

## IDENTIFICAÇÃO E PERFIL MICOTOXIGÊNICO DE FUNGO DETERIORANTE DE FRUTOS DE *Passiflora edulis flavicarpa* IN VITRO

Jonnifer de Freitas Feltrin (PIC), Juliana Cristina Castro (Orientador). E-mail: feltrinjonnifer123@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Maringá, PR.

### Farmácia/Análise Toxicológica

**Palavras-chave:** Fungo deteriorante; podridão pós-colheita; micotoxinas.

### RESUMO

A toxicidade de metabólitos secundários produzidos por fungos nos alimentos tem um grande efeito na saúde humana e vegetal, além de causar enormes perdas ao comércio. Entre as culturas afetadas por microrganismos deteriorantes e toxigênicos, o maracujazeiro é uma planta tropical da família Passifloraceae com ampla diversidade genética, onde é frequentemente acometido na pré e pós-colheita por fungos da classe do *Fusarium spp.* A pesquisa teve como objetivo identificar o fungo deteriorante dos frutos de *Passiflora edulis flavicarpa*, e ainda, o perfil micotoxigênico *in vitro* do fungo isolado por UHPLC-HRMS. Inicialmente, após isolamento, o fungo foi identificado como *Fusarium sp.*, a partir das características micro e macroscópicas. Dentre os metabólitos secundários pesquisados, somente o ácido fusárico foi detectado na amostra. Seguindo as características taxonômicas, microscópicas e toxicológicas, foi possível chegar a um resultado que levou na identificação do *Fusarium oxysporum*, entretanto, este diagnóstico só deve ser cientificamente válido após os resultados da identificação molecular.

### INTRODUÇÃO

O Brasil é um país com predomínio do clima equatorial e tropical, o que favorece o crescimento e desenvolvimento de várias espécies de fungos, muitos deles sendo deteriorantes e micotoxigênicos, acarretando uma série de problemas na saúde humana e animal. Um dos fatores de risco frente à presença destes microrganismos, é a síntese de metabólitos secundários, entre eles, substâncias tóxicas, como micotoxinas. As micotoxinas são substâncias decorrentes do metabolismo secundário de fungos filamentosos presentes em alimentos (Oga, Camargo e Batistuzzo, 2021). Entre as culturas afetadas por microrganismos deteriorantes e toxicogênicos, o maracujazeiro é uma planta tropical da família Passifloraceae com ampla diversidade genética. Estes são suscetíveis à ocorrência de doenças em pós-colheita, especialmente pelos fungos de *Fusarium spp.* e *Colletotrichum sp.*, os quais têm elevada incidência, além de *Cladosporium*, *Lasiodiplodia* e *Alternaria*, potencialmente patogênicos à cultura (Lisboa et al., 2021).

Em geral, micotoxinas estão associadas as manifestações clínicas em animais como indução ao vômito e mal-estar, até efeitos mais graves em humanos, como: neurotoxicidade e hepatotoxicidade, além da carcinogenicidade, imunotoxicidade e mutagenicidade. Diante deste exposto, o objetivo deste projeto visa identificar e avaliar o perfil micotoxigênico de fungo deteriorante de frutos de *Passiflora edulis flavicarpa in vitro*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Isolamento do fungo deteriorante*

Frutos de *Passiflora edulis flavicarpa* (10 frutos) foram coletados em mercados locais do município de Maringá, Paraná; selecionados, lavados e higienizados com de hipoclorito de sódio 1%. O microrganismo foi isolado dos frutos por incubação de 25 - 30 dias em 8°C, com sintomas decorrentes da contaminação fúngica. O tecido da epiderme (1 x 1 cm<sup>2</sup>) que contém o microrganismo foi inoculado em ágar BDA e incubados a 28°C por 7 – 15 dias.

### *Caracterização morfológica: Características macro e microscópicas*

A caracterização macroscópica foi realizada com microrganismo que foi cultivado em meio sólido de BDA e analisado quanto à aparência de colônias, forma do micélio, cor e tempo de crescimento. A caracterização microscópica foi realizada pela técnica de microcultivo.

### *Extração de metabolitos secundários in vitro*

Após a incubação, 3 placas da cepa foram cortadas com bisturi estéril em cubos (1 x 1 cm<sup>2</sup>), e o material foi transferido para tubos Falcon estéril e mantido a -80 °C por 3 horas. Foram transferidas para erlenmeyer e 60 mL acetonitrila-água-ácido fórmico (84:16:1, v/v/v) foi adicionado. O extrato foi sonicado por 60 minutos, e então agitado em agitador Shaker por 60 minutos, a 25 °C e 180 rpm. Em seguida, o extrato foi filtrado com filtro qualitativo com sistema de bomba a vácuo, centrifugado por 20 minutos a 4.500 rpm, e o sobrenadante foi filtrado em filtro PTFE 0,45 µm e armazenados a -20 °C até o momento de análise (Castro et al., 2018).

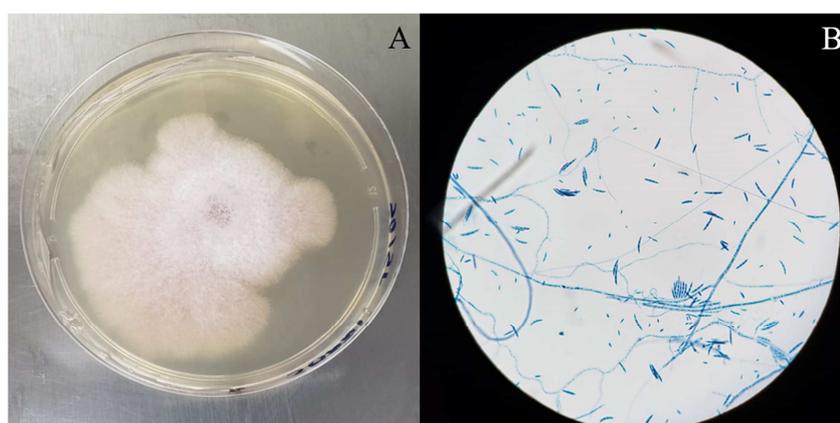
### *Método UHPL-HRMS*

Através de alíquotas dos extratos (citados no tópico acima), um sistema de cromatografia líquida de ultra alta eficiência Nexera X2 equipado com 2 bombas LC-30AD e coluna Symmetry C18 (75 x 4,6 mm), a determinação de metabolitos secundários *in vitro* foi realizada. Mantidas a 40 °C com um gradiente linear de eluição utilizando como solvente água (0,1% de ácido fórmico) (A) e acetonitrila (0,1% ácido fórmico) (B) ambos com grau de pureza LC-MS. A separação cromatográfica ocorreu em 20 minutos em modo de gradiente. Através do *software Data Analysis 4.3* foi visualizado o cromatograma de íons e os espectros de MS e MS/MS. Após isso os espectros foram comparados de acordo com a literatura e banco de dados de espectrometria de massas de livre acesso, *Human Metabolome*

Database (HMDB) por exemplo. A metodologia foi realizada de acordo com Castro, et al. (2018).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Baseado na diferenciação e identificação (características macro e microscópicas), o microrganismo isolado foi identificado como *Fusarium* sp. macroscopicamente. Colônias da cor rosa salmão e creme foram observadas nas repetidas placas de Petri incubadas em estufa a  $25 \pm 2$  °C de 15 dias. No aspecto microscópico, foi identificado que os macroconídeos possuem um comprimento relativamente curto, em formato falciforme, quase reto, de paredes finas e com 3-septos, com célula apical curta e ligeiramente em formato de gancho (Figura 01).



**Figura 01.** Identificação morfológica do fungo isolado. Imagem por microscopia óptica. A. Colônia do fungo isolado *Fusarium* sp. em meio BDA; e B. Conídeos caracterizados como *Fusarium* sp., conforme identificação microscópica. Ampliação: 40x.

Fonte: Elaboração própria.

Quanto a análise micotoxigênica, foram avaliadas treze micotoxinas características do gênero *Fusarium*, sendo elas: ácido fusárico, deoxinilvalenol (DON), diacetoxiscirpenol (DAS), fumonisinas (A1, A2, B1, B2, B3 e B4), moniliformina, tricotecenos T2, zearalenona e 15-monoacetoxiscirpenol (MAS). Ao final da análise, apenas o ácido fusárico ( $C_{10}H_{13}NO_2$ ) foi identificado na amostra ( $[M+H]^+$  180,1012) (Figura 02).

O ácido fusárico, além de aumentar a toxicidade de outras micotoxinas (Maziero, et al., 2010), pode causar alteração do crescimento celular, permeabilidade da membrana celular, inibição da síntese de ATP e quelação de cofatores importantes como ferro e zinco, além de elevar as concentrações de serotonina e triptofano no cérebro, o que pode levar a problemas na saúde do indivíduo, como: alterações no estado mental, ansiedade, taquicardia, vômito, diarreia, hiperatividade neuromuscular entre outros sintomas. Seguindo as características taxonômicas, microscópicas e toxicológicas, foi possível chegar a um resultado que levou na identificação do *Fusarium oxysporum*.

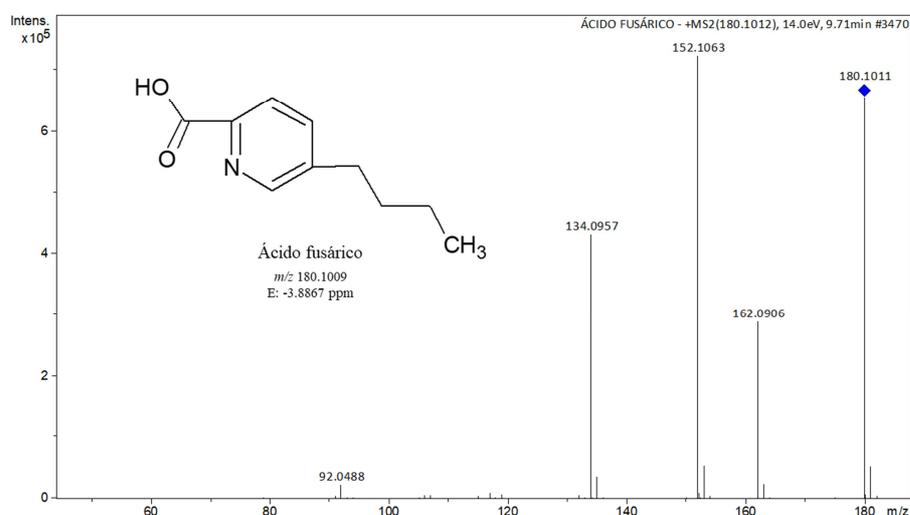


Figura 02. Espectro de fragmentação (UHPLC-ESI(+)-Qtof-MS/MS) do ácido fusárico.

## CONCLUSÕES

A partir dos frutos do maracujá, o fungo isolado foi identificado como sendo do gênero *Fusarium*, onde foi possível identificar uma micotoxina, o ácido fusárico. As toxinas produzidas pelo gênero *Fusarium* são variadas, assim como são distintas suas formas de agirem no organismo. O ácido fusárico é um metabólito secundário que além de potencializar o efeito de outras micotoxinas, pode também causar sérios danos à saúde humana, além de ser quimicamente estável e resistente à fervura, à pasteurização e ao congelamento.

## REFERÊNCIAS

CASTRO, J. C., AVINCOLA, A. S., ENDO, E. H., SILVA, M. V., DIAS FILHO, B. P., JUNIOR, M. M., PILAU, E., ABREU FILHO, B. A. Mycotoxigenic potential of *Alternaria alternata* isolated from dragon fruit (*Hylocereus undatus* Haw.) using UHPLC-Qtof-MS. **Postharvest Biology and Technology**, v.141, p.71-76, 2018.

LISBOA, M. D. S., CERQUEIRA, A., DE OLIVEIRA, M. Z. A., BARBOSA, C. D. J. Fungos associados a frutos de maracujá amarelo no estado da Bahia. Bahia: **EMBRAPA Mandioca e Fruticultura**, 2021.

MAZIERO, M.T. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de produtos agroindustriais**, n 12.1, p. 89-99, 2010.

OGA, S., CAMARGO, M. M. D. A., BATISTUZZO, J. A. D. O. **Fundamentos de toxicologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2021.