



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CÂMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA–REDE BIONORTE**

JHONATHA BARROS CABRAL

**USO DE SUBSTÂNCIAS GERALMENTE RECONHECIDAS COMO SEGURAS
(GRAS) PARA O CONTROLE DE AFLATOXINAS PRODUZIDAS POR
Aspergillus parasiticus NO MILHO (*Zea Mays*)**

**Palmas-TO
2024**

JHONATHA BARROS CABRAL

**USO DE SUBSTÂNCIAS GERALMENTE RECONHECIDAS COMO SEGURAS
(GRAS) PARA O CONTROLE DE AFLATOXINAS PRODUZIDAS POR
Aspergillus parasiticus NO MILHO (*Zea Mays*)**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Raphael Sanzio Pimenta

**Palmas-TO
2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

C117u Cabral, Jhonatha Barros.
USO DE SUBSTÂNCIAS GERALMENTE RECONHECIDAS COMO
SEGURAS (GRAS) PARA O CONTROLE DE AFLATOXINAS PRODUZIDAS
POR *Aspergillus parasiticus* NO MILHO (*Zea Mays*). / Jhonatha Barros
Cabral. – Palmas, TO, 2024.
78 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus
Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em
Biodiversidade e Biotecnologia, 2024.
Orientador: Raphael Sanzio Pimenta

1. Micotoxinas. 2. Atmosfera modificada. 3. Ácidos orgânicos. 4.
Commodity agrícola. I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer
forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.
A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184
do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da
UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

JHONATHA BARROS CABRAL

**USO DE SUBSTÂNCIAS GERALMENTE RECONHECIDAS COMO
SEGURAS (GRAS) PARA O CONTROLE DE AFLATOXINAS
PRODUZIDAS POR *Aspergillus parasiticus* NO MILHO (*Zea mays*)**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de
Doutorado do programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade e Biotecnologia - Rede
BIONORTE, na Universidade Federal do
Tocantins, como requisito parcial para a
obtenção do Título de Doutor em
Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em 21/10/2024

Banca Examinadora:

 Documento assinado digitalmente
RAPHAEL SANZIO PIMENTA
Data: 06/12/2024 12:08:29-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Prof. Dr. Raphael Sanzio Pimenta (Orientador)
UFT

 Documento assinado digitalmente
ALBERT LENNON LIMA MARTINS
Data: 09/12/2024 11:58:42-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Prof. Dr. Albert Lennon Lima Martins
UNITINS

 Documento assinado digitalmente
ALOISIO FREITAS CHAGAS JUNIOR
Data: 09/12/2024 13:37:34-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Prof. Dr. Aloísio Freitas Chagas Junior
UFT

 Documento assinado digitalmente
EDUARDO ANDREA LEMUS ERASMO
Data: 09/12/2024 15:57:24-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Prof. Dr. Eduardo Andrea Lemus Erasmo

 Documento assinado digitalmente
JULIANA FONSECA MOREIRA DA SILVA
Data: 09/12/2024 19:54:01-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Profª. Dra. Juliana Fonseca Moreira da Silva
UFT

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Elvecino e Welda.

As minhas filhas, Vitória, Júlia e Mariana.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelas bênçãos concedidas durante toda minha vida, por iluminar meu caminho e estar sempre comigo.

Ao meu orientador, Professor Dr. Raphael Sanzio Pimenta, pela orientação, confiança, paciência e apoio. Muito obrigado por compartilhar comigo seus preciosos conhecimentos.

Aos meus pais, Elvecino e Welda, pelo amor, incentivo, e apoio incondicional para que eu pudesse chegar até aqui.

As minhas filhas Vitória, Júlia e Mariana, agradeço a compreensão pelos momentos em que estive ausente e a paciência por me esperarem sempre com muito carinho e amor.

A todos os meus familiares, que sempre estiveram ao meu lado e são muito importantes na minha vida.

À Professora Dr^a Juliana Fonseca Moreira da Silva pelos conhecimentos compartilhados e por disponibilizar o Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Joenes Mucci Peluzio que colaborou significativamente com as análises estatísticas dos dados.

À Dr^a Alessandra Maria Naoe, que também colaborou com as análises estatísticas dos dados.

À Professora Dr^a Claudia Cristina Auler do Amaral Santos, que me apoiou e autorizou o meu afastamento para cursar o doutorado.

À Universidade Federal do Tocantins e ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, por me possibilitarem a realização deste doutorado.

A todos os docentes do programa de Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE.

Aos membros da banca por aceitarem o convite de participação e pelo precioso tempo dedicado à leitura desse trabalho, pelas sugestões e correções apontadas.

Agradeço a todos que estiveram diretamente envolvidos e contribuíram com a realização deste trabalho.

“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes.”

Isaac Newton

RESUMO

O milho (*Zea mays*) é um importante alimento utilizado na alimentação humana e animal. É um cereal de grande importância econômica e cultural em todo o mundo. A contaminação por fungos causa danos a essa cultura durante a pré-colheita e pós-colheita, e, além das perdas econômicas, prejuízos à saúde humana e animal, pois alguns fungos produzem as micotoxinas, que são substâncias tóxicas. Dentre as micotoxinas, destacam-se as aflatoxinas produzidas pelo fungo *Aspergillus parasiticus*, produtor de aflatoxinas tipo B1, B2, G1 e G2. A aflatoxina B1 é a mais perigosa, sendo classificada pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) como substância cancerígena de classe I. O objetivo deste trabalho foi propor uma estratégia eficaz, segura e economicamente viável para controlar o *Aspergillus parasiticus* e consequentemente reduzir a quantidade de aflatoxinas produzidas. Para isto foram utilizados três ácidos orgânicos (acético, láctico e propiônico), substâncias geralmente reconhecidas como seguras (GRAS). Os ácidos foram utilizados para produzir uma atmosfera modificada para promover a inibição do crescimento fúngico. Foram realizados testes *in vitro* em placas de Petri contendo o meio de cultura ágar batata dextrose, discos de 6mm do inóculo e as substâncias GRAS em três concentrações para cada substância. A leitura dos resultados foi realizada com um paquímetro digital, durante 6 dias. Todos os testes foram realizados em quintuplicata. Os resultados dos testes *in vitro* demonstraram que o ácido acético na concentração de 0,15%, bem como o ácido propiônico nas concentrações de 0,5%, 0,75% e 1,0%, conseguiram inibir totalmente o crescimento do *Aspergillus parasiticus*. Para os testes *in vivo* foram utilizados frascos de vidro com tampa, milho triturado, as substâncias GRAS ácido acético 0,15%, ácido propiônico 0,5% e uma mistura de ácido acético 0,15%/ácido propiônico 0,5% e a suspensão inoculante em uma concentração de $1,0 \times 10^6$ conídios/ml. A quantificação das aflatoxinas totais foi realizada com um kit da Envirologix denominado TotalTox™ Aflatoxin nos tempos de 0, 14 e 28 dias após a inoculação. Os frascos foram preparados em quintuplicata. Quando comparados o resultado do controle no dia 0 com o do 14º dia, observou-se um aumento significativo na concentração das aflatoxinas, que aumentou em 3.110%. Já comparando-se com os resultados dos tratamentos, essa redução na concentração das aflatoxinas foi de 99.6% para o tratamento com ácido acético, 100% para o ácido propiônico e 100% para o tratamento realizado com a mistura de ácido acético/ácido propiônico. Resultados da quantificação realizada no 28º dia mostrou que comparando o controle desse período com o controle no 14º dia houve um aumento de apenas 3,6% na concentração de aflatoxinas. Já este controle comparado com os resultados dos tratamentos mostrou que o ácido acético reduziu a produção de aflatoxinas em 98,72%, o ácido propiônico reduziu em 100% e a mistura de ácido acético/ácido propiônico reduziu em 100% a concentração das aflatoxinas. De acordo com os resultados obtidos no teste *in vivo* os tratamentos aplicados podem ser propostos como tratamento de escolha para o controle do fungo e consequente redução das aflatoxinas.

Palavras-chave: Atmosfera modificada; Micotoxinas; Ácidos orgânicos; *Commodity* agrícola.

ABSTRACT

Corn (*Zea mays*) is an important food source used for both human and animal consumption. It is a cereal of great economic and cultural significance worldwide. Fungal contamination causes damage to this crop during pre-harvest and post-harvest stages and, beyond economic losses, poses risks to human and animal health, as some fungi produce mycotoxins, which are toxic substances. Among these mycotoxins, aflatoxins stand out, produced by the fungus *Aspergillus parasiticus*, which generates aflatoxins of types B1, B2, G1, and G2. Aflatoxin B1 is the most dangerous and is classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as a Group 1 carcinogen. The aim of this study was to propose an effective, safe, and economically viable strategy to control *Aspergillus parasiticus* and consequently reduce the amount of aflatoxins produced. To achieve this, three organic acids (acetic, lactic, and propionic) were used, substances generally recognized as safe (GRAS). The acids were employed to create a modified atmosphere to inhibit fungal growth. *In vitro* tests were conducted on Petri dishes containing potato dextrose agar culture medium, 6mm inoculum discs, and the GRAS substances at three concentrations for each acid. Results were measured using a digital caliper over a period of six days. All tests were performed in quintuplicate. The *in vitro* results demonstrated that acetic acid at a concentration of 0.15%, as well as propionic acid at concentrations of 0.5%, 0.75%, and 1.0%, completely inhibited the growth of *Aspergillus parasiticus*. For *in vivo* tests, glass jars with lids, crushed corn, GRAS substances (acetic acid 0.15%, propionic acid 0.5%, and a mixture of acetic acid 0.15%/propionic acid 0.5%), and an inoculum suspension at a concentration of 1.0×10^6 conidia/mL were used. Total aflatoxin quantification was performed using an Envirologix kit named TotalTox™ Aflatoxin at 0, 14, and 28 days post-inoculation. The jars were prepared in quintuplicate. When comparing the control results on day 0 with those on day 14, a significant increase in aflatoxin concentration was observed, rising by 3,110%. However, when compared to the treatment results, reductions in aflatoxin concentrations of 99.6% were achieved with acetic acid treatment, 100% with propionic acid, and 100% with the acetic/propionic acid mixture. Results from quantifications performed on day 28 showed that when comparing the control from this period with the control on day 14, there was an increase of only 3.6% in aflatoxin concentration. Comparing this control with the treatment results showed that acetic acid reduced aflatoxin production by 98.72%, while propionic acid and the acetic/propionic acid mixture reduced aflatoxin concentrations by 100%. According to the *in vivo* test results, the applied treatments can be proposed as the treatments of choice for controlling the fungus and consequently reducing aflatoxins.

Keywords: Modified atmosphere; Mycotoxins; Organic acids; Agricultural commodity.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 - Métodos de prevenção e descontaminação de aflatoxinas na cadeia produtiva de alimentos e rações.....	25
Figura 2 - <i>Aspergillus parasiticus</i> em placa de Petri.....	38
Figura 3 - Crescimento radial (CR) do <i>Aspergillus parasiticus</i> em função do tempo para o ácido acético e ácido láctico.....	47
Figura 4 – Crescimento radial (CR) em função do tempo para as diferentes concentrações utilizadas das substâncias GRAS no controle de <i>Aspergillus parasiticus</i>	48
Figura 5 - Resultado do crescimento radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> aos 6 dias após incubação. (A) Controle; (B1) Ácido acético 0,05%; (B2) – Ácido acético 0,10%; (B3) Ácido acético 0,15%; (C1) Ácido láctico 0,5%; (C2) Ácido láctico 0,75%; (C3) Ácido láctico 1,0%; (D1) Ácido propiônico 0,5%; (D2) Ácido propiônico 0,75%; (D3) Ácido propiônico 1,0%.	49
Figura 6 - Fluorescência das aflatoxinas produzidas por <i>Aspergillus parasiticus</i> em ágar coco. (A) 24h após a inoculação; (B) 72h após a inoculação; (C) 144h após a inoculação.	51
Figura 7 - Tempo de permanência viável do <i>Aspergillus parasiticus</i> . (A) Tratamento com 14 dias; (B) Controle com 14 dias; (C) Tratamento com 28 dias; (D) Controle com 28 dias.....	53
Figura 8 - Frascos contendo milho com 14 dias após a inoculação de <i>Aspergillus parasiticus</i> . (A) Controle; (B) Ácido acético; (C) Ácido propiônico; (D) Ácido acético / Ácido propiônico.	57
Figura 9 - Figura 9 - Vista aproximada dos frascos contendo milho com 14 dias após a inoculação de <i>Aspergillus parasiticus</i> . (A) Controle; (B) Ácido acético; (C) Ácido propiônico; (D) Ácido acético / Ácido propiônico.	58
Figura 10- Frascos contendo milho com 28 dias após a inoculação de <i>Aspergillus parasiticus</i> . (A) Controle; (B) Ácido acético; (C) Ácido propiônico; (D) Ácido acético / Ácido propiônico.	59
Figura 11 - Vista aproximada dos frascos contendo milho com 28 dias após a inoculação de <i>Aspergillus parasiticus</i> . (A) Controle; (B) Ácido acético; (C) Ácido propiônico; (D) Ácido acético/ Ácido propiônico.....	60
Quadro 1 - Microrganismos e substratos utilizados para a produção de ácido propiônico.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais características das substâncias geralmente reconhecidas como seguras (GRAS) utilizadas no experimento.....	39
Tabela 2 - Substâncias GRAS e respectivas concentrações testadas <i>in vitro</i> de acordo com os limites máximos permitidos pela legislação vigente no Brasil.	39
Tabela 3 - Substâncias geralmente reconhecidas como seguras (GRAS) e respectivas concentrações testadas <i>in vivo</i>	41
Tabela 4 - Análise de variância conjunta do crescimento de <i>Aspergillus parasiticus</i> na presença de três ácidos distintos (ácido acético, ácido láctico e ácido propiônico) e sete tempos de incubação.	43
Tabela 5 - Médias de crescimento de <i>Aspergillus parasiticus</i> na presença de três diferentes tipos de ácido em três concentrações e sete tempos de incubação.	44
Tabela 6 - Viabilidade celular do <i>Aspergillus parasiticus</i> com 14 e 28 dias de incubação do teste <i>in vivo</i>	52
Tabela 7 - Médias de concentrações de aflatoxinas em amostras de milho contaminadas com <i>Aspergillus parasiticus</i> (0, 14 e 28 dias), após tratamento com as substâncias GRAS.	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Objetivo geral.....	17
1.2 Objetivos específicos.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Micotoxinas	18
2.2 <i>Aspergillus parasiticus</i>	19
2.2.1 Aflatoxinas	20
2.2.2 Formas de Controle	24
2.3 Substâncias geralmente reconhecidas como seguras (GRAS).....	26
2.3.1 Ácido acético	28
2.3.2 Ácido láctico	31
2.3.3 Ácido propiônico	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Testes <i>in vitro</i>	38
3.1.1 Substâncias geralmente reconhecidas como seguras (GRAS)	38
3.1.2 Inibição de crescimento do <i>Aspergillus parasiticus</i>	39
3.1.3 Detecção das aflatoxinas em ágar coco	40
3.2 Teste <i>in vivo</i>	40
3.2.1 Inoculação do <i>Aspergillus parasiticus</i> no milho	40
3.2.2 Tempo de permanência viável.....	41
3.2.3 Quantificação das aflatoxinas.....	41
3.3 Análise estatística.....	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Testes <i>in vitro</i>	43
4.1.1 Inibição do crescimento de <i>Aspergillus parasiticus</i>	43
4.2 Testes <i>in vivo</i>	51
4.2.1 Tempo de permanência viável.....	51
4.2.2 Quantificação das aflatoxinas.....	53
5 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63