



REMOÇÃO DE AFLATOXINA B₁ POR NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS EM MEIO FERMENTADO DO CULTIVO DE *Saccharomyces cerevisiae*

F. K. Oliveira¹, A. F. Pivato², A. A. Comitre³, K. V. M. Sibaja⁴, L. O. Santos⁵, J. Garda-Bufferon⁶

1- Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos – CEP: 96203-900 – Rio Grande – RS – Brasil, Telefone: +55 (53) 3293-5374 – e-mail: (frankerstner@gmail.com)

2- Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos – CEP: 96203-900 – Rio Grande – RS – Brasil, Telefone: +55 (53) 3293-5374 – e-mail: (pivatoandressa@gmail.com)

3 - Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos – CEP: 96203-900 – Rio Grande – RS – Brasil, Telefone: +55 (53) 3293-5374 – e-mail: (allana.comitre@gmail.com)

4 - Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos – CEP: 96203-900 – Rio Grande – RS – Brasil, Telefone: +55 (53) 3293-5374 – e-mail: (karenmarimon@hotmail.com)

5 - Laboratório de Biotecnologia – Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos – CEP: 96203-900 – Rio Grande – RS – Brasil, Telefone: +55 (53) 3233-6544 – e-mail: (santoslucielen@gmail.com)

6 - Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos – CEP: 96203-900 – Rio Grande – RS – Brasil, Telefone: +55 (53) 3293-5374 – e-mail: (jaquelinebufferon@furg.br)

RESUMO – O objetivo desse estudo foi sintetizar nanopartículas de prata (AgNPs) utilizando o sobrenadante do cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 visando aplicação na remoção de aflatoxina B₁. Para isso, a levedura foi cultivada a 25 °C, pH 6, 100 rpm durante 12 h. Após, o meio de cultivo foi centrifugado e ao sobrenadante foi adicionado 1 mmol L⁻¹ de nitrato de prata. O sistema foi mantido em ambiente escuro durante 24 h, nas mesmas condições de temperatura e agitação do cultivo. Por fim, foi avaliada a capacidade de remoção de AFB₁ no meio de cultivo contendo as AgNP sintetizadas. Como resultado, foi observado que as AgNP reduziram em 66% a concentração de AFB₁ do meio de cultivo. Dessa forma, as AgNP sintetizadas por *S. cerevisiae* mostraram-se promissoras para aplicação na remoção de micotoxinas.

ABSTRACT – The aim of this study was to synthesize silver nanoparticles (AgNP) using the supernatant of *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 cultivation for application in the removal of aflatoxin B₁. For this, the yeast was grown at 25 °C, pH 6, 100 rpm for 12 h. Thereafter, the culture medium was centrifuged, and the supernatant was added 1 mmol L⁻¹ silver nitrate. The system was kept in a dark environment for 24 h, under the same temperature and agitation conditions as the culture. Finally, the ability to remove AFB₁ in the culture medium containing the AgNP synthesized by yeast was evaluated. As a result, it was observed that these AgNP reduced the concentration of AFB₁ in the culture medium by 66%. Thus, the AgNP synthesized by *S. cerevisiae* proved to be promising for application in the removal of mycotoxins.

PALAVRAS-CHAVE: biossíntese; levedura; micotoxina.

KEYWORDS: biosynthesis; yeast; mycotoxin.



1. INTRODUÇÃO

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por algumas espécies fúngicas durante o seu crescimento, quando submetidas a condições de estresse (Bennett & Klich, 2003). Os principais gêneros fúngicos associados a produção dessas toxinas e consequente contaminação de alimentos destinados ao consumo humano e animal são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Alshannaq & Yu, 2017). Esses fungos são capazes de produzir aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona e fumonisinas, classificadas como micotoxinas de grande ocorrência em alimentos (Kumar *et al.*, 2008). As aflatoxinas se destacam devido a sua toxicidade, sendo classificadas segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como carcinogênicas a humanos e animais (IARC, 2012). Deste grupo, a micotoxina mais relevante é a aflatoxina B₁ (AFB₁), devido sua elevada hepatotoxicidade e capacidade carcinogênica mesmo em baixas concentrações (Zlotowski *et al.*, 2004). Dessa forma, faz-se necessária a busca de novos agentes capazes de reduzir os níveis de contaminação sem apresentarem maiores efeitos adversos (Feltrin, 2013).

Em estudo, Magro e colaboradores (2016) avaliaram o comportamento de adsorção da micotoxina citrinina por nanocompostos magnéticos obtidos por síntese química, concluindo que adicionando 1 g L⁻¹ de nanopartículas magnéticas em meio contendo concentrações superiores a 50 mg L⁻¹ de micotoxina, a porcentagem de remoção atingiu 96%. Outro estudo conduzido por Kim *et al.* (2012), desenvolveu novo protocolo para remoção de AFB₁ e zearalenona (ZEN). Os autores compararam o protocolo de remoção de micotoxinas empregando colunas de imunoafinidade com a conjugação de nanopartículas magnéticas e anticorpos monoclonais. As nanopartículas magnéticas foram obtidas por meio de síntese química, e a taxa de remoção obtida para AFB₁ para a concentração de 5 ng mL⁻¹ foi de 90 - 92% e para ZEN utilizado as concentrações de 25 e 50 ng mL⁻¹ foram de 99 - 100% e 92 - 94%, respectivamente. Dessa forma, foi observado pelos autores que independente da micotoxina, a remoção empregando as nanopartículas foi maior quando comparado ao uso de colunas de imunoafinidade.

As nanopartículas são partículas que possuem pelo menos uma de suas dimensões na escala nanométrica e destacam-se em relação aquelas de escala macroscópica, apresentando propriedades particulares (Albernaz, 2014). As nanopartículas de prata (AgNP) destacam-se entre as nanopartículas devido a capacidade inibitória sobre diversos micro-organismos. No entanto, a fim de estabelecer os benefícios das AgNP observa-se a necessidade de ampliação dos estudos sobre tais nanocompostos possibilitando sua utilização em diferentes setores industriais (Albernaz, 2014, Fernandes *et al.*, 2016).

A biossíntese apresenta-se como alternativa sustentável a produção de AgNP por não utilizar produtos tóxicos em sua síntese. Esse procedimento baseia-se na biorredução do íon prata por organismos biológicos ou subprodutos, sendo os átomos neutros obtidos formadores de núcleo que se aglomeram, formando as AgNP (Albernaz, 2014). Com isso, a síntese de nanopartículas por micro-organismos e seus derivados tem sido amplamente estudada, sendo destaque a utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* nesse processo, por apresentar fácil adaptabilidade, possibilitando sua atuação em ampla faixa de pH e temperatura (Badhusha & Mohideen, 2016).

Assim, o objetivo desse estudo foi sintetizar nanopartículas de prata (AgNPs) utilizando o sobrenadante do cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 visando aplicação na remoção de aflatoxina B₁.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Padrão

O padrão de aflatoxina B₁ foi adquirido da empresa *Sigma Chemical Company* (E.U.A.). O preparo da solução estoque foi realizado pela solubilização do padrão da micotoxina em tolueno:acetoneitrila (98:2).

2.2 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado para a síntese de nanopartículas de prata foi a *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754. A manutenção da cepa foi realizada empregando ágar inclinado com meio *Yeast Malt* (YM) e mantido sob refrigeração (4 °C). A composição do meio de cultivo YM consistiu em (g L⁻¹): 10 glicose, 5 peptona, 3 extrato de levedura, 3 extrato de malte e 20 ágar.

O inóculo foi preparado a partir da transferência da cultura estoque para biorreator tipo erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio YM (sem ágar) previamente esterilizado (121 °C, 1,1 atm por 15 min). As condições de incubação utilizada foram 30 °C sob agitação rotatória de 150 rpm por 24 h (Santos, 2008).

2.3 Síntese das nanopartículas de prata utilizando meio fermentado obtido do cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

O cultivo submerso da *S. cerevisiae* para obtenção meio fermentado para a síntese de nanopartículas de prata foi feito em biorreatores tipo erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL de meio de cultivo YM sem ágar, adicionado de 5% (v/v) de inóculo. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 6 antes da inoculação, com adição de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹. O cultivo foi mantido a 25 °C e agitação rotatória de 100 rpm durante 12 h, conforme descrito por Badhusha e Mohideen (2016). Após, os meios de cultivo foram submetidos à centrifugação durante 5 min a 20126 g. Ao sobrenadante foi feita a adição de solução de nitrato de prata (AgNO₃) 1 mmol L⁻¹ e mantido nas mesmas condições de cultivo, sob ausência de luz, durante 24 h (Altinsoy *et al.*, 2019, Badhusha & Mohideen, 2016, Niknejad *et al.*, 2015).

Os experimentos foram realizados em triplicata, concomitantemente ao experimento controle, o qual foi mantido nos mesmos parâmetros de pH, temperatura e agitação, no entanto sem a adição de AgNO₃ ao sobrenadante do meio de cultivo. A determinação da produção das nanopartículas de prata foi realizada pela leitura das amostras em espectrofotômetro com detector UV a 420 nm. A concentração de AgNP foi estimada considerando que 0,001 na variação de absorvância nesse comprimento de onda corresponde a 1 unidade de nanopartícula de prata (UAgNP).

2.4 Aplicação das nanopartículas na remoção de micotoxinas

A capacidade de remoção da aflatoxina B₁ pelas nanopartículas de prata produzidas usando o sobrenadante do cultivo da levedura *S. cerevisiae* foi avaliada em frasco de vidro com volume útil de 10 mL. A solução padrão da aflatoxina B₁ foi adicionada ao frasco, a fim de obter a concentração correspondente a 1 µg L⁻¹ e o solvente evaporado em corrente de nitrogênio. Posteriormente, adicionou-se o sobrenadante do meio de cultivo contendo as AgNP produzidas, seguidas de agitação em vórtex (30 s) e banho ultrassônico (3 min) para a solubilização da micotoxina. O sistema foi mantido a 150 rpm, 35 °C durante 14 h, conforme condições descritas

por Sibaja *et al.* (2018) com modificações. Ao final do período de incubação, a concentração de micotoxina foi determinada. O ensaio controle consistiu na solubilização da micotoxina em meio de cultivo YM sem a presença das AgNP. Os experimentos foram realizados em quadruplicata, sendo o percentual de remoção de aflatoxina B₁ determinado pela Equação 1, onde AFB_{1final}: concentração inicial de AFB₁ (µg L⁻¹) e AFB_{1inicial}: concentração final de AFB₁ (µg L⁻¹).

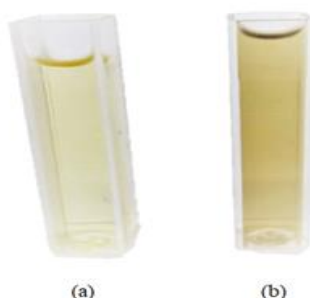
$$\%R = 100 - \left(\left(\frac{AFB_{1final}}{AFB_{1inicial}} \right) \times 100 \right) \quad (1)$$

Para a determinação da concentração de micotoxina remanescente, realizou-se a extração da mesma empregando método de partição líquido-líquido, conforme proposto por Bauer *et al.* (2016). A quantificação da aflatoxina B₁ foi feita em cromatógrafo líquido acoplado a detector de fluorescência (HPLC-FL) e processado pelo *software LC Solution*. A fase móvel foi composta por água:acetonitrila:metanol 60:15:25 (v/v), com modo de eluição isocrática. A análise foi realizada com coluna Kromasil C18 (5 µm, 15 cm x 4,6 mmol L⁻¹), com vazão de fase móvel de 1 mL min⁻¹ e temperatura do forno de 40 °C, empregando o comprimento de onda de 370 a 410 nm e volume de injeção da amostra de 20 µL (Bauer *et al.*, 2016). A identificação do composto foi baseada no tempo de retenção em comparação ao padrão e a concentração determinada relacionando a área do pico e a curva de calibração.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A síntese de AgNP no meio fermentado do cultivo da levedura *S. cerevisiae* foi de 268,4 UAgNP, quando submetidas a leitura a 420 nm. Segundo Badhusha & Mohideen (2016), a formação de AgNP é confirmada pela absorção entre 420 e 480 nm, variando conforme o tamanho da AgNP produzida. Ainda segundo os autores, outro indício da síntese de AgNP é a mudança na coloração do meio de cultivo, o que pode ser observado na Figura 1, que apresenta o ensaio controle (sem adição de AgNO₃) e com adição de AgNO₃. No ensaio controle (Figura 1a) o meio de cultivo apresentou coloração amarelo clara, diferente do que é observado no ensaio com adição de AgNO₃ (Figura 1 b), quando o meio de cultivo apresentou-se caramelo, confirmando o indício de formação de AgNP.

Figura 1 – Meio fermentado do cultivo da *S. cerevisiae* (a) sem adição de AgNO₃ e (b) com adição de AgNO₃



A formação das AgNP por biossíntese compreende basicamente 4 etapas, as quais incluem biorredução, nucleação, crescimento e formação das AgNP. Primeiramente ocorre a redução da Ag⁺ pelos bioprodutos presentes no meio, formando átomos neutros. Esses átomos em solução colidem uns com os outros, gerando o processo de nucleação pela formação de núcleos estáveis, que colidem com novos átomos reduzidos, formando



partículas maiores no processo de crescimento. Por fim, ocorre a estabilização pelo recobrimento da partícula formada com subprodutos inseridos no meio, ou então, pelo esgotamento dos íons metálicos em solução (Albernaz, 2014). Estima-se que as AgNP biossintetizadas neste estudo tenham sido reduzidas por proteínas e peptídeos presentes no meio de cultivo da levedura e que além disso, as proteínas podem formar o revestimento das nanopartículas estabilizando-as em relação ao meio conforme explicado por Sowbarnika *et al.* (2018). O autor ainda sugere que as proteínas são as biomoléculas que mais apresentam capacidade de ligar-se à Ag⁺, devido a presença de grupos livres de amida em sua composição.

Ao ser avaliada a capacidade de remoção de AFB₁ do meio YM, foi observada a redução da concentração da micotoxina em 66% ± 16,7, sendo que a variação no valor observado pode ser explicada devido à baixa concentração de trabalho do analito (µg L⁻¹). A redução na concentração da micotoxina pode ter ocorrido pela interação entre as AgNP e a AFB₁, tornando a micotoxina indisponível para extração e quantificação, sugerindo que esses nanocompostos sejam capazes de auxiliar na descontaminação de meios contaminados. Porém, para aplicação de tais compostos na indústria de alimentos, estudos quanto sua toxicidade são necessários.

O mecanismo de ação das AgNP para remoção da AFB₁ não é conhecido. No entanto, quando Magro *et al.* (2016) estudaram a remoção de citrulina, utilizando nanopartículas magnéticas, os autores sugeriram que tal micotoxina foi removida do meio por adsorção, devido apresentar elevada disponibilidade e reatividade em coordenar sítios de ferro III (metal utilizado na síntese das nanopartículas magnéticas). Neste contexto, acredita-se que o mesmo pode ter ocorrido neste estudo quando as AgNP foram colocadas em contato com a AFB₁, resultando na diminuição da concentração do contaminante.

Desse modo, aliado a estudos anteriores de Magro *et al.* (2016) e Kim *et al.* (2012), os quais mostraram a remoção de micotoxinas por nanopartículas magnéticas, obtida pela síntese química, o presente estudo é uma alternativa sustentável, de baixo custo e promissora para processos biotecnológicos que visam a remoção de micotoxinas.

4. CONCLUSÕES

Os compostos sintetizados pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 presentes no meio fermentado do cultivo empregando YM são capazes de formar AgNP. Esses nanomateriais apresentaram capacidade de redução dos níveis de aflatoxina B₁ em 66%, quando a micotoxina foi exposta ao sobrenadante do meio de cultivo contendo tais nanopartículas. Dessa forma, tendo em vista a necessidade de métodos alternativos e de baixo custo para realizar remoção de micotoxinas, o presente estudo comporta testes preliminares que podem futuramente auxiliar na descontaminação de alimentos com risco de aflatoxina B₁. Ressalta-se a necessidade de ampliar os estudos dessas nanopartículas em organismos vivos, visando analisar sua toxicidade.

5. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albernaz, V. L. (2014). *Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de Brosimum gaudichaudii, caracterização físico-química, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico* (Dissertação de mestrado). Universidade de Brasília, Brasília.



- Alshannaq, A., Yu, J. H. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(1), 632-652.
- Altinsoy, B. D., Karatoprak, G. Ş., & Ocoy, I. (2019). Extracellular directed ag NPs formation and investigation of their antimicrobial and cytotoxic properties. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(1), 9-16.
- Badhusa, M. S. M. B., & Mohideen, M. M. A. K. (2016). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Saccharomyces cerevisiae* with different pH and study of antimicrobial activity against bacterial pathogens. *Chemical Science Transactions*, 5(4), 906-911.
- Bauer, J. I., Gross, M., Gottschalk, C., & Usleber, E. (2016). Investigations on the occurrence of mycotoxins in beer. *Food Control*, 63(1), 135-139.
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497-516.
- Feltrin, A. C. (2013). *Aplicação de peroxidase para degradação de deoxinivalenol* (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- Fernandes, I. J., Aroche, A. F., Moraes, C. A. M., Peter, C. R., Hasenkamp, W. (2016). *Síntese de nanopartículas de prata para produção de tintas condutoras: uma revisão*. Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Instituto Tecnológico em Semicondutores. Natal.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (2012). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: chemical agents and related occupations. *IARC Scientific Publication*, Lyon, France, 100, 224–248.
- Kumar, V., Basu, M. S., & Rajendran, T. P. (2008). Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection*, 27(1), 891–905.
- Magro, M., Moritz, D. E., Bonaiuto, E., Baratella, D., Terzo, M., Jakubec, P., Malina, O., Cépe, K., Aragão, G. M. F., Zboril, R., Vianello, F. (2016). Citrinin mycotoxin recognition and removal by naked magnetic nanoparticles. *Food chemistry*, 203(1), 505-512.
- Niknejad, F., Nabili, M., Daie Ghazvini, R., & Moazeni, M. (2015). Green synthesis of silver nanoparticles: advantages of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. *Current medical mycology*, 1(3), 17-24.
- Santos, L. O. (2008). *Estudo da produção de glutatona a partir de Saccharomyces cerevisiae e avaliação da aplicação de campos magnéticos durante as fermentações* (Tese de doutorado). Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- Sibaja, K. V. M., Garcia, S. O., Feltrin, A. C. P., Remedi, R. D., Cerqueira, M. B. R., Badiale-Furlog, E., & Garda-Buffon, J. (2018). Aflatoxin biotransformation by commercial peroxidase and its application in contaminated food. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 94(4), 1187-1194.
- Sowbarnika, R., Anhuradha, S., Preetha, B. (2018). Enhanced antimicrobial effect of yeast mediated silver nanoparticles synthesized from baker's yeast. *International Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(1), 33-42.
- Zlotowski, P., Corrêa, A. M. R., Rozza, D. B., Driemeier, D., Mallmann, C. A., & Migliavacca, F. A. (2004). Surto de aflatoxicose em suínos no Estado do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 24(4), 207-210.