

ESTUDOS VISANDO A INATIVAÇÃO DAS MICOTOXINAS PRODUZIDAS PELO FUNGO *Penicillium digitatum* EM SUCO DE LARANJA

Palavras-Chave: *Penicillium digitatum*, Triptoquialaninas, Micotoxinas, Tratamentos de inativação

Autores(as):

Maria Gabriela Gonçalves Tonhosolo, IQ – UNICAMP

Eder Vilhena Araújo, IQ-UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). Taicia Pacheco Fill (orientadora), IQ - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A citricultura é uma atividade agrícola de suma importância no mundo atual, cultivada em mais de 140 países (FAO, 2024). O amplo consumo é impulsionado devido as suas propriedades nutricionais, como vitaminas, fibras e minerais, contribuindo para a saúde e bem-estar (ARAÚJO et al., 2023; NICKLAS et al., 2020). No cenário citrícola, as laranjas representam mais da metade da produção e mais de 40% das exportações, sendo a fruta cítrica mais comercializada globalmente (FAO, 2024). Segundo dados da FAO, 2022, nas últimas décadas, tem-se observado uma tendência crescente na exportação e produção de citrinos, acompanhada pelo aumento do consumo global de suco de laranja (NEVES et al., 2020). Vale citar o papel do Brasil nesse contexto, uma vez que é o

maior produtor (Figura 1) e exportador de laranjas in natura e suco concentrado no mundo. O país foi responsável pela produção de 16,9 milhões de toneladas de laranja, arrecadando cerca de 14 bilhões de reais em 2022.

Considerando a importância da citricultura, especialmente das laranjas e seus derivados, é crucial avaliar a qualidade da comercialização dessa *commoditie*, dado que essa cultura enfrenta desafios significativos relacionados à infecções fúngicas, as quais resultam em grandes prejuízos na cadeia produtiva (RODRIGUES, 2021). Em especial, o

Principais países produtores de laranja em 2022

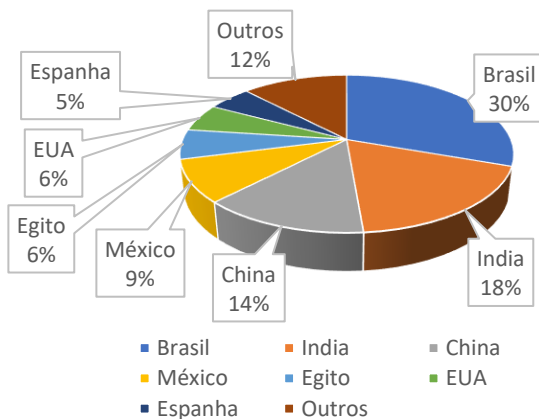


Figura 1. Principais produtores de laranja no mundo.
Fonte: FAO, 2022

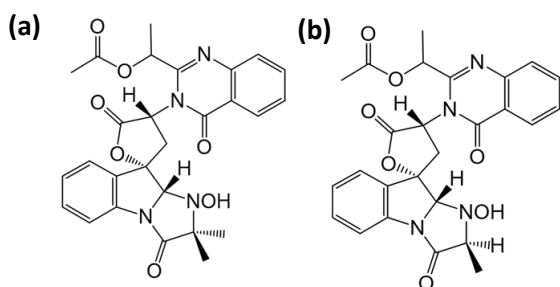


Figura 2. Estrutura química das micotoxinas do fungo *P. digitatum* (a) TA $C_{27}H_{26}N_4O_7$ 518,1801 g/mol; (b) TB

fungo *Penicillium digitatum*, é o principal fitopatógeno no período pós-colheita, e responsável pela doença bolor verde, responsável por até 60-80% das perdas totais na citricultura pós-colheita brasileira (ARAÚJO et al., 2019). Durante a infecção em hospedeiros cítricos o fungo *P. digitatum* sintetiza diversas micotoxinas, incluindo os alcaloides triptoquialaninas A (TA) e B (TB), potencialmente tremorgênicos. Nas últimas décadas diversas micotoxinas foram elucidadas e encontradas em diferentes alimentos,

cada uma delas apresentando diferentes efeitos deletérios à saúde humana e animal (IAMANAKA; OLIVEIRA; HIROMI TANIWAKI, 2010). Entretanto, pouco se sabe sobre a infecção causada pelo fungo *P. digitatum* em frutas cítricas, seu metabolismo durante a doença e a potencial toxicidade e efeitos para a saúde humana de suas micotoxinas. Isso implica na ausência de regulamentações específicas para estabelecer níveis máximos de segurança de micotoxinas em sucos de laranja, o que dificulta o controle de qualidade para o consumo de laranjas e seus derivados (ARAÚJO et al., 2019, 2023).

Em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisas ARAÚJO et al. (2023) reporta a presença das micotoxinas TA e TB em amostras de sucos comerciais (in natura e 100% integral), sugerindo que as etapas de processamento, armazenagem, distribuição e comercialização podem comprometer a segurança do produto. Além disso, no mesmo estudo foram avaliadas a capacidade das técnicas de inativação por alta pressão (HPP) e pasteurização, as técnicas mais empregadas pela indústria citrícola nacional. Após as análises foi observado que ambos os tratamentos reduziram $\leq 30\%$ dessas micotoxinas, ressaltando a necessidade de aprimoramento dos processos de segurança alimentar (ARAÚJO et al., 2023).

Neste contexto, o objetivo desse estudo é investigar o impacto da técnica de processamento por alta pressão combinado com aplicação de calor, explorando diferentes cenários para avaliar como os parâmetros de pressão, temperatura e tempo de exposição influenciam na redução do conteúdo das micotoxinas alvo.

METODOLOGIA:

I. Fermentação, Isolamento e caracterização das TA e TB

A cepa do fungo *Penicillium digitatum* utilizada no estudo foi obtida da coleção espanhola de culturas-tipo (CECT) e preservada em meio batata dextrose ágar (PDA, do inglês, *Potato Dextrose Agar*) (Costa et al., 2019). Para a fermentação em larga escala do fungo *P. digitatum* foram utilizadas 200 placas de Petri contendo o meio de cultura YES, composto por dextrose, extrato de levedura e agar, suplementado com 80 g de mesocarpo de laranjas por litro. Após o inóculo na concentração final de 10^6 esporos/mL, as placas foram incubadas a 25 °C na ausência de luz, por sete dias. Após o período de incubação, as placas de Petri contendo o fungo *P. digitatum* foram fracionadas e

transferidas para frascos de 1L contendo acetato de etila. Em seguida, os frascos foram levados ao

ultrassom por 1 hora para extração, seguido por filtração a vácuo e concentração através do uso de rota-evaporador, com banho de 40 °C e pressão de 160 mmHg e fluxo de nitrogênio. Posteriormente, o extrato bruto foi pré-purificado por meio de cromatografia em coluna de sílica

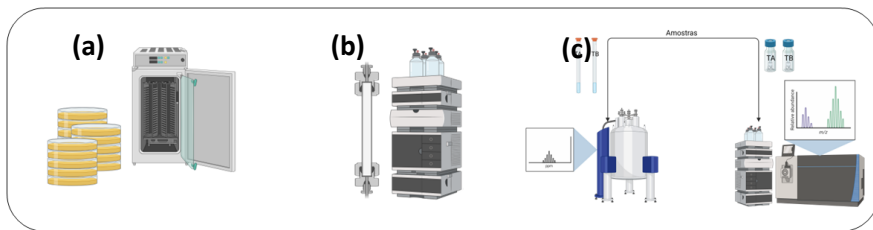


Figura 3. Principais etapas no isolamento e caracterização das TA e TB. (a) Fermentação do fungo *P. digitatum*; (b) Purificação do extrato por HPLC-UV-VIS; (c) Caracterização dos metabólitos por RMN de ^1H 400 MHz. Fonte: o próprio autor.

gel com a eluição da fase móvel em ordem de polaridade crescente na seguinte ordem: 1 L de hexano; 1 L de acetato de etila; 1,5 L de metanol:acetato de etila (1:1, v/v); por fim, 1,0 L de metanol. As frações obtidas foram concentradas em rota-evaporador seguida por concentração sob fluxo de nitrogênio.

A purificação das TA e TB foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-UV-VIS) em escala semi-preparativa, e a caracterização estrutural dos compostos foi realizada através de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H de 400 MHz e espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS), conforme Ariza, 2002, Araujo et al., 2023

II. Método analítico

Para a avaliação da eficácia do processo de inativação por alta pressão na redução do conteúdo das micotoxinas TA e TB, será empregado o método analítico QuEChERS (Quick, Easy,) e análises por LC-MS/MS, conforme Araujo et al. (2019) e (2023).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Fermentação, Isolamento e caracterização das TA e TB

A primeira etapa deste trabalho, que visa testar diferentes protocolos de inativação de micotoxinas em sucos de laranja, envolveu o cultivo do fungo em larga escala, extração, purificação e caracterização estrutural das triptoquilaninas A e B para serem utilizadas como padrões analíticos nos estudos.

Assim sendo, seguindo a metodologia supracitada foi realizado o cultivo do fungo, seguido da extração. Após a etapa de extração das placas de Petri com o meio de cultura YES, contendo os esporos do *P. digitatum* foi obtido o extrato bruto com massa de 8,54 g. Na etapa seguinte, de pré-purificação, utilizando cromatografia em coluna de sílica gel, foi obtido a massa de 2,45 g. Após purificação em HPLC semi-preparativo, foram obtidas as massas de 10,3 mg de TA e 11,2 mg de TB. Os cromatogramas dos compostos purificados contendo os metabólitos TA e TB são apresentados na Figura 4, atestando a pureza dos compostos alvo deste estudo.

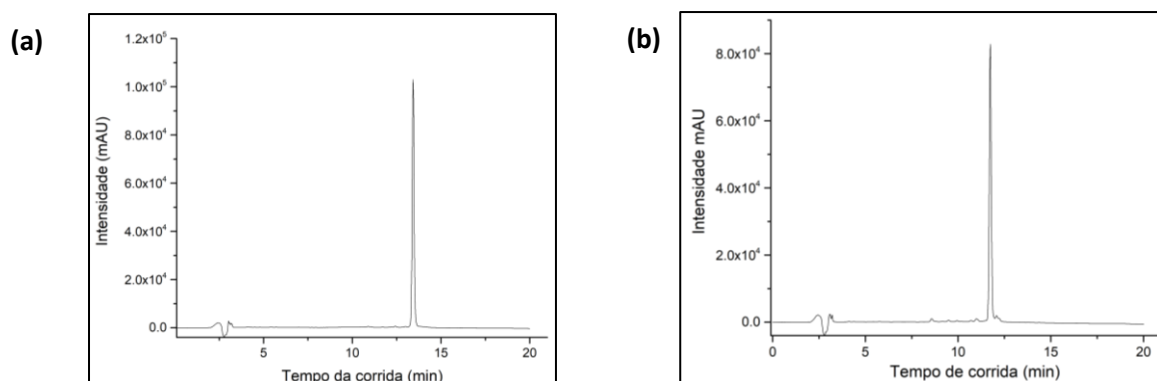


Figura 4. (a) perfil cromatográfico através de HPLC-DAD ($\lambda = 254 \text{ nm}$) do metabólito isolado TA (t_R 13,43 min); (b) perfil cromatográfico por HPLC-DAD ($\lambda = 254 \text{ nm}$) do metabólito isolado TB (t_R 11,72 min).

Caracterização:

A caracterização estrutural das micotoxinas TA e TB produzidas pelo fungo *P. digitatum* foi realizada por meio de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H), seguido de análise via LC-HRMS. Deste modo, observou-se no espectro de massas o íon m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 519.1878 referente a substância TA e o íon m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 505,1721 referente a substância TB (Figura 5), confirmando a presença das triptoquialaninas, o que também é evidenciado pelos espectros de RMN ^1H de tais compostos isolados (Figura 6). Os sinais observados nos espectros de RMN ^1H confirmam a identidade das substâncias de interesse. Além disso, obtivemos um bom rendimento dos compostos para a continuidade dos estudos de inativação destas micotoxinas em sucos de laranja.

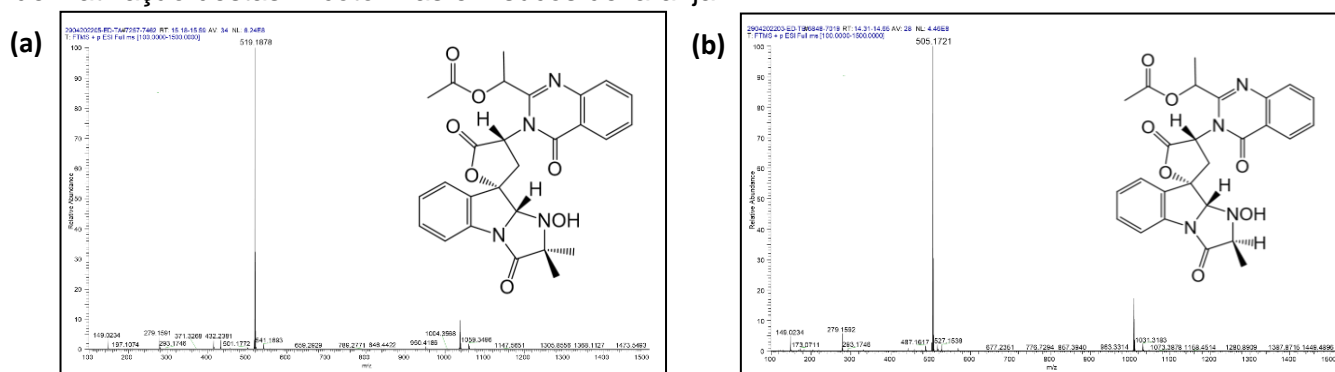


Figura 5. (a) Espectro de massas de alta resolução (modo de varredura) no modo positivo referente a banda cromatográfica 18 purificada através do HPLC-UV-VIS confirmando o isolamento da triptoquialanina A (C₂₇H₂₇N₄O₇) com m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 519,1878; (b) espectro de massas de alta resolução (modo de varredura) no modo positivo referente a banda cromatográfica 14 purificada através do HPLC-UV-VIS confirmando o isolamento da triptoquialanina B (C₂₆H₂₅N₄O₇) com m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 505,1721. Fonte: o próprio autor.

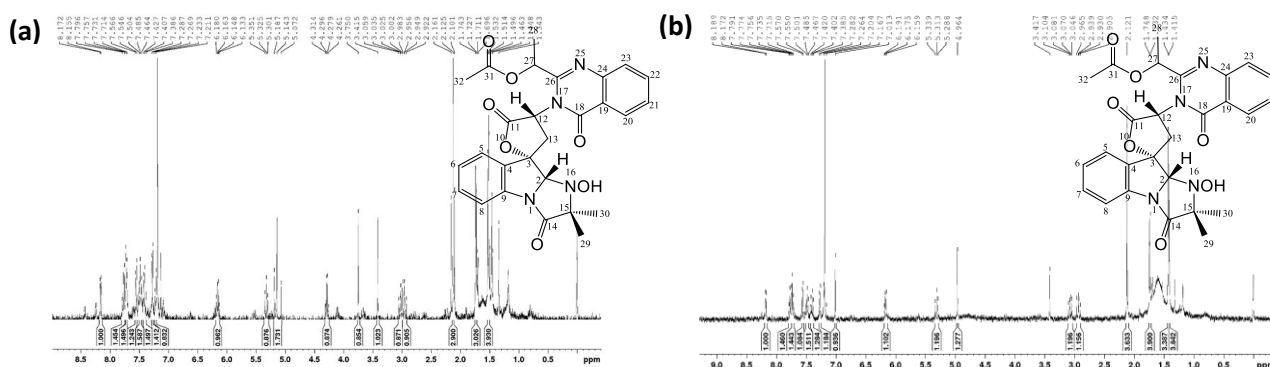


Figura 6. (a) Espectro de ^1H de NMR para o composto isolado triptoquialanina A C₂₇H₂₆N₄O₇ 518,1801 g/mol (CDCl₃, 400 MHz); (b) Espectro de ^1H de NMR para o composto isolado triptoquialanina B C₂₆H₂₄N₄O₇ 504,1645 g/mol (CDCl₃, 400 MHz). Fonte: o próprio autor.

CONCLUSÕES:

Como citado acima, foi realizado o isolamento e caracterização das triptoquialaninas A e B. Seguindo os procedimentos supracitados, foi possível obter os metabólitos de interesse, os quais serão utilizados em etapas futuras da pesquisa. A partir das micotoxinas obtidas, será possível avaliar a eficiência do processo de inativação HPP (altas pressões) combinado a aplicação de calor na redução da quantidade das micotoxinas triptoquialaninas A e B em sucos de laranja contaminados.

BIBLIOGRAFIA

- ARAÚJO, É. DE V. et al. **Determination of tryptoquialanines A and C produced by *Penicillium digitatum* in oranges: Are we safe?** Food Chemistry, p. 125285, dez. 2019.
- ARAÚJO, É. DE V. et al. **Analytical determination of tryptoquialanines A and B: Ensuring the quality and safety of orange juices.** Food Research International, p. 113607, dez. 2023.
- COSTA, J. H. et al. **Monitoring indole alkaloid production by *Penicillium digitatum* during infection process in citrus by Mass Spectrometry Imaging and molecular networking.** Fungal Biology, p. 594–600, ago. 2019.
- DEL CASTILLO, J. M. S. **Micotoxinas en alimentos.** València, España: Díaz de Santos, 2007
- FAO. **Crops and livestock products.** Disponível em: . Acesso em: 6 ago. 2024.
- IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, S.; HIROMI TANIWAKI, M. **MICOTOXINAS EM ALIMENTOS.** Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica, v. 7, p. 138–161, 2010.
- IBGE. **Produção Agrícola Mundial (PAM).** Disponível em: . Acesso em: 6 ago. 2024.
- NEVES, M. F. et al. **Global orange juice market: a 16-year summary and opportunities for creating value.** Tropical Plant Pathology, p. 166–174, 8 jun. 2020
- NICKLAS, T. A. et al. **Trends in Orange Juice Consumption and Nutrient Adequacy in Children 2003-2016.** International Journal of Child Health and Nutrition, p. 100–114, 7 ago. 2020.
- RODRIGUES, A. R. DA S. P. **Controle biológico de fungos fitopatogênicos em citros pós-colheita.** Citrus Research & Technology, p. e1073, 2021.