



DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE MICROORGANISMOS PATOGÊNICOS EM ALIMENTOS ATRAVÉS DA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SEUS METABÓLITOS.

Gabrielle Tavares Lima (PIBIC/CNPq/Uem), Claudio Celestino de Oliveira (Orientador), e-mail: ccoliveira@uem.br

Universidade Estadual de Maringá /Centro de Ciências Exatas/Maringá, PR.

Ciências Exatas e da Terra – Química (10604006)

Palavras-chave: microorganismos, extração de metabólitos, *Fusarium oxysporum*.

Resumo:

Microorganismos podem ter características benéficas ao ser humano, como aqueles utilizados na produção de alimentos, bebidas e medicamentos. No entanto, existem os microorganismos classificados como patogênicos, que quando presentes em alimentos podem causar efeitos maléficos, como as toxinfecções alimentares. Assim, existe a necessidade de se identificar e controlar a presença de microorganismos em alimentos para garantir a segurança alimentar da população. Atualmente os métodos microbiológicos são amplamente utilizados para este fim, no entanto, estes métodos são demandam muito tempo e exigem laboratórios e técnicos especializados para fazer as análises. Assim, no presente projeto é proposto o desenvolvimento de metodologia para determinação de microorganismos que possam estar presentes em amostras de alimentos através do monitoramento cromatográfico de substâncias químicas que são produzidas e/ou excretadas pelos microorganismos, o que pode contribuir para o estabelecimento de metodologias mais exatas, rápidas e sem a necessidade do estabelecimento de meios de cultura em laboratórios especializados para esta tarefa.

Introdução

Os microrganismos estão presentes em nosso cotidiano ocupando diferentes funções, no preparo de alimentos e bebidas (fermentação), produção de anticorpos e antibióticos (penicilina), participação no processo de decomposição (compostagem), tratamento de esgoto entre outras; entretanto também existem os que apresentam características negativas, tais microrganismos são denominados patogênicos, podendo representar um



risco à saúde devido à ocorrência de toxinfecções alimentares.⁽¹⁾ Os microrganismos de interesse em alimentos compreendem os fungos (bolores e leveduras) e bactérias.⁽²⁾

A segurança e qualidade microbiológica dos alimentos podem ser avaliadas observando-se o número e tipos de microrganismos presentes. A segurança é determinada pela ausência ou presença de microrganismos patogênicos ou suas toxinas, a quantidade do inóculo e o tempo de controle ou destruição desses agentes. A qualidade microbiológica pode ser avaliada quando há relação entre a ocorrência de um organismo indicador e a provável presença de um patógeno ou toxina.⁽³⁾

De acordo com a farmacopeia brasileira, a contagem do número total de microrganismos mesofílicos possibilita determinar o número total de bactérias mesófilas e fungos em produtos e matérias-primas não estéreis e, é aplicado para determinar se o produto satisfaz às exigências microbiológicas farmacopeicas. Quando usado para esse propósito, devem-se seguir as indicações dadas, incluindo o número de amostras tomadas e interpretação dos resultados. Este método necessita de meios de culturas o que implica em semanas para se conseguir um resultado. Assim, pretende-se com este projeto determinar metabólitos dos microorganismos que permitam se efetuar a identificação dos mesmos, sem a necessidade de meios de cultura, diminuindo o tempo de análise para a escala de horas.

Materiais e métodos

Métodos de extração

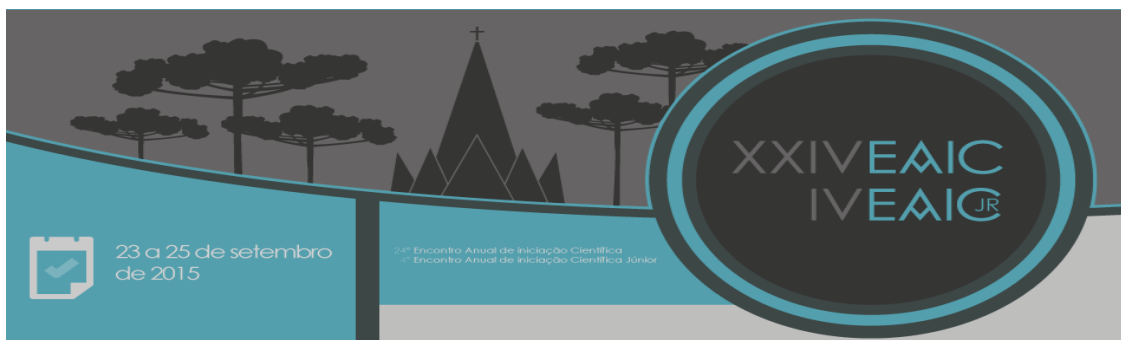
Com o objetivo de extrair os metabolitos, os ESE (fúngico e branco) foram submetidos a três processos de extração diferentes: acetato de etila (extração líquido-líquido), C18 com eluição com acetonitrila e metanol (extração em fase sólida). A solução controle (branco) passou pelos mesmos processos extração.

Preparo dos meios de cultura

Ágar batata dextrose: pesou-se 3,90 g do meio que foi adicionado a um erlenmeyer contendo 100 mL de água. Após agitação branda, o meio foi submetido a aquecimento em micro-ondas até completa solubilização. Czapek-Dox: pesou-se 0,50 g de KCl, 1,00 g de KH_2PO_4 , 2,00 g de NaNO_3 , 0,0100 g de $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,50 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 30,00 g de sacarose que foram misturados e solubilizados em 1000 mL de água destilada, sendo o pH ajustado para 5,5 com HCl 0,1 mol L^{-1} .

Isolado fúngico e condições de cultura

Cepas de *Fusarium oxysporum* foram semeadas em tubos de ensaio contendo aproximadamente 7,0 mL do meio de cultura ágar batata dextrose.



Após 7 dias de incubação a 25 °C, foi realizada uma nova semeadura, desta vez em placas de petri contendo meio de cultura Agar batata dextrose. Após 7 dias de incubação, 6 discos de 5 mm de diâmetro dessas culturas foram colocados em frascos contendo 200 mL de meio líquido Czapek-Dox; sendo preparada uma solução controle (branco) nas mesmas condições. Os frascos foram mantidos em incubadora a 25 °C, sob agitação orbital de 70 rpm por 15 dias. Após esse período, as culturas foram filtradas, com papel filtro em funil de vidro, para a remoção do micélio e uma alíquota de cada extrato foi analisada em microscópio para confirmar a ausência de contaminação na cultura. Em seguida o extrato foi esterilizado (ESE) através de filtração em membrana com porosidade de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro e reservado para posterior análise cromatográfica.

Resultados e Discussão

As análises morfológicas confirmaram que as culturas se tratavam de *F. oxysporum* e não apresentaram contaminação bacteriana, pois foi possível identificar a presença de estruturas características de *Fusarium oxysporum* tais como: (A) microconídios abundantes, cilíndrico elipsoidal principalmente não septados, retos e curvos; (B) hifas septadas hialinas; (C) clamidoconídio e (D) conidióforos individuais curtos (Fig. 1).

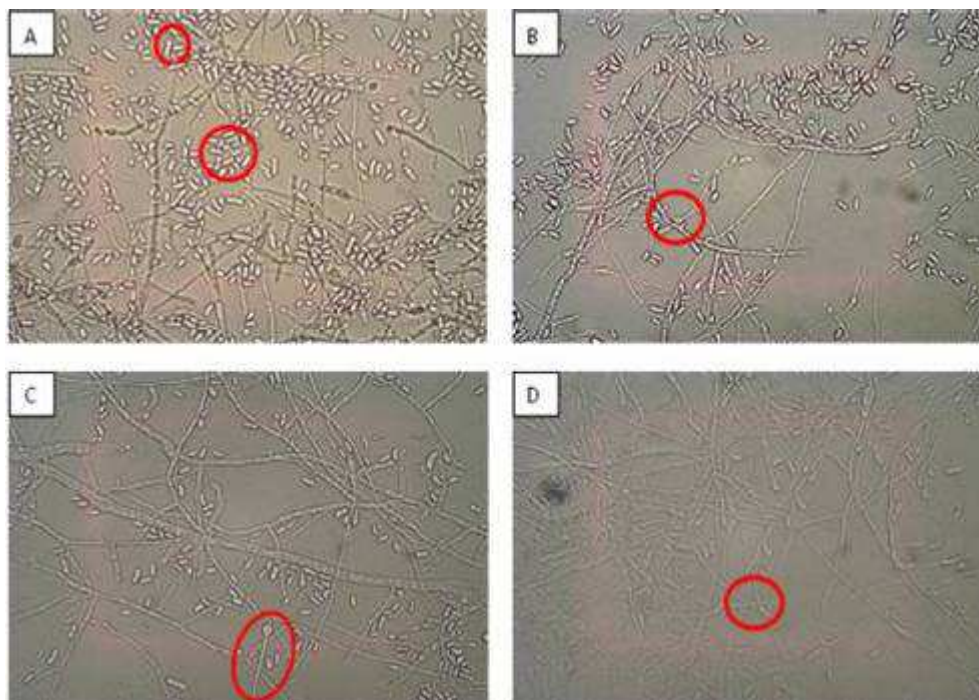
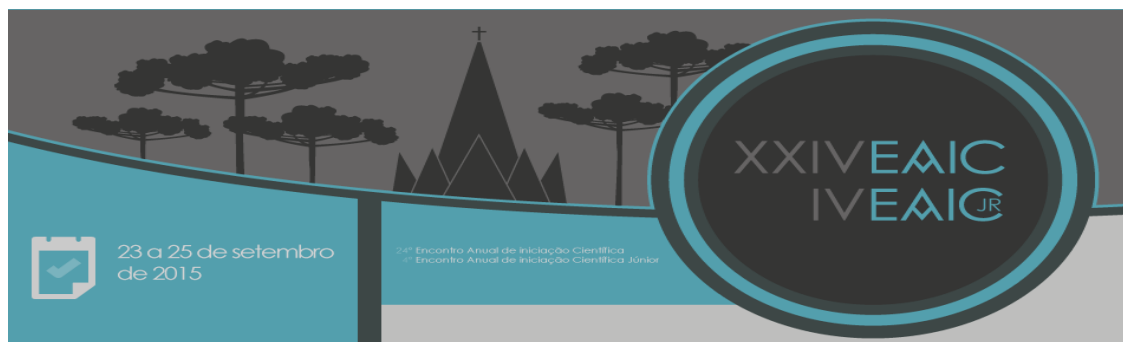


Figura 1 - Fotomicrografias de culturas de *F. oxysporum* com ampliação de 400x



Até o presente momento foram obtidos os extratos fungícos em meio de acetato de etila, em acetonitrila e metanol após extração em fase sólida utilizando fase sólida C18, bem como as fases aquosas após passarem pelo cartucho de extração com fase C18.

Todas estas fases foram congeladas e serão analisadas utilizando HPLC-DAD neste segundo semestre de desenvolvimento do projeto; quando pretende-se separar os metabólitos produzidos pelo fungo e identificar substâncias químicas que possam ser utilizadas como marcadores químicos do fungo, possibilitando assim a identificação do fungo em alimentos após extração em amostras de alimentos e posterior análise cromatográfica, eliminando-se assim, a necessidade de se efetuar meios de cultura para a identificação do fungo.

Conclusões

Foi possível obter a cultura do fungo sem contaminação e extrair os compostos químicos por três métodos diferentes. Espera-se que através de estudos cromatográficos dos extratos seja possível correlacionar a presença de certas substâncias com a presença do microorganismos em amostras de alimentos.

Agradecimentos

À CNPq pela bolsa de incentivo a pesquisa.

Referências

1. Morris, R. **Handbook of Water and Wastewater Microbiology**. 2003, 10, pp. 177-183.
2. Franco, Bernadette D. Gombossy de Melo, Landgraf, Mariza. **Microbiologia dos alimentos, 1a Ed., Rio de Janeiro, Ed. Atheneu, 1996, 182p.**
3. Cunha, Michele Almeida da. **Métodos de Detecção de Microrganismos Indicadores. Saúde & Ambiente em Revista**. Vol. 1, 2006.