valores representam média ± desvio padrão. O tempo máximo de análise foi de 60 dias. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Para as fatias de queijo inoculadas com o *Aspergillus parasiticus* e embaladas com bandeja (figura 3.2), o prazo de validade visual aumentou de 41 d (fatias do grupo controle) para mais de 60 d (fatias que receberam os grupos antimicrobianos) ( $p < 0,05$ ). O prazo de validade das fatias de queijo inoculadas com *Aspergillus parasiticus* e embaladas em plástico de alta retenção de oxigênio foi de 28 d (fatias do grupo controle) para mais de 60 dias (fatias que receberam os tratamentos antimicrobianos) ( $p < 0,05$ ). Apesar do *A. parasiticus* não ser um fungo normalmente encontrado em queijo muçarela, muitas vezes ele pode ser encontrado em castanhas e frutas desidratadas, adicionadas à formulação versões mais sofisticadas de queijos. Assim, esta espécie micotoxigênica pode crescer nesses produtos mesmo sob refrigeração, representando risco para a saúde do consumidor. Neste caso, o uso dos três dispositivos antimicrobianos também foi eficaz para inibir o crescimento fúngico visual.

A utilização de um sachê com função antimicrobiana é um sistema inovador e têm como característica envolver uniformemente a superfície do alimento quando incorporado com agentes antimicrobianos voláteis (Passarinho et al., 2014).

**Tabela 3.2** Validade visual do queijo muçarela inoculado com o *Aspergillus parasiticus*, tratado com filtro, adesivo e sachê de farinha contendo isotiocianato de alila (AIT) embalados em bandejas e plástico de alta retenção de oxigênio.

<b>Validade (dias) - <i>Aspergillus parasiticus</i></b>				
<b>Embalagem</b>	<b>AIT</b>	<b>Filtro</b>	<b>Adesivo</b>	<b>Sachê com farinha</b>
<b>Bandeja</b>	Controle	41,4 ± 1,67 <sup>a</sup>	41,4 ± 1,67 <sup>a</sup>	41,4 ± 1,67 <sup>a</sup>
	2ppm	60 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>
	4ppm	60 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>
	8ppm	60 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>
	16ppm	60 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>
<b>Saco plástico de alta retenção de oxigênio</b>	Controle	28,4 ± 1,51 <sup>a</sup>	28,4 ± 1,51 <sup>a</sup>	28,4 ± 1,51 <sup>a</sup>
	2ppm	60 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>
	4ppm	60 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>
	8ppm	60 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>
	16ppm	60 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>

Valores representam média ± desvio padrão. O tempo de análise foi de 60 dias. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p<0,05).

Balaguer et al. (2013) utilizaram sacos plásticos de polipropileno contendo na camada interna um filme de gliadina incorporado com 5% de cinamaldeído contra o crescimento de *Penicillium expansum* em *cheese spread* (queijo tipo requeijão). O *cheese spread* foi colocado em placas de petri e cada amostra recebeu 5 µL da suspensão de *P. expansum* na concentração de 10<sup>6</sup> esporos/mL. As tampas das placas de petri foram adicionadas com o filme de gliadina incorporada com 5% de cinamaldeído e utilizadas para fechar as placas com o *cheese spread* contaminado. As placas foram armazenadas a 4°C. O grupo controle do *cheese spread* apresentou crescimento fúngico após 16 d de estocagem e o grupo tratado apresentou crescimento fúngico visual após 30 d de estocagem. Apesar da quantidade final de cinamaldeído no espaço de cabeça das embalagens não ter sido verificada pelos autores, ela

certamente era mais alta do que a concentração de AIT utilizada no presente estudo (máximo de 16 ppm), uma vez que o filme continha 5% de cinamaldeído. O AIT possui maior atividade antifúngica do que o cinamaldeído (Nielsen e Rios, 2000), porém ambos os compostos volatilizam à temperatura ambiente.

Um sachê contendo AIT também foi desenvolvido para aumentar a preservação de queijo muçarela por Pires et al., 2009. Os sachês foram criados com a incorporação de 1 mg de AIT líquido em 100 mg de resina polimérica de alta absorção. A concentração inicial de AIT na embalagem foi de 3,26 ppm, superior à menor concentração utilizada no presente trabalho. Foi avaliado o crescimento de bolores, leveduras e *Staphylococcus* sp. da microbiota endógena do queijo. As amostras foram embaladas com plástico de baixa transmissão de oxigênio e os sachês foram fixados na parte interna da embalagem. Então, o queijo foi estocado a  $12 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 15 dias. A população inicial de bolores e leveduras que era de 3,02 log UFC/g e ao final do experimento houve uma diferença de 3,6 log UFC/g destes organismos entre o grupo controle ( $\sim 6$  log UFC/g) e tratado ( $\sim 2,4$  log UFC/g). Os resultados deste trabalho corroboram com os resultados dos autores acima, sendo demonstrado que o uso de dispositivos antimicrobianos que liberem concentrações  $\geq 2$  ppm podem ser utilizados no controle do crescimento de fungos em queijo muçarela.

Após a extração e quantificação de micotoxinas das fatias de queijo muçarela inoculadas com *Aspergillus parasiticus* e embaladas em sacos plástico, foram encontrados  $6,03 \pm 1,23$  mg/kg de AFB<sub>1</sub> (tabela 3.3) no grupo controle,  $0,03 \pm 0,5$  mg/kg no grupo tratado com 2 ppm de AIT em filtro,  $2,02 \pm 0,05$  mg tratado com 2 ppm de AIT no sachê e  $0,56 \pm 0,13$  mg/kg no grupo contendo 2 ppm de AIT no adesivo. Contudo, não foi encontrada AFB<sub>1</sub> nas fatias de queijo embaladas em bandejas e tratadas com AIT. Isto provavelmente ocorreu pela proximidade do saco plástico às fatias de queijo, o que pode ter dificultado a difusão do AIT no interior da embalagem. Por sua vez, nas bandejas, as moléculas de AIT estavam mais livres para se espalhar por todo o ambiente da embalagem.

**Tabela 3.3** Concentrações de AFB<sub>1</sub> em amostras de queijos muçarela embaladas em plásticos de alta retenção de oxigênio e adicionadas sem (controle) e com os dispositivos antimicrobianos (filtro, adesivo e sachê com farinha).

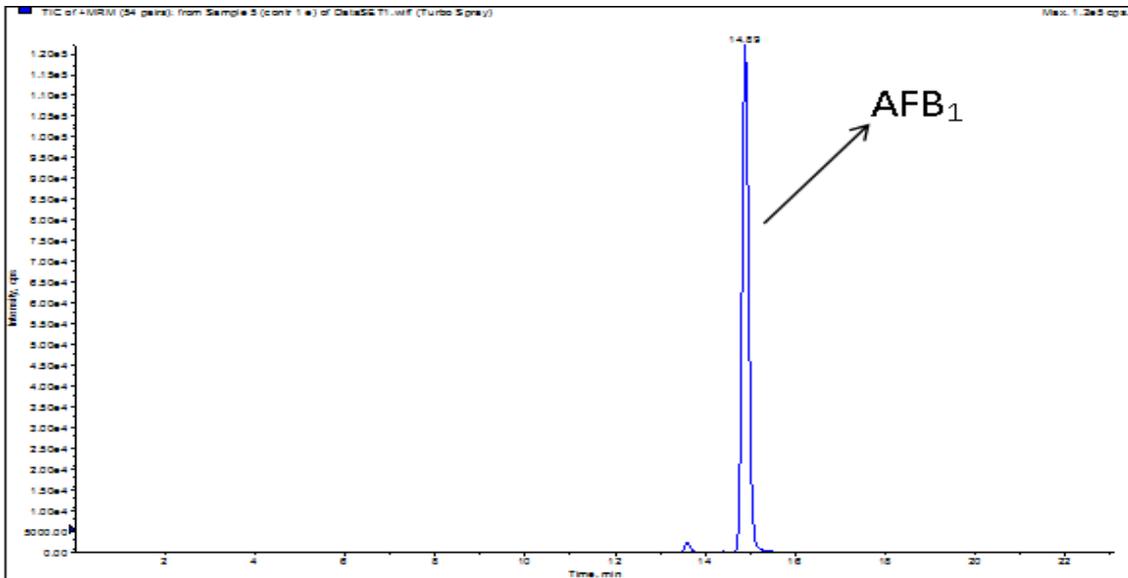
Aflatoxina B <sub>1</sub> - Quantificação - mg/Kg de queijo			
Concentração	Dispositivos antimicrobianos		
	Filtro	Adesivo	Sachê com farinha
Controle	6,03 ± 1,23 <sup>aA</sup>	6,03 ± 1,23 <sup>aA</sup>	6,03 ± 1,23 <sup>aA</sup>
2ppm	0,03 ± 0,05 <sup>bC</sup>	0,56 ± 0,13 <sup>bB</sup>	2,02 ± 0,05 <sup>bA</sup>
4ppm	< 0,001 <sup>†</sup>	< 0,001 <sup>†</sup>	< 0,001 <sup>†</sup>
8ppm	< 0,001 <sup>†</sup>	< 0,001 <sup>†</sup>	< 0,001 <sup>†</sup>
16ppm	< 0,001 <sup>†</sup>	< 0,001 <sup>†</sup>	< 0,001 <sup>†</sup>

<sup>†</sup> Os valores apresentados estão abaixo dos limites de detecção para as micotoxinas.

Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa na mesma coluna (p<0,05).

Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa na mesma linha (p<0,05).

A concentração da micotoxina AFB<sub>1</sub> (Figura 3.3) produzida pelo fungo *Aspergillus parasiticus* encontrada nas fatias de queijo muçarela são preocupantes, pois conforme a legislação brasileira o limite máximo de aflatoxinas em queijos é de 2,5 µg/kg. Portanto, todas as fatias de queijo muçarela que apresentaram concentrações de AFB<sub>1</sub> (controle e grupos tratados com 2 ppm de AIT), não estariam aptas à comercialização. Os efeitos crônicos envolvendo a ingestão de aflatoxinas estão relacionados à atividade carcinogênica, mutagênica, teratogênica, hepatotóxica e imunossupressora. A aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) é o mais potente agente hepatocarcinogênico conhecido como mais potente para mamíferos e é classificado pela IARC como um agente carcinogênico pertencente ao grupo 1 (Kießling, 1986; Wu, 2006; Ashiq, 2014). Também é importante ressaltar que a micotoxina estava presente mesmo sem o crescimento visual perceptível do fungo, o que poderia representar um risco muito alto para a saúde do consumidor. Visto que o aspecto visual do produto é o principal atributo utilizado pelo consumidor para diferir o prazo de validade do queijo muçarela. A legislação brasileira não prevê limites de população para bolores e leveduras em queijo muçarela. Portanto, a presença de fungo micotoxinogênico neste tipo de produto pode ser um grave problema de saúde pública.



**Figura 3.3** Cromatograma da aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) presente no grupo controle do queijo muçarela.

### 3.4 CONCLUSÃO

A utilização de isotiocianato de alila em diferentes concentrações e em dispositivos antimicrobianos (filtro, sachê com farinha e adesivo) foi capaz de inibir o crescimento de *Penicillium digitatum* (deteriorante) e *Aspergillus parasiticus* (micotoxigênico) em fatias de queijo muçarela embalados em sacos plástico de alta retenção de oxigênio e em bandejas plásticas, hermeticamente fechadas. A dose de 2 ppm de AIT nos dispositivos foi a única que não inibiu totalmente a produção da AFB<sub>1</sub> por *A. parasiticus* em queijo fatiado embalado em sacos plásticos de alta retenção de oxigênio. Portanto, doses iguais ou superiores a 4 ppm de AIT podem aumentar significativamente o prazo de validade e a inocuidade de queijo muçarela fatiado. Contudo, ainda é necessária a realização de testes sensoriais para a utilização desses dispositivos antimicrobianos contendo AIT, visto que este é um composto altamente pungente. Porém, acredita-se que as concentrações testadas em queijo dificilmente promoverão alteração no gosto ou no odor do queijo.

## CAPÍTULO 4

### ISOTIOCIANATO DE ALILA COMO AGENTE DE PREVENÇÃO NA PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS EM MILHO CONTAMINADO COM DIFERENTES ESPÉCIES FÚNGICAS

#### RESUMO

Muitos fungos deteriorantes de cereais são capazes de produzir quantidades significativas de micotoxinas. Estes metabólitos secundários são extremamente prejudiciais para os animais de produção, causando doenças e gerando grandes perdas produtivas e econômicas. Os isotiocianatos (ITCs) são compostos naturais derivados de vegetais crucíferos que apresentam atividade fungicida. Neste trabalho, a redução da produção de micotoxinas pelo isotiocianato de alila (AIT) gasoso foi avaliada frente à diversas espécies de fungos micotoxigênicos: *Aspergillus parasiticus* (aflatoxinas), *Fusarium tricinctum* (eniatinas), *Fusarium verticillioides* (fumonisinas), *Alternaria alternata* (alternariol e HT-2) e *Gibberella zeae* (zearalenona). O milho em grão foi tratado com AIT gasoso nas concentrações de 50, 100 ou 500 µ/L durante 48 h em frascos herméticos. Em seguida, os frascos foram abertos e o AIT liberado durante 24 h. Então, diferentes porções de 100 g de milho foram inoculadas 10<sup>5</sup> conídios/g de cada uma das espécies fúngicas (triplicatas para cada fungo). Os frascos foram mantidos a 23°C durante 30 d. Após este período, o milho foi processado e as micotoxinas extraídas e quantificadas por LC-MS/MS. Doses muito elevadas de micotoxinas foram produzidas em todos os grupos controle (sem tratamento com AIT): 119,74 mg/kg de aflatoxinas; 10,84 mg/kg de eniatinas; 4,18 mg/kg de fumonisinas B<sub>1</sub>; 3,59 mg/kg de alternariol; 2,73 mg/kg de HT-2 e 3,28 mg/kg de zearalenona. Todas as doses de AIT foram capazes de inibir a produção de micotoxinas de todas as espécies de fungos testados. Embora o AIT apresente odor muito forte, grande parte dele é volatilizado enquanto o grão de milho é moído. Portanto, o AIT pode ser utilizado como agente fumigante no milho armazenado inibindo a produção de micotoxinas, diminuindo o risco de sua ingestão pelos animais e conseqüentemente, pelos humanos.

**Palavras-chave:** Deterioração fúngica; micotoxinas; óleo essencial; milho; compostos naturais.

## ABSTRACT

The occurrence of fungi and their toxins in foods can cause alterations in the sensory properties of the products and health problems for consumers, leading to a massive economic loss for the agro-industrial sector. Synthetic preservatives are added to many foods to avoid these problems, but consumers have a bad perception about the use of synthetic additives in their food. The use of natural antimicrobials as an alternative to synthetic preservatives has been extensively studied, and the use of essential oils possessing bactericidal, fungicidal, antiparasitic and insecticide activity has great relevance in this field. Facing the need of preserving foods against fungal contaminations, this dissertation had the following objectives: analyze the antifungal activity of allyl isothiocyanate (AIT), the main compound of black and oriental mustard essential oils; verify the capacity of AIT in reducing mycotoxin production by different species; validate the use of antimicrobial devices to increase the shelf-life and safety of mozzarella cheese; and prevent the growth of mycotoxinogenic fungi in corn kernels. The first experimental work tested three antimicrobial devices containing AIT against the growth of *Penicillium digitatum* and *Aspergillus parasiticus* inoculated in mozzarella slices. These slices were packaged in a bag or a tray composed by a high oxygen-retention plastic and hermetically closed. Each package received either of the following antimicrobial devices: paper filter with AIT, sticker with AIT or a sachet containing mustard flour and water. AIT was added at 2, 4, 8 or 16 ppm (theoretical calculation was done for the production of AIT in the sachets containing mustard flour and water). Treated samples were compared to a control, which was absent of AIT. The day when fungal growth was visually detected was considered as the end of the product's shelf-life. Packages were inspected daily in 60 d. In the control groups, visual growth *P. digitatum* occurred after  $19,2 \pm 1,4$  d in trays and  $26,6 \pm 2,1$  d in plastic bags, whereas the growth of *A. parasiticus* was noticeable after  $41,4 \pm 1,7$  d and  $28,4 \pm 1,5$  d in trays and plastic bags, respectively. Cheese slices treated with AIT did not present fungal growth up to 60 d. However, AFB<sub>1</sub> was present in the control group ( $6,93 \pm 1,23$  mg/kg) and in the groups treated with 2 ppm of AIT: filter paper-treated slices presenting  $0,030 \pm 0,004$  mg/kg; sticker-treated presenting  $0,56 \pm 0,127$  mg/kg; and sachet-treated with

2,015 ± 0,049 mg/kg. These results show that all three antimicrobial devices tested are able to increase the shelf-life of sliced mozzarella and to reduce the production of AFB<sub>1</sub> by *A. parasiticus*, improving the safety of this product when using doses 4 ppm or higher. The ability of AIT to prevent the growth of mycotoxinogenic fungi (*Aspergillus parasiticus*, *Fusarium tricinctum*, *Fusarium verticillioides*, *Alternaria alternata* and *Gibberella zeae* in corn kernels was also evaluated. Kernels were treated with gaseous AIT at the concentration of 50, 100 or 500 ppm during 48h in hermetic flasks. Then, flasks were opened for 24h to let the excess of AIT evaporate and 100 g of corn were inoculated with 10<sup>5</sup> conidia/g of either fungal species (n = 3). Flasks were kept at 23°C for 30 d, and corn was processed for mycotoxin quantification by LC-MS. Mycotoxins were produced in all control groups (without AIT): aflatoxins at 119.74 mg/kg, enniatins at 10,84 mg/kg; fumonisins B<sub>1</sub> at 4.18 mg/kg; alternariol at 3.59 mg/kg; HT-2 at 2.73 mg/kg and zearalenone at 3.28 mg/kg. All doses of AIT were able to penetrate the kernels and the residual doses present in the grains after the 24 h when flasks remained opened were able to inhibit mycotoxin production by all fungal species tested. This dissertation demonstrated that AIT could be incorporated in bioactive packaging to increase the shelf-life and safety of mozzarella cheese. Moreover, low doses of ( ≤ 50 ppm) could be used to fumigate bulk packages or silos to avoid mycotoxin production in corn.

**Keywords:** Spoilage fungi; mycotoxins; essential oil; corn; natural compounds

## 4.1 INTRODUÇÃO

A produção de cereais (incluindo trigo, arroz e milho) desempenha papel extremamente importante para o fornecimento mundial de alimentos, visto que esses produtos representam cerca de 50% do total da ingestão de calorias pelos seres humanos (FAO, 2003). A produção brasileira de grãos da safra 2014/2015 pode chegar a 204,5 milhões de toneladas, acréscimo de 5,6% em relação à safra de 2013/2014 (CONAB, 2015). De acordo com a LSPA (Levantamento Sistemático da Produção Agrícola) o arroz, o milho e a soja são os principais grãos da safra de 2015, resultando em 91,6% da estimativa da produção e respondendo por 85,5% da área de plantio (LSPA, 2015). O Departamento de Economia Rural (DERAL) estima que a colheita da safra de milho no estado do Paraná em 2015 será de 10,78 milhões de toneladas, 3,8% acima das 10,39 milhões de toneladas colhidas no ano anterior. O valor bruto da produção no Paraná em 2014 alcançou R\$ 5,3 bilhões (DERAL, 2015). Do total de milho destinado à produção de ração animal, estima-se que 51,0% deste total seja direcionado ao setor avícola; 33,0% à suinocultura; 11,0% à pecuária, principalmente de leite; e 5,0% à produção da ração para outras espécies (Embrapa, 2015).

Diversos produtos alimentares, principalmente grãos e farináceos, são frequentemente contaminados por fungos, tanto na pré quanto na pós-colheita, o que pode resultar na perda de qualidade, da composição nutricional e do valor de mercado desses alimentos (Prakash et al., 2015). A contaminação agrícola por fungos produtores de micotoxinas leva a uma perda de 10% da produção de grãos (Gerk e Braus, 2014).

A exposição dos grãos de milho aos fungos do ambiente ocorre desde o campo, (principalmente pelos gêneros *Fusarium*, *Cephalosporium* e *Diplodia*), devido ao contato com microrganismos presentes no solo e água, trazidos pelo vento e por processos de irrigação (Millis, 1989). Muitos fungos também encontram-se no ambiente de estocagem, principalmente dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, sendo seu crescimento determinado por fatores ambientais, como altas temperaturas (entre 15°C a 30°C), alta umidade relativa do ar (entre 60 e 95%), alta atividade de água do grão

(superior a 0,9) e concentração do agente patogênico no ambiente (Pezzini et al., 2005; Santin et al., 2010; Dionello et al., 2012; Moses, Jayas e Alagusundaram, 2015). Após o crescimento desses fitopatógenos nas sementes do milho, muitas características de qualidade são afetadas, reduzindo o desempenho na germinação e no vigor, além de promover uma deterioração mais rápida dos grãos durante o seu armazenamento (Smith e Berjak, 1995). Além disso, eles podem produzir toxinas nos grãos, que quando consumidos, podem resultar em sério risco à saúde humana e dos animais (Abbaszadeh et al., 2014).

Devido à alta toxicidade, algumas micotoxinas são consideradas mais preocupantes, como as aflatoxinas, fumonisinas, zearalenona, ocratoxina A, patulina e alguns tricotecenos. Contudo, existe também um grupo de compostos bioativos chamados de emergentes ou micotoxinas menores, que ainda não são rotineiramente analisadas e regulamentadas (Vaclavikova et al., 2013). Nesse grupo, encontram-se classificadas micotoxinas como as eniatinas (eniatina A, eniatina A<sub>1</sub>, eniatina B, eniatina B<sub>1</sub>), fusaproliferina, beuvericina, esterigmatocistina, citrinina e o ácido ciclopiazônico (Richard et al., 2009).

Diversas técnicas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de prevenir o crescimento e a proliferação de microrganismos patogênicos na superfície e no interior dos alimentos (Tunc et al., 2007). Muitos óleos essenciais são de grande interesse para a indústria de alimentos por serem um grupo de antimicrobianos naturais de amplo espectro e seguros para o consumo (*Generally Recognized as Safe*) (Chen et al., 2014). O isotiocianato de alila (AIT) é um óleo essencial bastante volátil, característico das sementes de mostarda marrom (*Brassica juncea*) e negra (*Brassica nigra*), com sabor e odor altamente pungente. Este composto é capaz de inibir o crescimento de fungos micotoxigênicos dos gêneros *Penicillium* (Tunc et al., 2007); *Alternaria*, *Fusarium* e *Aspergillus* (Meca et al., 2012; Azaiez et al., 2013; Hontanaya et al., 2015). Alguns estudos já demonstraram que o AIT pode inibir o crescimento desses fungos em grãos quando são estocados em embalagens herméticas (Paes et al., 2011; Pires et al., 2009). Contudo, a maioria dos grãos é mantida em silos que não são totalmente fechados e sofrem constante ventilação. Por outro lado, devido à sua

lipofilicidade, o AIT é capaz de penetrar no cotilédone da maioria dos grãos utilizados na alimentação humana e animal. Dessa forma, o grão pode armazenar o AIT e liberá-lo lentamente durante um longo período de tempo. Diante disso, este estudo teve como objetivo tratar grãos de milho com AIT previamente à contaminação fúngica e verificar a capacidade desse tratamento profilático em inibir a produção de micotoxinas.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Compostos químicos e cepas fúngicas

O isotiocianato de alila (95%) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Acetonitrilo e o metanol foram obtidos da Fisher Scientific (Hempton, NH, EUA), a água ultrapura de um sistema de purificador de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). Os solventes da cromatografia e a água foram desgaseificados através de um banho ultra-sônico (Branson 5200-Ultrasonic Corp. St. Louis, MO, EUA) por 20 minutos. As cepas de *Aspergillus parasiticus* CECT 2947, *Fusarium tricinctum* CECT 20150, *Fusarium verticilloides* CECT 2983, *Alternaria alternata* CECT 2662 e *Gibberella zeae* CECT 2150 foram obtidas da Coleção Espanhola de Cultivos Tipo (CECT, Valência, Espanha).

### 4.2.2 Condições do milho e das culturas fúngicas

Foram utilizados grãos de milho (*Zea mays*) adquiridos em um comércio varejista da cidade de Valência, Espanha. O milho foi pesado e separado em porções de 100 g, que foram colocadas em frascos de conserva de 1 L. Então, os frascos com milho foram esterilizados em autoclave (121°C por 20 min). Após o resfriamento e secagem dos grãos, foram adicionadas doses de AITC referentes a 50, 100 ou 500 µL/L (em relação ao volume do frasco). O grupo controle era isento de isotiocianato de alila. Os recipientes foram hermeticamente fechados e armazenados em uma sala com temperatura controlada a 23°C por 48 h. Após isso, os recipientes foram abertos

durante 24 h para que o AIT livre fosse removido do frasco. Então, as porções de milho foram inoculadas com  $\sim 10^4$  esporos/g de *Aspergillus parasiticus* CECT 2947, *Fusarium tricinctum* CECT 20150, *Fusarium verticilloides* CECT 2983, *Alternaria alternata* CECT 2662 ou *Gibberella zeae* CECT 2150. O inóculo dos fungos foi padronizado em caldo batata dextrose (Liofilchem Bacteriology Products, Roseto, Italia) com o auxílio de um espectrofotômetro (600nm) em  $10^6$  esporos/mL, de acordo com Kelly et al (2006). Os potes com os grãos de milho foram armazenados por 30 dias em uma câmara com temperatura de 23 °C. Posteriormente, os mesmos foram autoclavados para eliminar a população fúngica e o milho foi utilizado para a quantificação de micotoxinas.

#### **4.2.3 Procedimento de extração das micotoxinas**

A extração das micotoxinas foi realizada de acordo com os protocolos de D'Arco et al. (2009). Foram pesados 5g de grãos de milho, os quais foram homogeneizados com 20 mL de metanol, utilizando um equipamento ultraturrax Ultra Ika 18 (Staufen, Alemanha) por 5 min. Esta mistura foi centrifugada a 4500 rpm durante 5 min e o sobrenadante foi evaporado com o rotaevaporador Buchi R-200 (Postfach, Suíça). O resíduo foi novamente dissolvido em 2 mL de solvente de extração. As soluções foram filtradas com um filtro de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$  e analisadas utilizando cromatografia líquida acoplada com o espectrômetro de massas (Análises Vinicos, Tomelloso, Espanha).

#### **4.2.4 Determinação de micotoxinas por LC-MS/MS**

A separação por cromatografia líquida foi realizada com uma coluna analítica Gemini C18 (150 mm, 4,6 mm, 2,1  $\mu\text{m}$ ) (Phenomenex, Madrid, Espanha) precedido por um cartucho de segurança C18 (4 mm, 2 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) (Phenomenex). As micotoxinas foram separadas usando um gradiente de eluição com água como fase A e metanol como fase B, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico e 5mM de formato de amônio. Iniciou-se a cromatografia com 65% da fase B por 3 min, que foi aumentada gradualmente para 95% em 4 min, a qual foi mantida constante por 3 min. A análise foi

realizada no modo de íons positivos. Os valores da fonte foram: tensão capilar 3,20kV; cone 50 V; extrator 3 V; lente de RF 0,2 V; temperatura da fonte 125 °C; fluxo de gás (nitrogênio com 99,99% de pureza), 500 l/h; e cone (fluxo de gás) de 50 l/h. As configurações do analisador foram: resolução de 12,0 (resolução de unidade) para a primeira e terceira quádruplas; energia de íon em 0,5; entrada e saída de energias foram 3 e 1; multiplicador a 650 V; pressão de gás em 99,99%; colisão a 3,74 mbar; atraso de 0,02 segundos; tempo total de varredura de 1,0 s. Foi utilizado um espectrômetro de massa TQ Quattro LC Micromass (Manchester, UK) equipado com um sistema de cromatografia líquida CL 2695 (Waters, Milford, MA), contendo um mostruário, uma bomba quaternária, uma sonda pneumática e para o processamento de dados, foi utilizado o software de massa Lynx NT 4.1. O espectrômetro de massa foi operado no modo “acompanhamento de reação selecionada” e foi selecionado o íon  $m/z$  313.3/ 241.3 -228.5,  $m/z$  315.3 / 259.0-288.4,  $m/z$  329.7/243.3-200.5,  $m/z$  331.9/189.3-217.1 para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>. Para FB<sub>1</sub>, 732,3/ 334.3/ 352.3; FB<sub>2</sub> e FB<sub>3</sub> 706,3/336.0/ 318.0 Para HT-2 442,1/ 215.0/ 185.0; AOH; 259.0/ 157.0/ 128.0; ZEA; 319.0/ 187.0/ 185.0; ENA; 681.9/ 228.2/ 210.0; ENA<sub>1</sub>; 667.9/ 228.2/ 210.0; ENB; 639.8/ 214.2/ 196.2; ENB<sub>1</sub> 654.9/214.2/ 196.2. O limite de detecção das aflatoxinas foi 0,1 µg/kg e o limite de quantificação era 1,0 µg/kg; para FB<sub>1</sub> o limite de detecção foi 25 µg/kg e de quantificação era 70 µg/kg; para FB<sub>2</sub> 32µg/kg e 100 µg/kg; para FB<sub>3</sub> 30µg/kg e 90 µg/kg; para HT-2 6µg/kg e 20µg/kg; para AOH 1µg/kg e 10µg/kg; para ZEA 3µg/kg e 8 µg/kg; para as ENs A, A<sub>1</sub>, B e B<sub>1</sub> 1µg/kg e 10µg/kg, respectivamente.

#### **4.2.5 Análise Estatística**

Os dados são apresentados por média ± desvio padrão. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como diferenças significativas entre o controle e os grupos. Este experimento ocorreu em triplicata. Na quantificação das micotoxinas, foi utilizado o teste *t*. para analisar as diferenças estatísticas entre os tratamentos e o grupo controle. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software STATGRAPHICS Centurion XVI versão 16.1.11.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As micotoxinas encontradas neste trabalho foram identificadas e quantificadas somente no grupo controle (conforme na tabela e figura 4.1). As aflatoxinas identificadas foram: AFB<sub>1</sub> na concentração média de 72,083 ± 12,709 mg/kg de milho; AFB<sub>2</sub> com 2,141 ± 0,341 mg/kg; AFG<sub>1</sub> com 44,166 ± 10,408 mg/kg e AFG<sub>2</sub> com 1,35 ± 0,238 mg/kg. Seguindo a legislação americana, as aflatoxinas podem apresentar teor máximo de 20 µg/kg tanto em grãos quanto em alimentos a base de milho (FDA,2011). O mesmo limite máximo de aflatoxinas para grãos de milho (20 µg/kg) é estabelecido pela legislação brasileira (RDC Nº 7, ANVISA, 2011). A legislação europeia (EC, 2007), estabelece que, o milho para processamento pode conter no máximo 5 µg/kg de aflatoxina B<sub>1</sub>, enquanto que a associação de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> não pode ultrapassar 10 µg/kg. Assim, todas as amostras controle estariam reprovadas, enquanto que as amostras tratadas estariam dentro dos limites de controle estabelecidos pelas legislações americana, brasileira e europeia.

Micotoxinas como as eniatinas (ENA, ENA<sub>1</sub>, ENB, ENB<sub>1</sub>), alternariol e HT-2 foram encontradas neste experimento, mas ainda não há legislação vigente para seu controle na Europa, no Brasil ou nos Estados Unidos. A fumonisina identificada neste estudo foi a FB<sub>1</sub> e a sua concentração foi de 4,18 ± 0,155 mg/kg. Pela legislação americana, a associação de FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> e FB<sub>3</sub> no milho para pipoca possui como limite o valor de 3000 µg/kg; na farinha de milho com teor de gordura < 2,25% em base seca, possui como limite 2,000 µg/kg e a farinha de milho com teor de gordura ≥ 2,25% em base seca, possui o limite de 4,000 µg/kg. Pela legislação brasileira, nos grãos de pipoca e na farinha de milho, os limites máximos são de 2000 µg/kg e 1500 µg/kg, respectivamente. Por sua vez, os grãos para processamento possuem limite máximo de 1000 µg/kg. Pela legislação europeia, o milho para consumo direto pode conter no máximo 1000 µg/kg; frações >500 micron de milho podem conter 1400 µg/kg e frações <500 micron de milho podem conter 2000 µg/kg. Neste caso, as amostras controle estariam reprovadas, enquanto que todas as amostras tratadas com AIT estariam aprovadas, com concentrações não detectáveis de FBs.

**Tabela 4.1** Identificação e quantificação de micotoxinas em grãos de milho tratados com diferentes concentrações de isotiocianato de alila (AIT).

<b>Fungo Produtor e Micotoxinas (mg/kg de milho)</b>				
<b>Tratamentos</b>	<b><i>Aspergillus parasiticus</i></b>			
	<b>AFB<sub>1</sub></b>	<b>AFB<sub>2</sub></b>	<b>AFG<sub>1</sub></b>	<b>AFG<sub>2</sub></b>
<b>Controle</b>	72,083 ± 12,709 <sup>a</sup>	2,141 ± 0,341 <sup>a</sup>	44,166 ± 10,408 <sup>a</sup>	1,35 ± 0,238 <sup>a</sup>
<b>50ppm</b>	<0,001 <sup>tb</sup>	<0,001 <sup>tb</sup>	<0,001 <sup>tb</sup>	<0,001 <sup>tb</sup>
<b>100ppm</b>	<0,001 <sup>tb</sup>	<0,001 <sup>tb</sup>	<0,001 <sup>tb</sup>	<0,001 <sup>tb</sup>
<b>500ppm</b>	<0,001 <sup>tb</sup>	<0,001 <sup>tb</sup>	<0,001 <sup>tb</sup>	<0,001 <sup>tb</sup>
<b><i>Fusarium tricinctum</i></b>				
	<b>ENA</b>	<b>ENA<sub>1</sub></b>	<b>ENB</b>	<b>ENB<sub>1</sub></b>
<b>Controle</b>	173,075 ± 3,685 <sup>a</sup>	559 ± 91,216 <sup>a</sup>	8223,75 ± 6,0139 <sup>a</sup>	1881,25 ± 06,419 <sup>a</sup>
<b>50ppm</b>	<0,01 <sup>tb</sup>	<0,01 <sup>tb</sup>	<0,01 <sup>tb</sup>	<0,01 <sup>tb</sup>
<b>100ppm</b>	<0,01 <sup>tb</sup>	<0,01 <sup>tb</sup>	<0,01 <sup>tb</sup>	<0,01 <sup>tb</sup>
<b>500ppm</b>	<0,01 <sup>tb</sup>	<0,01 <sup>tb</sup>	<0,01 <sup>tb</sup>	<0,01 <sup>tb</sup>
<b><i>Fusarium verticilloides</i></b>				
	<b>FB<sub>1</sub></b>			
<b>Controle</b>	4,18 ± 0,155 <sup>a</sup>			
<b>50ppm</b>	<0,025 <sup>tb</sup>			
<b>100ppm</b>	<0,025 <sup>tb</sup>			
<b>500ppm</b>	<0,025 <sup>tb</sup>			
<b><i>Alternaria alternata</i></b>				
	<b>AOH</b>	<b>HT-2</b>		
<b>Controle</b>	3,587 ± 0,371 <sup>a</sup>	2,73 ± 0,296 <sup>a</sup>		
<b>50ppm</b>	<0,01 <sup>tb</sup>	<0,06 <sup>tb</sup>		
<b>100ppm</b>	<0,01 <sup>tb</sup>	<0,06 <sup>tb</sup>		
<b>500ppm</b>	<0,01 <sup>tb</sup>	<0,06 <sup>tb</sup>		
<b><i>Gibberella zeae</i></b>				
	<b>ZEA</b>			
<b>Controle</b>	3,28 ± 0,339 <sup>a</sup>			
<b>50ppm</b>	<0,03 <sup>tb</sup>			
<b>100ppm</b>	<0,03 <sup>tb</sup>			
<b>500ppm</b>	<0,03 <sup>tb</sup>			

<sup>†</sup> Os valores apresentados significam os limites de detecção para as micotoxinas encontradas.

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística entre os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ).

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>; ENA – eniatina A; ENA<sub>1</sub> – eniatina A<sub>1</sub>; ENB- eniatina B; ENB<sub>1</sub> – eniatina B<sub>1</sub>; FB<sub>1</sub> – fumonisina B<sub>1</sub>; AOH – alternariol; ZEA – zearalenona.

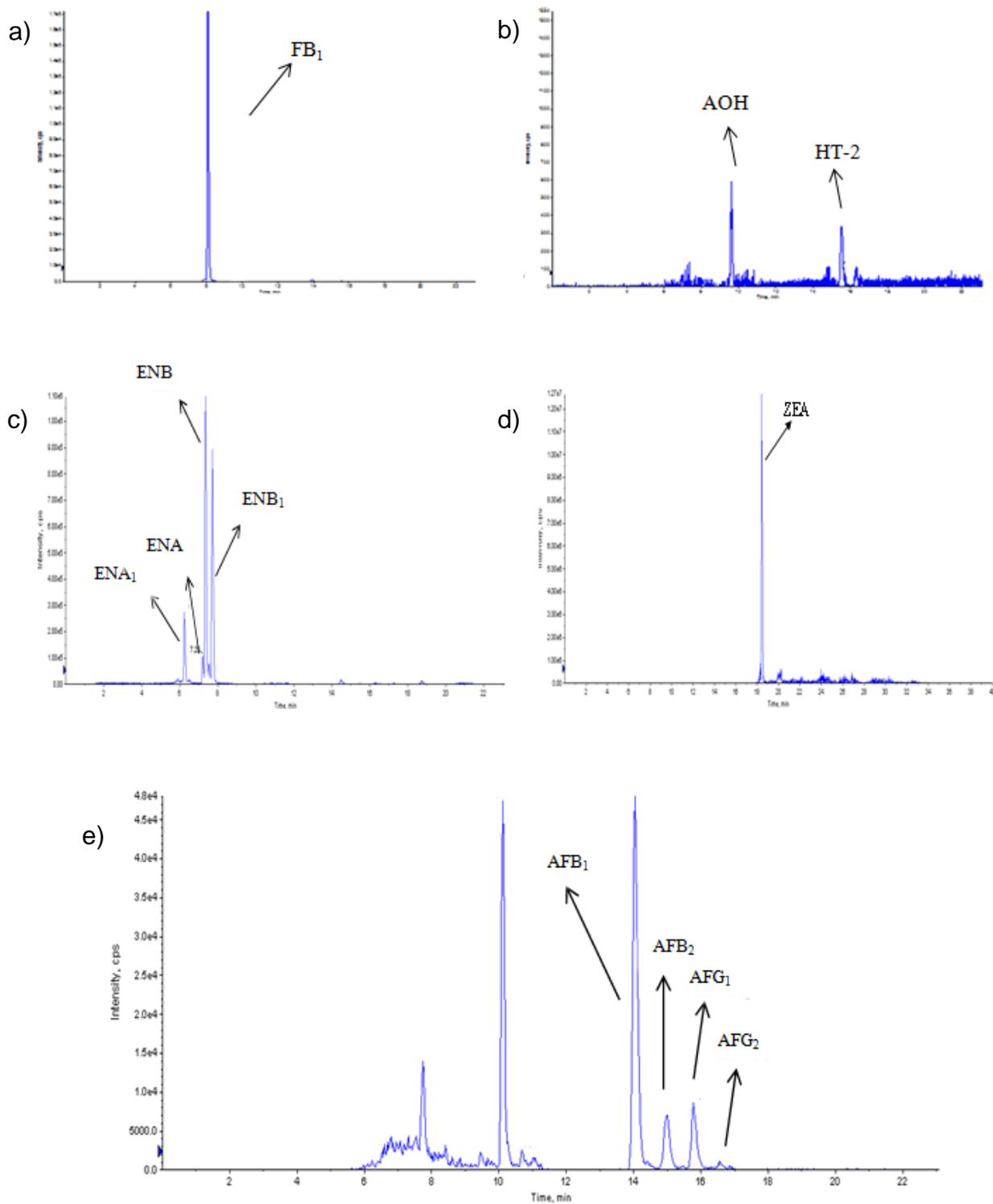
Em relação à zearalenona, a concentração encontrada neste estudo foi de 3,28 ± 0,339 mg/kg de milho no grupo controle. A legislação brasileira aceita até 150

$\mu\text{g}/\text{kg}$  para milho de pipoca,  $300 \mu\text{g}/\text{kg}$  para alimentos a base de milho e  $400 \mu\text{g}/\text{kg}$  para o milho em grãos para processamento. Pela legislação europeia, o milho não transformado pode conter no máximo  $350 \mu\text{g}/\text{kg}$ , o milho para consumo direto pode conter no máximo  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ , frações  $>$  de  $500$  micron de milho podem conter  $200 \mu\text{g}/\text{kg}$  e frações  $\leq$  a  $500$  micron de milho podem conter  $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Conforme as legislações estudadas, a zearalenona também estaria reprovada. Todas as concentrações de AIT utilizadas nos tratamentos foram capazes de inibir completamente a produção dessas micotoxinas e inibir visualmente o crescimento fúngico.

Muitos estudos utilizaram o AIT contra o crescimento fúngico e pra a redução da quantidade de micotoxinas em alimentos e em rações. Santos et al. (2010) avaliaram a qualidade dos grãos de milho estocados em embalagens herméticas (de polietileno de alta densidade) por 150 dias. Os grãos foram tratados com  $300 \mu\text{L}/\text{kg}$  de AIT, estocados em câmaras com temperaturas controladas ( $15$ ,  $25$  ou  $35^\circ\text{C}$ ), com  $14,8\%$  e  $17,9\%$  de umidade relativa. A cada  $30$  d os grãos eram analisados quanto a sua densidade, teor de umidade, potencial de germinação e condutividade elétrica. No final do experimento, não houve efeito significativo na qualidade fisiológica dos grãos de milho (potencial de germinação, umidade, densidade e condutividade elétrica) no grupo tratado com AIT, assim como não houve alteração na análise microbiológica desses grãos. Esses resultados corroboram com o presente trabalho, pois o crescimento fúngico foi evitado nos grãos expostos ao AIT em uma dose de  $300 \mu\text{L}/\text{kg}^{-1}$  (relação AIT/milho), que provavelmente se encontra entre os  $50 - 500 \mu\text{L}/\text{L}$  (relação AIT/embalagem) utilizados neste estudo.

Paes et al. (2011) avaliaram a difusão e a sorção do isotiocianato de alila no processo de fumigação do milho. No estudo da sorção, frascos de vidro contendo os grãos receberam  $15 \text{ mL}$  de AIT saturado por meio de injeção. Para o uso de difusão, foi utilizada uma camara de gás e uma coluna cilíndrica. A cada  $110$  minutos, as amostras eram coletadas e injetadas no equipamento de cromatografia gasosa. Ao final do estudo, a concentração de AIT gasoso variou de  $130,50 \text{ g}/\text{kg}$  no início do experimento para  $0,88 \text{ g}/\text{kg}$  após  $130\text{min}$  de exposição aos grãos de milho, demonstrando uma

redução de 99% em relação à concentração de AIT inicial (absorvido pelos grãos de milho). Assim, os grãos de milho parecem ser uma ótima matriz para absorção do AIT, que pode ser liberado vagarosamente durante o processo de estocagem. A exposição dos grãos de milho ao AIT por 48h no presente trabalho fez com que ocorresse a absorção do óleo no interior do grão. O AIT residual que permaneceu no grão após a fumigação de até 50  $\mu\text{L/L}$  foi capaz de inibir a produção de micotoxinas por todas as espécies fúngicas testadas. Também não foi observado o crescimento visual dos fungos em nenhum dos grupos tratados com AIT durante 30 d de estocagem. Assim, esse processo poderia ser aplicado em silos e em grão ensacados para inibir as perdas por deterioração fúngica e/ou de produtos com níveis de micotoxinas acima do preconizado pela legislação.



**Figura 4.1** Cromatogramas das micotoxinas presentes nos grupos controle dos grãos de milho; a) fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), b) alternariol (AOH) e HT-2, c) eniatina A (ENA), eniatina A<sub>1</sub> (ENA<sub>1</sub>), eniatina B (ENB) e eniatina B<sub>1</sub> (ENB<sub>1</sub>), d) zearalenona (ZEA) e e) aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), aflatoxina B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), aflatoxina G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) e aflatoxina G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>).

#### 4.4 CONCLUSÃO

A utilização de isotiocianato de alila como agente fumigante profilático foi capaz de inibir a produção de micotoxinas nos grãos de milho, quando utilizado nas doses de 50, 100 e 500  $\mu\text{L/L}$ . O uso deste composto em alimentos já é prática em diversos países e a Comunidade Europeia permite a inclusão de até 500  $\mu\text{L/L}$  de AIT na alimentação animal. Logo, o isotiocianato de alila pode ser usado como agente de fumigação na estocagem de grãos de milho, protegendo o grão contra o crescimento de fungos micotoxigênicos. Apesar do isotiocianato de alila exalar um odor forte e possuir um gosto pungente, ele é rapidamente volatilizado quando os grãos são moídos. Contudo, novos estudos devem ser realizados para observar a ação do AIT em doses mais baixas, já que a menor dose testada deste estudo foi capaz de inibir totalmente a produção de micotoxinas em um período de 30 dias de estocagem.

## CAPÍTULO 5

### 5 CONCLUSÃO GERAL

A importância da contaminação fúngica em alimentos e rações faz com que órgãos reguladores como a FAO, FDA e instituições como a União Europeia, promovam relatórios e fóruns de normatizações e aplicações de legislações, contendo índices de tolerância máxima para diversas micotoxinas. A utilização de óleos essenciais na indústria de alimentos é uma alternativa interessante aos conservantes químicos, visto que esses compostos naturais possuem potente atividade fungicida, tanto na forma líquida como gasosa. Além disso, esses compostos podem aumentar o prazo de validade de produtos alimentícios, atendendo à demanda de consumidores que buscam por produtos convenientes e que não são adicionados de conservantes químicos.

Na presente dissertação, foi demonstrada a capacidade do isotiocianato de alila incorporado a três dispositivos antimicrobianos em inibir o crescimento de fungos deteriorantes e micotoxinogênicos em queijo muçarela. No segundo trabalho, foi demonstrado que o AIT em forma de gás conseguiu inibir o crescimento e a produção de diversos fungos micotoxigênicos em grãos de milho armazenados durante 30 dias. O efeito fungicida do AIT está ligado à reatividade do carbono central do grupamento isotiocianato, que é capaz de se ligar covalentemente com hidroxilas, tióis e aminas de estruturas essenciais das células microbianas, como enzimas e fosfolípidos de membrana. Como o mecanismo de ação do AIT é inespecífico, ele se torna um antimicrobiano de amplo espectro com baixa probabilidade de formação de resistência em microrganismos. Estudos ainda devem ser realizados para testar concentrações mais baixas do isotiocianato de alila na inibição do crescimento fúngico em milho, além de provas sensoriais com o objetivo de verificar a presença de alterações no sabor e odor dos alimentos tratados com esse óleo essencial.

## REFERÊNCIAS

Abbaszadeh S., Sharifzadeh A, Shokri H, Khosravi A R, & Abbaszadeh A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*. 2014; 24: 51-56.

Abdelillah A, Houcine B, Halima D, Meriel C, Imane Z, EddineS D, & Sari Daoudi C. Evaluation of antifungal activity of free fatty acids methyl esters fraction isolated from seeds against toxigenic *Aspergillus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2013; 3: 443-448.

ABIQ. Associação Brasileira das Indústrias de Queijos. [Internet]. Avanços e perspectivas da indústria brasileira de queijos. [citado em 20 de novembro de 2014]. Disponível em: [http://www.abiq.com.br/imprensa\\_ler.asp?codigo=1003&codigo\\_categoria=2&codigo\\_subcategoria=17](http://www.abiq.com.br/imprensa_ler.asp?codigo=1003&codigo_categoria=2&codigo_subcategoria=17)

Ahamed S, Foster J S, Bukovsky A, & Wimalasena J. Signal transduction through the ras/Erk pathway is essential for the mycoestrogen zearalenone-induced cell-cycle progression in MCF-7 cells. *Molecular Carcinogenesis*. 2001; 30: 88-98.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [Internet]. Regulamento técnico sobre os limites máximos tolerados (LMT) para alimentos em micotoxinas – Resolução RDC Nº7, de 18 de Fevereiro de 2011. [acesso em 30 de junho de 2015]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/bc17db804f45fe2cbd41fdd785749fbd/Resolu%C3%A7%C3%A3o+0-2011-GGALI.pdf?MOD=AJPERES>

Ashiq S, Hussain M, & Ahmad B. Natural occurrence of mycotoxins in medicinal plants: a review. *Fungal Genetics and Biology*. 2014; 66: 1-10.

Azaiez I, Meca G, Manyes L, & Fernández-Franzón M. Antifungal activity of gaseous allyl, benzyl and phenyl isothiocyanate in vitro and their use for fumonisins reduction in bread. *Food Control*. 2013; 2:428-434.

Bakırdere S, Bora S, Bakırdere E G, Aydın F, Arslan Y, Komesli O T, & Yıldırım E. Aflatoxin species: their health effects and determination methods in different foodstuffs. *Central European Journal of Chemistry*. 2012; 10: 675-685.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, & Idaomar M. Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46: 446-475.

Balaguer M P, Lopez-Carballo G, Catala R, Gavara R, & Hernandez-Munoz P. Antifungal properties of gliadin films incorporating cinnamaldehyde and application in active food packaging of bread and cheese spread foodstuffs. *International Journal of Food Microbiology*. 2013; 166: 369-377.

Banjara N, Suhr M J, & Hallen-Adams H E. Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types. *Current Microbiology*. 2015; 70: 792-800.

Basilico J C, Debasilico M Z, Chiericatti C, & Vinderola C G. Characterization and control of thread mould in cheese. *Letters in Applied Microbiology*. 2001; 32: 419-423.

Blesa J, Marín R, Lino C M, & Mañes J. Evaluation of enniatins A, A1, B, B1 and beauvericin in Portuguese cereal-based foods. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2012; 29: 1727-1735.

Borchers A, Teuber S S, Keen C L, & Gershwin M E. Food safety. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2010; 39: 95-141.

Bousslimi A, Ouannes Z, Golli E E, Bouaziz C, Hassen W, & Bacha H. Cytotoxicity and oxidative damage in kidney cells exposed to the mycotoxins ochratoxin A and citrinin: individual and combined effects. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2008; 18: 341-349.

Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2004; 94: 223-253.

Carrillo L. *Microbiología agrícola*. Universidad Nacional de Salta Argentina. 3ª Ed. Argentina: Universidad Nacional de Salta; 2003. ISBN 987-9381-16-5.

CAST report. Mycotoxins: Risk in plant, animal and human systems - Council for Agricultural Science & Technology. Task Force Report No. 139, Ames, Iowa, USA; 2003. ISBN 1-887383-22-0.

Cejpek K, Valušek J, & Velíšek J. Reactions of allyl isothiocyanate with alanine, glycine, and several peptides in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48: 3560-3565.

Cendoya E, Monge M P, Palacios S A, Chiacchiera S M, Torres A M, Farnochi M C, & Ramirez M L. Fumonisin occurrence in naturally contaminated wheat grain harvested in Argentina. *Food Control*. 2014; 37:56-61.

Chen H, Davidson P M, & Zhong Q. Impacts of sample preparation methods on solubility and antilisterial characteristics of essential oil components in milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014; 80: 907-916.

Coelho K O, de Mesquita A J, Machado P F, de Oliveira A N, de Souza C M, & Meyer P M. Níveis de células somáticas sobre a proteólise do queijo mussarela. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. 2012; 13: 682-693.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos—safra de 2014/2015. Companhia nacional de abastecimento. Monitoramento agrícola. 2015; p. 1-122. ISSN 2318-6852.

Cunha S C, Faria M A, Pereira V L, Oliveira T M, Lima A C, & Pinto E. Patulin assessment and fungi identification in organic and conventional fruits and derived products. *Food Control*. 2014; 44: 185-190.

D'Arco G, Fernández-Franzón M, Font G, Damiani P, & Mañes J. Survey of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> in conventional and organic retail corn products in Spain and Italy and estimated dietary exposure. *Food Additives and Contaminants*. 2009; 2: 146-153.

da Cruz Cabral L, Fernández Pinto V, & Patriarca A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 2013; 166: 1-14.

Dai R, & Lim L T. Release of allyl isothiocyanate from mustard seed meal powder. *Journal of Food Science*. 2014; 79: 47-53.

Davidson P M, Critzer F J, & Taylor T M. Naturally occurring antimicrobials for minimally processed foods. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2013; 4: 163-190.

DERAL. Departamento de economia rural. [Internet]. Valor bruto da produção agropecuária em 2014. [acesso em 3 de julho de 2015]. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=5758&tit=valor-bruto-da-producao-agropecuaria-foi-de-R-706-bilhoes-em-2014>.

Desjardins A E, & Hohn T M. Mycotoxins in plant pathogenesis. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 1997; 10: 147-152.

Dhingra O D, Costa M L, Silva G J Jr, & Mizubuti E S. Essential oil of mustard to control *Rhizoctonia solani* causing seedling damping off and seedling blight in nursery. *Fitopatologia Brasileira*. 2004; 29: 683-686.

Dionello, R. G., Radünz, L., Conrad, V., Lucca Filho, O.& Elias, M. Dionello, Rafael G. Temperatura do ar na secagem estacionária e tempo de armazenamento na qualidade de grãos de milho. *Current Agricultural Science and Technology*. 2012; 6: 137-143.

do Valle J L E, da Silva Campos S D, Yootsuyanagi K, & de Souza G. Influência do teor de gordura nas propriedades funcionais do queijo tipo mozzarella. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2004; 24: 669-673.

EFSA - Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS); Scientific Opinion on the safety of allyl isothiocyanate for the proposed uses as a food additive. *EFSA Journal*. 2010; 8:1-40.

Embrapa. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. [Internet]. Mercado do milho no Brasil. [acesso em 3 de julho de 2015]. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho1ed/mercado.htm>

Escrivá L, Font G, & Manyes L. In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: A review. *Food and Chemical Toxicology*. 2015; 78: 85-206.

Eun-Sook Ahn Y S K, & Shin D H. Observation of bactericidal effect of allyl isothiocyanate on *Listeria monocytogenes*. *Food Science and Biotechnology*. 2001; 1: 31–35.

European Commission - Commission regulation - No. 1126/2007 de 28 de Setembro de 2008. Níveis máximos para contaminantes em alimentos (milho e produtos a base de milho). *Official Journal of European Union*. 2007; 255: 14-17.

FAO. Food and Agriculture Organization. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. *Food and Nutrition Paper*: Roma, Itália; 2004. ISSN 0254-4725.

FAO/IAEA. Food and Agriculture Organization. Training, Reference Centre for Food, & Pesticide Control. Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control. *Food & Agriculture Organization*: Roma, Itália; 2003. ISBN 92-5-104611-5.

FDA. Food and Drug Organization. FDA Regulatory Guidance for Mycotoxins. A guide for grain elevators, feed manufacturers, grain processors and exporters. *National grain association*: Washington; 2011.

Furtado M M, & Lourençoneto J D M. Tecnologia de queijos: manual técnico para a produção industrial de queijos. São Paulo. Dipemar; 1994.

Gammelsrud A, Solhaug A, Dendelé B, Sandberg W J, Ivanova L, Bølling A K, & Holme J A. Enniatin B-induced cell death and inflammatory responses in RAW 267.4 murine macrophages. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2012; 261: 74-87.

Gerez J R, Pinton P, Callu P, Grosjean F, Oswald I P, & Bracarense A P F. Deoxynivalenol alone or in combination with nivalenol and zearalenone induce systemic histological changes in pigs. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2015; 67: 89-98.

Gerke J, & Braus G H. Manipulation of fungal development as source of novel secondary metabolites for biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014; 98: 8443-8455.

Guynot M E, Marín S, Sanchis V, & Ramos A J. An attempt to optimize potassium sorbate use to preserve low pH (4.5–5.5) intermediate moisture bakery products by modelling *Eurotium* spp., *Aspergillus* spp. and *Penicilliumcorylophilum* growth. *International Journal of Food Microbiology*. 2005; 101: 169-177.

Harvey S G, Hannahan H N, Sams C E. Indian mustard and allyl isothiocyanate inhibit *Sclerotium rolfsii*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2002; 127: 27-31.

Heidtmann-Bemvenuti R, Mendes G L, Scaglioni P T, Badiale-Furlong E, & Souza-Soares L A. Biochemistry and metabolism of mycotoxins: A review. *African Journal of Food Science*. 2011; 5: 861-869.

Hocking A D, & Faedo M. Fungi causing thread mould spoilage of vacuum packaged Cheddar cheese during maturation. *International Journal of Food Microbiology*. 1992; 16: 123-130.

Holley R A, & Patel D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*. 2005; 22: 273-292.

Hontanaya C, Meca G, Luciano F B, Mañes J, & Font G. Inhibition of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 production by *Aspergillus parasiticus* in nuts using yellow and oriental mustard flours. *Food Control*. 2015; 47: 154-160.

Hounsome N, Hounsome B, Tomos D, & Edwards-Jones G. Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *Journal of Food Science*. 2008; 73:48-65.

Hsia C C, Wu Z Y, Li Y S, Zhang F, & Sun Z T. Nivalenol, a main *Fusarium* toxin in dietary foods from high-risk areas of cancer of esophagus and gastric cardia in China, induced benign and malignant tumors in mice. *Oncology Reports*. 2004; 12: 449-456.

Hymery N, Vasseur V, Coton M, Mounier J, Jany J L, Barbier G, & Coton E. Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2014; 13: 437-456.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC, Lyon, França, 2014.

Iqbal S Z, Rabbani T, Asi M R, & Jinap S. Assessment of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals. *Food Chemistry*. 2014; 157:257-262.

Ismaiel A A, & Tharwat N A A. Antifungal activity of silver ion on ultrastructure and production of aflatoxin B1 and patulin by two mycotoxigenic strains, *Aspergillus flavus* OC1 and *Penicillium vulpinum* CM1. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*. 2014; 24: 193-204.

Isshiki K, Tokuoka K, Mori R, & Chiba S. Preliminary examination of allyl isothiocyanate vapor for food preservation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 1992; 56: 1476-1477.

Jestoi M. Emerging *Fusarium*-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin—A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008; 48: 21-49.

Jia X Q, Xu Z N, Zhou L P, & Sung C K. Elimination of the mycotoxin citrinin production in the industrial important strain *Monascus purpureus* SM001. *Metabolic Engineering*. 2010; 12:1-7.

Jimenez M, Manez M, & Hernandez E. Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology*. 1996; 29: 417-421.

Jin T, & Gurtler J B. Inactivation of *Salmonella* in liquid egg albumen by antimicrobial bottle coatings infused with allyl isothiocyanate, nisin and zinc oxide nanoparticles. *Journal of Applied Microbiology*. 2011; 110: 704-712.

Johnson I T. Glucosinolates: bioavailability and importance to health. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 2002; 72: 26-31.

Kiessling K H. Biochemical mechanism of action of mycotoxins. *Pure and Applied Chemistry*. 1986; 58: 327-338.

Kojima, M., & Ogawa, K. Studies on the effects of isothiocyanates and their analogues on microorganisms. Effects of isothiocyanates on the oxygen uptake of yeasts. *Journal of Fermentation Technology*. 1971; 49: 740-747.

Kousta M, Mataragas M, Skandamis P, & Drosinos E H. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control*. 2010; 21: 805-815.

Kure C F, Wasteson Y, Brendehaug J, & Skaar I. Mould contaminants on Jarlsberg and Norvegia cheese blocks from four factories. *International Journal of Food Microbiology*. 2001; 70: 21-27.

Lage, D A C. Fumigação de solo com óleo essencial de mostarda para o controle da murcha de fusário em tomateiro. (Tese de Doutorado). Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa; 2009.

Lara-Lledó M, Olaimat A, & Holley R A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on bologna sausages by an antimicrobial film containing mustard extract or sinigrin. *International Journal of Food Microbiology*. 2012; 156: 25-31.

Lee D S, & Han J. Innovations in food packaging - Packaging containing natural antimicrobial or antioxidative agents. Oxford, UK: Elsevier academic press; 2005. ISBN 0-12-311632-5

Leibetseder J. Decontamination and detoxification of mycotoxins. *Biology of Growing Animals*. 2006; 4: 439-465.

Liao C D, Chen Y C, Lin H Y, Chiueh L C, & Shih D Y C. Incidence of citrinin in red yeast rice and various commercial *Monascus* products in Taiwan from 2009 to 2012. *Food Control*. 2014; 38:178-183.

Liu B H, Wu T S, Yu F Y, & Su C C. Induction of oxidative stress response by the mycotoxin patulin in mammalian cells. *Toxicological Sciences*. 2007; 95: 340-347.

Logrieco A, Rizzo A, Ferracane R, & Ritieni A. Occurrence of beauvericin and enniatins in wheat affected by *Fusarium avenaceum* head blight. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002; 68: 82-85.

Lorenz N, Haarmann T, Pažoutová S, Jung M, & Tudzynski P. The ergot alkaloid gene cluster: functional analyses and evolutionary aspects. *Phytochemistry*. 2009; 70: 1822-1832.

LSPA. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Confronto de safras de 2014 e 2015 – Brasil. [Internet]. [acesso em 3 de julho de 2015] Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/spa2015057.shm>

Luciano F B, & Holley R A. Enzymatic inhibition by allyl isothiocyanate and factors affecting its antimicrobial action against *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*. 2009; 131: 240-245.

Luongo D, De Luna R, Russo R, & Severino L. Effects of four *Fusarium* toxins (fumonisin B 1,  $\alpha$ -zearalenol, nivalenol and deoxynivalenol) on porcine whole-blood cellular proliferation. *Toxicon*. 2008; 52: 156-162.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. [Internet]. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal - RIISPOA. Cap. IV, Artigo 598. [acesso em 30 de junho de 2015]. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf)>.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. PortariaNº 146 de 07 de março de 1996 – Regulamento da Inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Diário Oficial da União de 11 de março de 1996. Brasília, DF: MAPA, 1996.

Marin S, Ramos A J, Cano-Sancho G, & Sanchis V. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 60: 218-237.

Marroquín-Cardona A G, Johnson N M, Phillips T D, & Hayes A W. Mycotoxins in a changing global environment—A review. *Food and Chemical Toxicology*. 2014; 69: 220-230.

Meca G, Luciano F B, Zhou T, Tsao R, & Mañes J. Chemical reduction of the mycotoxin beauvericin using allyl isothiocyanate. *Food and Chemical Toxicology*. 2012; 50: 1755-1762.

Medina A, & Magan N. Temperature and water activity effects on production of T-2 and HT-2 by *Fusarium langsethiae* strains from north European countries. *Food Microbiology*. 2011; 28: 392-398.

Militello M, Settanni L, Aleo A, Mammina C, Moschetti G, Giammanco G M, & Carrubba A. Chemical composition and antibacterial potential of *Artemisia arborescens* L. essential oil. *Current Microbiology*. 2011; 62: 1274-1281.

Millis J T. Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* species on cereal seeds. *Journal of Food Protection*. 1989; 52: 737-742.

Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation. Notification of claim for general recognition of safety of allyl isothiocyanate in a food shelf life extension and anti-spoilage system. *Gras Notice*; 2005.

Mohan H M, Collins D, Maher S, Walsh E G, Winter D C, O'Brien P J, & Baird A W. The mycotoxin patulin increases colonic epithelial permeability in vitro. *Food and Chemical Toxicology*. 2012; 50: 4097-4102.

Moses J A, Jayas D S, & Alagusundaram K. Climate change and its implications on stored food grains. *Agricultural Research*. 2015; 4: 21-30.

Nadarajah D, Han J H, & Holley R A. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in packaged ground beef by allyl isothiocyanate. *International Journal of Food Microbiology*. 2005; 99: 269-279.

Nascimento J A F B, Nunes V A, Guedes R M C, & Rachid M A. T-2 toxin and disturbed endochondral bone growth in broiler chicken. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2001; 53: 332-341.

Nielsen P V, & Rios R. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *International Journal of Food Microbiology*. 2000; 60: 219-229.

Noori N, Yahyaraeyat R, Khosravi A, Atefi P, Akhondzadeh Basti A, Akrami F, & Misaghi A. Effect of *zataria multiflora* boissessential oil on growth and citrinin production by *Penicillium citrinum* in culture media and mozzarella cheese. *Journal of Food Safety*. 2012; 32: 445-451.

O'Brien N M, O'Connor T P, O'Callaghan J, & Dobson A D W. Toxins in cheese. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 2004; 1: 561-571.

Paes J L, Faroni L R, Martins M A, Dhingra O D, & Silva T A. Diffusion and sorption of allyl isothiocyanate in the process of fumigation of maize. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 2011; 15: 296-301.

Panaccione D G. Origins and significance of ergot alkaloid diversity in fungi. *Fems Microbiology Letters*. 2005; 251: 9-17.

Passarinho A T P, Dias N F, Camilloto G P, Cruz R S, Otoni C G, Moraes A R F, & Soares N D F F. Sliced bread preservation through oregano essential oilcontaining sachet. *Journal of Food Process Engineering*. 2014;37: 53-62.

Pattono D, Gallo P F, & Civera T. Detection and quantification of ochratoxin A in milk produced in organic farms. *Food Chemistry*. 2011; 127: 374-377.

Perry K S. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Química Nova*. 2004; 27:293-300.

Pezzini V, Valduga E, & Cansiani R L. Incidência de fungos e micotoxinas em grãos de milho armazenados sob diferentes condições. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 2005; 64:91-96.

Pires A C D S, Soares N D F F, Andrade N J D, Silva L H M D, Camilloto G P, & Bernardes P C. Increased presevation of sliced mozzarella cheese by antimicrobial sachet incorporated with allyl isothiocyanate. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009; 40:1002-1008.

Pizaia P D, Spadoti L M, Narimatsu A, Dornellas J R F, & Roig S M. Mozzarella by ultrafiltration. *Food Science and Technology*. 2003; 23:485-491.

Popovski S, & Celar F A. The impact of environmental factors on the infection of cereals with *Fusarium* species and mycotoxin production—a review. *Acta Agriculturae Slovenica*. 2013; 101: 105-116

Prakash B, Kedia A, Mishra P K, & Dubey N K. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities—Potentials and challenges. *Food Control*. 2015; 47:381-391.

Realini C E, & Marcos B. Active and intelligent packaging systems for a modern society. *Meat Science*. 2014; 98:404-419.

Regnault-Roger C, Vincent C, & Arnason J T. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Annual Review of Entomology*. 2012; 57: 405-424.

Richard E, Heutte N, Bouchart V, & Garon D. Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. *Animal Feed Science and Technology*. 2009; 148:309-320.

Robens J, & Cardwell K. The costs of mycotoxin management to the USA: management of aflatoxins in the United States. *Toxin Reviews*. 2003; 22:139-152.

Santin J A, Gutkoski L C, Eichelberger L, Portella J A, & Durigon A. Qualidade microbiológica de grãos de milho armazenados em silos de alambrado e secados com ar natural forçado. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*. 2010; 8: 131-144.

Santos S B, Martins M A, D'Antonino Faroni L R, Junior V R, & Dhingra O D. Quality of maize grains treated with allyl isothiocyanate stored in hermetic bags. *Journal of Stored Products Research*. 2010; 46:111-117.

Scott P M. Recent research on fumonisins: a review. *Food Additives & Contaminants: part A*. 2012; 29: 242-248.

Sengun I Y, Yaman D B, & Gonul S A. Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. *World Mycotoxin Journal*. 2008; 1:291-298.

Shofran B G, Purrington S T, Breidt F, & Fleming H P. Antimicrobial properties of sinigrin and its hydrolysis products. *Journal of Food Science*. 1998; 63: 621-624.

Silva F T. Informação tecnológica - Queijo mussarela.1ª Ed. Brasília- DF: Embrapa; 2005.

Silveira S M D, Cunha Júnior A, Scheuermann G N, Secchi F L, & Vieira C R W. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against food spoilage and foodborne pathogens. *Ciência Rural*. 2012; 42: 1300-1306.

Smith M T. & Berjak P. Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccations of seed associated mycoflora during storage. *Seed Development and Germination*. 1995; 1: 701-746.

Soriano del Castillo J M. Micotoxinas en alimentos. 1ª Ed. Espanha: Ediciones Díaz de Santos; 2007.

Streit E, Schatzmayr G, Tassis P, Tzika E, Marin D, Taranu I, & Oswald I P. Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed—Focus on Europe. *Toxins*. 2012; 4:788-809.

Tatsuno T, Saito M, Enomoto M, & Tsunoda H. Nivalenol, a toxic principle of *Fusarium nivale*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1968; 16:2519-2520.

Travers-Martin N, Kuhlmann F, & Müller C. Revised determination of free and complexed myrosinase activities in plant extracts. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2008; 46: 506-516.

Tunc S, Chollet E, Chalier P, Preziosi-Belloy L, & Gontard N. Combined effect of volatile antimicrobial agents on the growth of *Penicillium notatum*. *International Journal of Food Microbiology*. 2007; 113: 263-270.

Turgis M, Vu K D, Dupont C, & Lacroix M. Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Research International*. 2012; 48: 696-702.

Ugolini L, Martini C, Lazzeri L, D'Avino L, & Mari M. Control of postharvest grey mould on strawberries by glucosinolate-derived allyl isothiocyanate treatments. *Postharvest Biology and Technology*. 2014; 90: 34-39.

Uhlig S, Torp M, & Heier B T. Beauvericin and enniatins A, A1, B and B1 in Norwegian grain: a survey. *Food Chemistry*. 2006; 94: 193-201.

Vaclavikova M, Malachova A, Veprikova Z, Dzuman Z, Zachariasova M, & Hajslova J. Emerging mycotoxins in cereals processing chains: Changes of enniatins during beer and bread making. *Food Chemistry*. 2013; 136: 750-757.

Vardon P, McLaughlin C, & Nardinelli C. Potential economic costs of mycotoxins in the United States. Council for Agricultural Science and Technology Task Force Report. 2003; 139: 136-142.

Varnam H, J P. Sutberlanmd. Milk and milk products - Technology, chemistry and microbiology. 1<sup>a</sup> Ed. Londres: Chapman and Hall; 1994.

Verma R P. Synthesis and Reactions of 1, 1-Dimethyl-3-oxobutyl-isothiocyanate (DMO-ITC). *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. 2003; 178: 365-416.

Véronique C O M A. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*. 2008; 78: 90-103.

Vig A P, Rampal G, Thind T S, & Arora S. Bio-protective effects of glucosinolates—A review. *Food Science and Technology*. 2009; 42: 1561-1572.

Walker J C, Morell S A M, & Foster H H. Toxicity of mustard oils and related sulfur compounds to certain fungi. *American Journal of Botany*. 1937; 24:536-541.

Warth B, Sulyok M, Berthiller F, Schuhmacher R, & Krska R. New insights into the human metabolism of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone. *Toxicology Letters*. 2013; 220: 88-94.

Wu F. Mycotoxin reduction in Bt corn: potential economic, health, and regulatory impacts. *Transgenic Research*. 2006; 15: 277-289.

Wu, F. Global impacts of aflatoxin in maize: trade and human health. *World Mycotoxin Journal*. 2014; 8: 137-142.

Yu F Y, Liao Y C, Chang C H, & Liu B H. Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of the mitochondrial pathway. *Toxicology Letters*. 2006; 161: 143-151.

Zabka M, & Pavela R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere*. 2013; 93: 1051-1056.

Zhang Y, & Talalay P. Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms. *Cancer Research*. 1994; 54: 1976-1981.

Zhu R, Feussner K, Wu T, Yan F, Karlovsky P, & Zheng X. Detoxification of mycotoxin patulin by the yeast *Rhodosporidium paludigenum*. *Food Chemistry*. 2015; 179: 1-5.