

EFICÁCIA ANTIFÚNGICA DO IODO FRENTE A FUNGOS TOXIGÊNICOS

J.G. Lemos¹, A. Stefanello¹, M.V. Garcia¹, L.N. Magrini¹, J.C. Fracari¹, M.V. Copetti¹

1-Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos - Centro de Ciências Rurais - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - CEP: 97105900 - Brasil. e-mail: (jessicaglemos@gmail.com; andri_stefanello@hotmail.com; marcelovallegarcia@gmail.com; lisianicoloso@outlook.com; jfracari@gmail.com; mvc@smail.ufsm.br)

RESUMO a sanitização industrial é um processo que deve ser feito para controlar a presença de micro-organismos patogênicos ou deteriorantes. Destaca-se neste grupo, os fungos produtores de micotoxinas, que são substâncias hepatotóxicas, cancerígenas e mutagênicas. Para tal fim, utilizam-se sanitizantes químicos, entre eles o iodo, composto com baixa toxicidade e menos corrosivo que o cloro. Este trabalho objetivou testar a eficácia do iodo, em três concentrações 0,20, 0,60 e 1% para eliminação de isolados de espécies aflatoxigênicas (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius* e *Aspergillus parasiticus*) e ocratoxigênicas (*Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus westerdijkiae*) através da metodologia proposta pelo Comitê Europeu de Normalização, com adaptações. O agente apresentou eficácia máxima para inibição das três cepas de *A. flavus*, duas de *A. ochraceus* e uma de *A. westerdijkiae*. A cepa mais resistente ao agente foi *A. parasiticus* ITAL 366cc. O iodo demonstrou ser um sanitizante eficaz para controle de fungos toxigênicos.

ABSTRACT industrial sanitization is a process that must be made to control the presence of pathogenic or spoilage microorganisms. In this group, mycotoxin-producing fungi stand out, which are hepatotoxic, carcinogenic and mutagenic substances. For this purpose, chemical sanitizers are used, including iodine, a compound with low toxicity and less corrosive than chlorine. In this sense, this work aimed to test the efficacy of iodine, in three concentrations 0.20, 0.60 and 1% for eliminating isolates of aflatoxigenic species (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius* and *Aspergillus parasiticus*) and ochratoxygenic (*Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus westerdijkiae*) through the methodology proposed by the European Committee for Standardization, with adaptations. The agent showed maximum effectiveness for inhibiting the three strains of *A. flavus*, two of *A. ochraceus* and one of *A. westerdijkiae*. The most resistant strain to the agent was *A. parasiticus* ITAL 366cc. Iodine has proven to be an effective sanitizer for the control of toxigenic fungi.

PALAVRAS-CHAVE: Sanitização industrial, iodo, fungos toxigênicos, eficácia antifúngica.

KEYWORDS: Industrial sanitization, iodine, toxigenic fungi, antifungal efficacy.

1. INTRODUÇÃO

A presença de fungos toxigênicos em alimentos representa perdas econômicas para agricultura e a indústria e riscos consideráveis para os consumidores. Uma das razões mais importantes é que esses fungos podem produzir naturalmente metabólitos secundários, conhecidos como micotoxinas, altamente tóxicos e que representam um perigo à saúde da população (Rocha et al., 2014).

As espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus parasiticus* produzem as aflatoxinas B1, B2, G1, G2, micotoxinas classificadas em carcinógeno grupo 1, pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC). Já os fungos ocratoxigênicos *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus westerdijkiae* e em menor proporção *Aspergillus niger* são produtores da ocratoxina A, considerada carcinógeno 2B pela IARC (Al-Zoreky e Saleh, 2019).

Os alimentos são muito propensos à contaminação por fungos toxigênicos na pré-colheita e durante o armazenamento, principalmente quando estão sujeitos à intempéries ou umidade excessiva; ou ainda após o processamento industrial (Piotrowska, 2013; Pitt et al., 2013). Kure e Skaar (2019) relatam que na indústria de queijo o leite raramente vem do campo contaminado por fungos, sendo que esta pode ocorrer em diferentes estágios de produção, principalmente quando o ar na planta de produção estiver contaminado com esporos fúngicos em diferentes níveis. Os esporos transportados pelo ar podem contaminar a coalhada nos vasos e cubas e posteriormente o alimento (Jahn et al., 2017). O ar e ambiente de processamento também tem sido destacados como importantes fontes de contaminação de alimentos por espécies potencialmente toxigênicas em outras matrizes, como pães, nuggets e salames (Wigmann et al., 2015; Wigmann et al., 2018; Garcia et al., 2019; Parussolo et al., 2019). Uma vez contaminados, quando houver condições permissivas (especialmente de temperatura e conteúdo aquoso) os esporos fúngicos poderão germinar, deteriorar o produto e produzir micotoxinas.

Nas últimas décadas, a busca por maneiras eficazes, seguras e econômicas para reduzir a contaminação de alimentos por fungos a partir do ambiente e a subsequente produção de micotoxinas nas matrizes alimentares tem aumentado (Wang et al., 2018, Bernardi et al., 2019). A forma mais comum de controle é através da utilização de sanitizantes químicos, agentes que reduzem o número de micro-organismos de um micro-ambiente a níveis seguros (Brasil, 2007). A função desses sanitizantes químicos é evitar que micro-organismos, incluindo esporos de espécies fúngicas toxigênicas presentes no ar, nas superfícies e nos utensílios, permaneçam viáveis no ambiente de produção e sejam propagados, contaminando os produtos alimentícios.

Dentre os agentes sanitizantes permitidos pela legislação brasileira para aplicação em indústrias alimentícias, o iodo tem alto poder de penetração na parede celular, levando à ruptura de proteínas. Sendo menos irritante à pele e menos corrosivo aos metais que o cloro, ativo em baixa concentração e relativamente estável (Nascimento et al., 2010).

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia do iodo como agente sanitizante frente a espécies de fungos produtores de aflatoxinas: *A. flavus*, *A. nomius*, *A. parasiticus*; produtores de ocratoxina A: *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. niger* e *A. westerdijkiae*, e os fungos considerados padrões para o ensaio com sanitizantes: *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 e *Candida albicans* ATCC 24433

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As cepas utilizadas no estudo estão listadas na Tabela 1, que apresenta também suas identificações e fontes de origem.

Tabela 1- Cepas fúngicas usadas no teste de eficácia de sanitizantes e sua fonte de isolamento.

Espécie	Cepa	Fonte de Isolamento
<i>Aspergillus parasiticus</i>	ITAL 244cc	Cacau, Brasil
<i>Aspergillus parasiticus</i>	ITAL 366cc	Cacau, Brasil
<i>Aspergillus flavus</i>	ITAL 149cc	Cacau, Brasil
<i>Aspergillus flavus</i>	ITAL 378cc	Cacau, Brasil
<i>Aspergillus flavus</i>	ITAL 809cc	Cacau, Brasil
<i>Aspergillus nomius</i>	ITAL 73cc	Cacau, Brasil
<i>Aspergillus carbonarius</i>	ITAL 792cc	Cacau, Brasil

<i>Aspergillus niger</i>	ITAL 331F	Cacau, Brasil
<i>Aspergillus niger</i>	ITAL 1240cc	Cacau, Brasil
<i>Aspergillus ochraceus</i>	ITAL 150cc	Cacau, Brasil
<i>Aspergillus ochraceus</i>	ITAL 201cc	Cacau, Brasil
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	ITAL 1524cc	Cacau, Brasil
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	LAMA 01/19 ham	Copa, Brasil
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404	Mirtilo, USA
<i>Candida albicans</i>	ATCC 24433	Plasma humano

Os micro-organismos foram inoculados em tubos contendo Ágar Extrato de Malte (MEA). Após o tempo de incubação de 7 dias a 25 °C os esporos foram lavados com solução polissorbato 0,05%, e diluídos em solução de água peptonada 0,1% para fazer a padronização do inóculo em 10^7 esporos conforme contagem na Câmara de Neubauer (Bernardi et al., 2018).

Foram utilizadas três concentrações de solução de iodo, conforme indicação no rótulo do produto. A concentração máxima indicada correspondeu a 1%, a mínima à 0,2% e calculou-se uma concentração intermediária entre estes dois valores (0,6%). O agente neutralizante utilizado foi o Polissorbato 80 a 0,5%.

Os testes foram realizados seguindo as normas do Comitê Europeu de Normalização (CEN) (European Standard 13697, 2001) com adaptações (Bernardi et al., 2018). Cinquenta microlitros (50 µL) da suspensão com 10^7 conídios adicionado de 0,05% de leite em pó desnatado reconstituído foram inoculados em discos de aço inox 304 com 2 cm de diâmetro. Para cada fungo foram utilizados 2 discos para o controle e 3 para cada concentração do sanitizante. Os discos foram colocados em estufa (Novus N1040) para fixação do inóculo por 45 min a 35 °C. Depois 100 µL do sanitizante foram colocados sobre os discos por 15 min. Para o controle, foram inoculados 100 µL de água destilada esterilizada. Após o tempo, os discos foram imersos em líquidos de neutralização específico para o sanitizante. Sucederam-se diluições seriadas em água peptonada 0,1%, e 1 mL de cada diluição foram inoculadas em placas de Petri estéreis que receberam também o meio Ágar Extrato de Malte (extrato de malte grau alimentício 13,5 g, ágar 6,75 g e água destilada, 450 mL) na técnica de plaqueamento em profundidade. Incubou-se as placas por 7 dias em temperatura de 25 °C, fazendo-se a leitura dos resultados.

A eficácia do iodo foi calculada através da diferença entre o número de células recuperadas nas placas referentes aos discos que não foram expostos ao sanitizante e das placas relacionadas aos discos que foram expostos aos agentes. Para analisar a recuperação dos fungos após a exposição ao agente, foi feita análise de variância (ANOVA) que utilizou o teste Scott-Knott ($p < 0.05$) As análises foram realizadas pela versão 5.6 do SISVAR® Software.

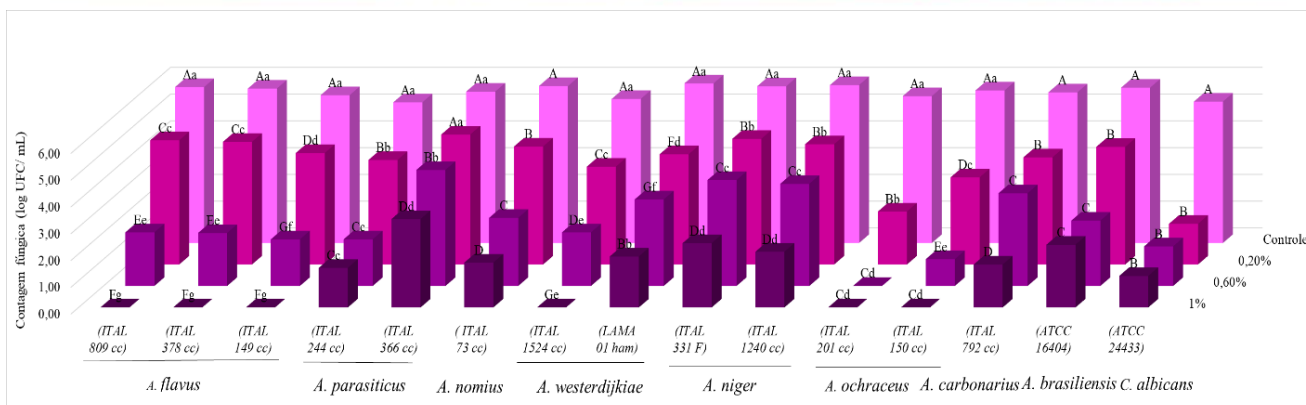
De acordo com normativa do CEN (European Standard 13697, 2001), um agente sanitizante é considerado eficaz quando for capaz de reduzir em pelo menos 3 log (99,9%) a população microbiana exposta, quando comparada ao controle.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha do sanitizante correto, ou seja, eficaz para a eliminação de determinado grupo de fungos, como os toxigênicos, é muito importante para reduzir as perdas e principalmente a exposição dos consumidores às micotoxinas nos alimentos. Esses fungos têm acesso ao ambiente industrial principalmente através de matérias-primas contaminadas, e acabam espalhando-se pelo ar e depositando-se nas superfícies de trabalho, equipamentos e utensílios (Bernardi et al., 2018).

A Fig. 1 apresenta os resultados da eficácia do iodo contra fungos toxigênicos, em que estão representadas as contagens finais dos micro-organismos após a exposição ao sanitizante, comparado com o controle inicial não exposto.

Fig 1: Eficácia do sanitizante iodo, em diferentes concentrações, frente a fungos micotoxigênicos



Diferentes letras minúsculas na mesma espécie representam diferença entre as cepas numa mesma concentração do sanitizante; e diferentes letras maiúscula na mesma espécie representam diferença entre as concentrações do sanitizante; ambos conforme teste Scott-Know ($p < 0,05$).

Pode-se observar que em sua concentração máxima (1,0%) o iodo foi eficaz para redução de ao menos 3 log da população inicial de 14/15 (93,3%) isolados testados. Destacam-se as três cepas de *A. flavus* (ITAL 809cc, ITAL 378cc, ITAL 149cc), a cepa *A. westerdijkiae* ITAL 1524 cc, e as duas cepas de *A. ochraceus* (ITAL 201cc e ITAL 150cc) que foram as mais sensíveis ao agente. Em sua concentração intermediária (0,60%) o iodo foi eficaz em 10/15 (66%) das cepas avaliadas. O fungo mais sensível foi *A. ochraceus* ITAL 201cc. O *A. niger* ITAL 331F demonstrou resistência ao sanitizante nesta concentração. Houve diferença estatística entre a resistência das cepas de *A. westerdijkiae*, o isolado LAMA 01 ham se mostrou mais resistente que a ITAL 1524cc. Na concentração mais baixa, (0,20%), o agente foi eficaz na redução de apenas 2/15 cepas testadas: a já mencionada *A. ochraceus* ITAL 201cc e a cepa padrão *C. albicans*. Para as outras cepas, a redução variou entre 0,76 e 2,9 log. Portanto não é recomendado o uso da concentração de 0,20% quando o objetivo é eliminar a contaminação de fungos toxigênicos no ambiente industrial.

Houve diferença da ação sanitizante nas cepas de *A. ochraceus*. A cepa ITAL 201cc foi a mais sensível dentre as espécies toxigênicas testadas, pois o iodo na sua menor concentração conseguiu reduzir em mais de 3 log a população inicial do micro-organismo. A cepa mais resistente ao iodo, inclusive na concentração máxima de 1%, foi *A. parasiticus* ITAL 366cc, diferenciando-se estatisticamente da cepa ITAL 244cc por apresentar redução de apenas 2,35 log enquanto a segunda apresentou redução de 3,51 log na concentração máxima do agente. O isolado ITAL 366cc, foi o único a apresentar redução menor que 1 log na concentração mínima do agente, demonstrando grande resistência. Os fungos padrões para o ensaio mostraram maior sensibilidade ao agente quando comparados aos fungos toxigênicos. O *A. brasiliensis* cepa ATCC 16404 ao ser exposto à concentração intermediária do sanitizante, apresentou redução de 3,36 log. A *C. albicans* cepa ATCC 24433 foi a espécie mais sensível de todas as testadas, pois já na concentração menor de iodo (0,20%), teve uma redução de 3,76 log. A ação dos compostos iodados deve-se principalmente pela liberação do I_2 pelas soluções aquosas desses compostos. Em relação às células vegetativas, pressupõe-se que o I_2 penetre na parede celular, ocasionando a destruição da estrutura proteica. Além disso, haveria uma ação ao nível do protoplasma onde o I_2 , inibiria sistemas enzimáticos por meio da oxidação do aminoácido tirosina, formando diiodotirosina, causando alterações e até inativação da atividade enzimática (Germano e Germano, 2003). O iodo apresenta algumas vantagens como o fato de não ser irritante à pele, de ser menos sensível que o cloro em presença de matéria orgânica, de ter baixa toxicidade, boa estabilidade durante seu armazenamento e eliminar fungos leveduriformes mais rápido do que os compostos clorados. Porém perde sua ação germicida quando empregado a temperaturas elevadas (Evangelista, 2003).

4. CONCLUSÃO

Com a realização do estudo pode se observar que nas maiores concentrações o iodo é um agente sanitizante eficaz que pode ser aplicado nas instalações industriais quando o objetivo é inibir o crescimento de fungos toxigênicos. O agente apresentou máxima eficácia para seis isolados fúngicos (*A. flavus*: ITAL 809cc, ITAL 378cc, ITAL 149cc; *A. westerdijkiae*: ITAL 1524cc e *A. ochraceus*: ITAL 201cc, ITAL 150cc) das quinze

cepas testadas quando avaliada a maior concentração (1%), sendo essa a concentração mais eficaz, seguida da concentração de 0,60%. O sanitizante somente foi ineficaz em sua menor concentração (0,20%). O sucesso da desinfecção depende não apenas das características do produto e do modo como é usado, mas também das características dos micro-organismos presentes no local e sua sensibilidade aos desinfetantes empregados. Assim, esse estudo é útil por demonstrar a boa eficácia deste agente sobre as principais espécies de fungos produtores de micotoxinas, podendo ser empregado em processos de higienização industrial, tanto no ambiente, em ar e equipamentos.

5. AGRADECIMENTOS

Este estudo foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por meio de bolsas de mestrado e doutorado para J.G.L., A.S. e M.V.G. (Código financeiro 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo 428454 / 2018-6) e uma bolsa de pesquisa para M.V.C. (Processo 303570 / 2019-9) e bolsas de graduação Pibic-CNPq e Probic-FAPERGS para L.N. M. e J.C.F.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Zoreky, N. S., & Saleh, F. A. (2019). Limited survey on aflatoxin contamination in rice. *Saudi Journal of Biological Science*, 26(2), 225-231.
- Bernardi, A. O., Stefanello, A., Garcia, M. V., Parussolo, G., Stefanello, R. F., Moro, C. B., & Copetti, M. V. (2018). Efficacy of commercial sanitizers against fungi of concern in the food industry. *LWT - Food Science and Technology*, 97, 25-30.
- Bernardi, A.O., Garcia, M.V., & Copetti, M.V. (2019). Food industry spoilage fungi control through facility sanitization. *Current Opinion in Food Science*, 29, 28-34.
- Brasil, (2007). Resolução de diretoria colegiada – RDC Nº 14, DE 28 de fevereiro de 2007 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).
- European Standard n 13697, 2001. Chemical Disinfectants and Antiseptics –Quantitative Non-porous Surface Test for the Evaluation of Bactericidal And/orFungicidal Activity of Chemical Disinfectants Used in Food, Industrial, Domestic and Institutional Areas - Test Method and Requirements without Mechanical Action. (phase 2, step 2).
- Evangelista, J. (2003). *Tecnologia de Alimentos*. São Paulo. Atheneu.
- Garcia, M. V., Bregão, A. S., Parussolo, G., Bernardi, A. O., Stefanello, A., & Copetti, M. V. (2019). Incidence of spoilage fungi in the air of bakeries with different hygienic status. *International Journal of Food Microbiology*, 290, 254-261.
- Germano, P. M. L., & Germano, M. I. S. (2003). *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. 2ª ed. São Paulo. Varela.
- IARC: <http://monographs.iarc.fr/eng/classification/classificationsalphaorder>. Acessado: 13 Janeiro 2020.
- Jahn, R. C., Garcia, M. V., & Copetti, M. V. (2017). Deterioração fúngica em indústria de queijo tropical. *Brazilian Journal of Forestry Research*, 8(1), 16-25.
- Kure, C. F., & Skaar, I. (2019). The fungal problem in cheese industry. *Current Opinion in Food Science*, 29, 14-19.
- Nascimento, H. M., Delgado, D. A., & Barbaric, I. F. (2010). Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. *Revista Ceciliana*, 2, 11-13.
- Parussolo, G., Oliveira, M. S. Garcia, M. V., Bernardi, A. O., Lemos, J. G., Stefanello, A., Mallmann, C. A., & Copetti, M. V. (2019). Ochratoxin A production by *Aspergillus westerdijkiae* in Italian-type salami. *Food Microbiology*, 83, 134-140.
- Pitt, J. I., Taniwaki, M. H., & Cole, M. B. (2013). Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of Food Safety Objectives. *Food Control*, 32, 205-215.
- Piotrowska, M. (2013). Contamination of breakfast cereal products by fungi and mycotoxins – A potential risk for consumer's health. *Biotechnology and Food Science*, 77, 3-10.



- Rocha, M. E. B., Freire, F. C. O., Maia, F. E. F., Guedes, F. I. F., & Rondina, D. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36, 159–165.
- Wang, H., Yang, Z., Ying, G., Yang, M., Nian, Y., Wei, F., & Kong, W. (2018). Antifungal evaluation of plant essential oils and their major components against toxigenic fungi. *Industrial Crops & Products*, 120, 180–186.
- Wigmann, E. F., Saccomori, F., Bernardi, A. O., Frisvad, J. C., & Copetti, M.V. (2015). Toxigenic penicillia spoiling frozen chicken nuggets. *Food Research International* 67,219–222.
- Wigmann E.F., Jahn, R. C., Sherer, C. D., Saccomori, F., Alcano-Gonzales, M. J., & Copetti, M. V. (2018). Detection and identification of *Penicillium* spp. in a frozen chicken nuggets production facility. *Food Microbiology*, 70, 42-48.