



ENNE GOMES ALVES

**ANTAGONISMO E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
LEVEDURAS EM *Aspergillus spp*: EFEITO SOBRE A
PRODUÇÃO DE OTA E COMPOSTOS VOLÁTEIS**

**LAVRAS-MG
2019**

ENNE GOMES ALVES

**ANTAGONISMO E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS EM
Aspergillus spp: EFEITO SOBRE A PRODUÇÃO DE OTA E COMPOSTOS VOLÁTEIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Cristina Ferreira Batista e Silva
Orientadora

**LAVRAS-MG
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Alves, Enne Gomes.

Antagonismo e potencial biotecnológico de leveduras em
Aspergillus spp : Efeito sobre a produção de OTA e compostos
voláteis / Enne Gomes Alves. - 2019.

60 p.

Orientador(a): Cristina Ferreira Batista e Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.
Bibliografia.

1. Biocontrole. 2. Antagonismo. 3. Fungos ocratoxigênicos. I.
Silva, Cristina Ferreira Batista e. II. Título.

ENNE GOMES ALVES

**ANTAGONISMO E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS EM
Aspergillus spp: EFEITO SOBRE A PRODUÇÃO DE OTA E COMPOSTOS VOLÁTEIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 06 de setembro de 2019.

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli UFLA

Dr. Luís Roberto Batista UFLA

Dr. José da Cruz Machado UFLA

Dra. Cintia Lacerda Ramos UFVJM

Profa. Dra. Cristina Ferreira Batista e Silva
Orientadora

**LAVRAS-MG
2019**

*Aos meus pais, irmão e família pelo apoio
que sempre me deram e por me ensinarem
que não existe recompensa sem luta.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Cristina Ferreira Silva e Batista por ter me orientado e possibilitado que eu desenvolvesse o tema de pesquisa da minha escolha. Por me apresentar o universo do controle biológico, pela dedicação, acompanhamento e disponibilidade durante toda a pesquisa e laboratório.

À, também doutoranda na época, Mariana Lino, pois foi essencial durante toda a pesquisa, pela paciência e vontade de me ensinar todas as técnicas e processos da nossa pesquisa, pelas conversas profissionais e pessoais e estar sempre disposta a me ajudar.

À todos os técnicos dos laboratórios por sempre estarem dispostos a emprestarem equipamentos e reagentes.

À todos os pós-doutorandos do Programa pela ajuda e explicação sempre que precisei.

Aos alunos do laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial pela ajuda, colaboração e companheirismo.

Às coordenadoras do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Rosane Freitas e Cristina Ferreira Silva e Batista, e a secretária Rosemeire Silva, pela ética e profissionalismo dedicado ao bom desenvolvimento do programa.

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola por fazerem parte da minha formação. E à todos do Programa por me aceitarem de tão longe e compreenderem minhas dificuldades de distância e saudades.

À Universidade Federal de Lavras pela excelente estrutura e investimentos prestados à melhoria da educação.

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

À cidade de Lavras, por ter me acolhido tão bem e me mostrado diferente e incrível cultura.

Aos meus amigos, pela vida social e companheirismo proporcionados. Aos colegas de curso, por todos os desabafos compartilhados e ajuda na formação acadêmica.

À toda a minha família, Gomes e Alves, que sabem que sou realmente grata por sempre me apoiarem e estarem presente em todas as etapas da minha vida. Principalmente, a minha mãe, Marinêz, ao meu pai, Donisete e ao meu irmão, Don, pela superação da distância, por ouvir e compreender minhas reclamações e por todo amor de sempre.

À todos que fizeram esse sonho possível, MUITO OBRIGADA!

RESUMO GERAL

O capítulo 1 descreve o antagonismo entre cinco cepas de leveduras (*Candida guilliermondii* CCMA153, *C. parapsilosis* CCMA158, *Saccharomyces cerevisiae* CCMA160, *S. cerevisiae* CCMA162 e *C. krusei* CCMA163) CCMA153 e isolados do fungo *Aspergillus ochraceus* cultivados *in vitro* e *in vivo* (café). Os isolados de *A. ochraceus* disponíveis na Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras foram testados quanto à sua capacidade de produção de OTA e caracterizados de acordo com seu padrão de bandas de DNA pelo método RAPD. Foi realizado o teste de antagonismo *in vitro* obtendo-se indicações que as duas cepas de *S. cerevisiae* foram mais eficientes no controle do crescimento e produção de OTA pelo fungo. Quando se avaliou o antagonismo em frutos de café cereja, os resultados não se mantiveram significativos. Os resultados obtidos neste capítulo mostram o baixo potencial das cepas de leveduras utilizadas no biocontrole de *A. ochraceus*.

O capítulo 2 descreve os compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos no cultivo independente e no co-cultivo de oito cepas de leveduras (*S. cerevisiae* CCMA 0159, 1299, 1302, 1306, 1313, 1315 e 1317 e *Rhodotorula mucilaginosa* CCMA 1305) e os fungos *A. carbonarius* CCDCA 10608 e *A. ochraceus* CCDCA 10612 cultivados em *vials*. As amostras foram analisadas em cromatógrafo GC-MS e os perfis identificados com base nas bibliotecas existentes. Foram detectados COVs de extrema relevância biotecnológica.

Palavras-chave: Biocontrole. Antagonismo. Compostos voláteis. Leveduras. Fungos Toxigênicos.

GENERAL ABSTRACT

Chapter 1 describes the antagonism between five strains of yeast (*Candida guilliermondii* CCMA153, *C. parapsilosis* CCMA158, *Saccharomyces cerevisiae* CCMA160, *S. cerevisiae* CCMA162 and *C. krusei* CCMA163) and isolates of *Aspergillus ochraceus* fungus in vitro and in vivo coffee). The isolates of *A. ochraceus* available from the Microorganism Culture Collection of the Department of Food Sciences of the Federal University of Lavras were tested for their OTA production capacity and characterized according to their DNA band pattern by the RAPD method. The in vitro antagonism test was performed, indicating that the two strains of *S. cerevisiae* were more efficient in controlling growth and OTA production by the fungus. When antagonism was evaluated in coffee cherry fruits, the results were not significant. The results obtained in this chapter show the low potential of yeast strains used in the biocontrol of *A. ochraceus*.

Chapter 2 describes the volatile organic compounds (VOCs) produced in the independent cultivation and co-cultivation of eight strains of yeast (*S. cerevisiae* CCMA 0159, 1299, 1302, 1306, 1313, 1315 and 1317 and *Rhodotorula mucilaginosa* CCMA 1305) and *A. carbonarius* CCDCA 10608 and *A. ochraceus* CCDCA 10612 fungi cultivated in vials. Samples were analyzed on GC-MS chromatograph and profiles identified based on existing libraries. VOCs of extreme biotechnological relevance were detected.

Keywords: Biocontrol. Antagonism. Volatile compounds. Yeast. Toxigenic fungi.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1: ANTAGONISMO DE LEVEDURAS EM <i>Aspergillus ochraceus</i> E SEU EFEITO NA PRODUÇÃO DE OTA.....	3
	RESUMO.....	4
1	INTRODUÇÃO.....	6
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	7
2.1	Micotoxinas em alimentos.....	7
2.2	Ocratoxina A.....	8
2.3	Incidência da ocratoxina A em café.....	11
2.4	Controle biológico dos fungos produtores de ocratoxina A.....	12
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1	Origem dos isolados e caracterização toxigênica.....	12
3.2	Caracterização molecular dos isolados.....	13
3.2.1	Extração de DNA.....	13
3.2.2	RAPD.....	14
3.3	Teste de antagonismo <i>in vitro</i>.....	15
3.3.1	Padronização dos inóculos.....	15
3.3.2	Ensaio.....	15
3.3.3	Avaliação da produção de OTA.....	16
3.4	Teste de antagonismo <i>in situ</i>.....	16
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4.1	Origem dos isolados e caracterização toxigênica.....	16
4.2	Caracterização molecular dos isolados.....	17
4.3	Teste de antagonismo <i>in vitro</i>.....	20
4.3.1	Ensaio.....	20
4.3.2	Avaliação da produção de OTA.....	22
4.4	Teste de antagonismo <i>in situ</i>.....	24
5	CONCLUSÃO.....	26
	REFERÊNCIAS.....	28

	CAPÍTULO 2: POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COVS) PRODUZIDOS POR LEVEDURAS E FUNGOS FILAMENTOSOS DURANTE INTERAÇÃO ANTAGONISTA	34
	RESUMO.....	35
1	INTRODUÇÃO.....	37
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
2.1	Microrganismos.....	38
2.2	Identificação de COVs por GC-MS.....	38
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS.....	47

CAPÍTULO 1

ANTAGONISMO DE LEVEDURAS EM *Aspergillus ochraceus* E SEU EFEITO NA PRODUÇÃO DE OTA

RESUMO

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos e podem ser encontrados em diferentes produtos agrícolas. Entre as micotoxinas conhecidas atualmente, destaca-se a ocratoxina A, produzida principalmente em climas tropicais pelas espécies *Aspergillus carbonarius* e *A. ochraceus*. O café é um produto suscetível à contaminação por estes fungos e sua presença pode afetar a qualidade do mesmo e acarretar em riscos à saúde de consumidores. Neste trabalho, objetivou-se avaliar o efeito antagonista no crescimento e produção de ocratoxina A *in vitro* e *in situ* (café) entre cepas de leveduras e isolados de *A. ochraceus*. Foram selecionados isolados do fungo filamentoso por meio de teste de toxicidade e caracterização molecular pelo método de RAPD. Para o teste de antagonismo *in vitro*, foram utilizadas 5 cepas de leveduras e as placas de Petri com meio MEA foram incubadas em B.O.D. nas temperaturas de 15, 20 e 25 °C. As medições dos diâmetros das colônias foram feitas depois de 7 dias para descrição da inibição do crescimento. O *screening* de produção de OTA foi feito, por meio de Cromatografia de Camada Delgada (CCD). Para o teste de antagonismo *in situ*, foram testadas duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e as amostras de café cereja foram incubadas a 25 °C. Após 7 dias, foi avaliado a quantidade de frutos contaminados pelo fungo. Foi possível concluir que, principalmente, as cepas das leveduras *S. cerevisiae* podem influenciar o crescimento fúngico, assim como a produção de ocratoxina A, e que esta se apresenta como possível candidata de controle biológico para minimizar as possibilidades de contaminação dos alimentos.

Palavras-chave: Controle biológico. Antagonismo. Ocratoxina A. Leveduras. *Aspergillus*.

ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites produced by filamentous fungi and can be found in different agricultural products. Among the currently known mycotoxins is ochratoxin A, produced mainly in tropical climates by the species *Aspergillus carbonarius* and *A. ochraceus*. Coffee is a product susceptible to contamination by these fungi and its presence can affect its quality and cause risks to the health of consumers. The objective of this work was to evaluate the antagonistic effect on growth and production of ochratoxin A in vitro and in situ (coffee) between yeast strains and *A. ochraceus* isolates. Filamentous fungus isolates were selected by toxicity testing and molecular characterization by the RAPD method. For the in vitro antagonism test, 5 strains of yeast were used and Petri dishes with MEA medium were incubated in B.O.D. at temperatures of 15, 20 and 25 °C. Measurements of colony diameters were made after 7 days to describe growth inhibition. OTA production was screened by thin layer chromatography (CCD). For the in situ antagonism test, two strains of *Saccharomyces cerevisiae* were tested and the cherry coffee samples were incubated at 25 °C. After 7 days, the amount of fruits contaminated by the fungus was evaluated. It was concluded that, mainly, *S. cerevisiae* yeast strains can influence fungal growth, as well as the production of ochratoxin A, and that it presents itself as a possible candidate for biological control to minimize the possibility of food contamination.

Keywords: Biological control. Antagonism. Ochratoxin A. Yeast. *Aspergillus*.

1 INTRODUÇÃO

As micotoxinas são produtos do metabolismo secundário de algumas espécies de fungos filamentosos e têm atraído as atenções mundiais pelos seus efeitos tóxicos em humanos e animais. Sua diversidade estrutural acarreta em um complexo diagnóstico dos seus impactos na saúde pública, além do eminente risco econômico de alimentos contaminados para os produtores em geral. Estas podem ser encontradas em vários alimentos como: cereais, milho, frutas secas, frutas, sementes oleaginosas e especiarias, mas também em produtos de origem animal como o leite, ovos e carne, em razão da sua capacidade de permanecer ao longo da cadeia alimentar.

As ocratoxinas consistem em um grupo de micotoxinas relacionadas estruturalmente, dos quais a ocratoxina A (OTA) é a mais potente e mais relevante no aspecto nocivo à saúde, isso se deve as suas propriedades carcinogênicas, nefrotóxicas, teratogênicas, imunotóxicas e neurotóxicas. A OTA é uma micotoxina produzida por diversas espécies de fungos filamentosos, especialmente dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* que são muito difundidos em diferentes produtos agrícolas, e têm uma importante peculiaridade que é resistência a altas temperaturas durante seu processamento.

Apesar dos aprimoramentos nas técnicas de produção e de armazenagem, ainda não é possível impedir completamente o desenvolvimento fúngico nos alimentos, conseqüentemente, a OTA não pode ser totalmente eliminada. Portanto, devem ser fixados limites tão baixos quanto razoáveis, determinados por órgãos responsáveis, para que os alimentos possam ser consumidos com baixo risco à saúde. O crescimento fúngico e subsequente produção de OTA estão ligados a diversos fatores, os quais incluem a temperatura, umidade durante a colheita, a secagem, atividade de água do alimento e o armazenamento dos produtos.

O crescente consumo e interesse do mercado mundial na produção de café, provocaram a adoção de novas tecnologias de produção e preparo de cafés de elevada qualidade. No Brasil, a Resolução da ANVISA n. 7, de 18 de fevereiro de 2011, estabelece os limites máximos tolerados para as micotoxinas em alimentos, na qual o limite máximo aceitável de OTA em café é de 10 µg/kg. Relatos indicam que a colonização por fungos pode ocorrer antes ou após a colheita do café, dependendo das condições ambientais ou de armazenamento. A contaminação do café por OTA pode afetar, além da quantidade da produção, também sua qualidade, prejudicando o sabor e aroma exigidos pelos consumidores.

Existem alguns métodos físicos e químicos de descontaminação do café, mas apesar dos resultados promissores dessas novas tecnologias no tratamento do café, existe uma grande preocupação na definição de condições ideais de tratamento e na toxicidade dos produtos de degradação formados e conseqüente implicações para a saúde humana e animal. Já que por estes métodos, o produto final pode perder nutrientes ou mesmo gerar subprodutos indesejáveis e de risco desconhecido.

Com o intuito de contornar os problemas que os métodos físicos e químicos podem acarretar, o método biológico de descontaminação se mostra promissor, principalmente por garantir as propriedades nutritivas do produto. Estudos sobre o controle da produção de micotoxinas tem demonstrado que leveduras são eficientes no controle do crescimento de fungos toxigênicos e na inibição da produção de toxinas.

Os estudos sobre o antagonismo para o controle da produção de micotoxinas por espécies ocratoxigênicas podem ajudar a produção de novos biocontroles para a indústria cafeeira. Dessa forma, neste trabalho, objetivou-se estudar o crescimento e produção de OTA pela espécie *A. ochraceus* em ensaios *in vitro* e *in vivo* (café).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Micotoxinas em alimentos

Algumas espécies de fungos produzem substâncias químicas nos alimentos que promovem efeitos tóxicos quando ingeridas por animais e seres humanos (TSITSIGIANNIS et al., 2012). Essas substâncias são denominadas micotoxinas, que são metabólitos secundários produzidos durante a fase estacionária do crescimento de fungos filamentosos. Estes metabólitos são sintetizados a partir de um metabólito primário, geralmente quando grandes quantidades de precursores de metabólitos primários (como aminoácidos, acetato, piruvato, entre outros) se acumulam na célula (BRAKHAGE, 2013).

Para uma substância ser caracterizada como micotoxina ela deve ser causadora de doença em seres humanos ou animais, ocorrer na natureza, ser produzida por fungos e ser aguda ou cronicamente tóxica. Algumas toxinas possuem a dose letal menor que 5 mg/kg de peso corpóreo, causando grande variedade de desordens dependendo da natureza da toxina, da dose ingerida, do fungo que a produziu, da idade e do estado nutricional do acometido (ONO et al., 2004). O grande problema clínico das micotoxinas é que elas promovem poucos sinais de intoxicação alimentar, dificultando o seu diagnóstico (PITT et al., 2000).

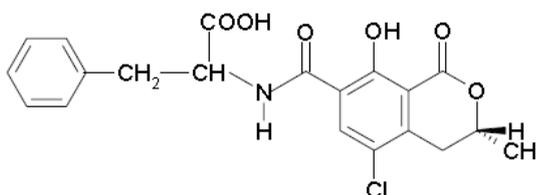
As aflatoxinas são consideradas importantes micotoxinas produzidas principalmente pelas espécies *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* que contaminam cevada, milho, produtos a base de soja, amendoim, entre outros. As fumonisinas são micotoxinas possivelmente carcinogênicas produzidas por espécies do gênero *Fusarium*. Por este gênero também são produzidas as zearalenona, principalmente pela espécie *F. graminearum*. Espécies do gênero *Penicillium* podem produzir as micotoxinas patulina, citrinina e ocratoxina. As ocratoxinas são produzidas por espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e têm sido encontradas em milho, feijão, soja, cevada, frutas, castanhas e grãos de café (ONO et al., 2004; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

2.2 Ocratoxina A

As ocratoxinas consistem em um grupo de no mínimo sete metabólitos secundários relacionados estruturalmente, dos quais a ocratoxina A (OTA) é a mais tóxica (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009). A OTA é uma nefrotoxina, hepatotóxica, teratogênica e carcinogênica para animais e pode ocorrer em vários alimentos, como café, cereais, cevada, e vinho (CUBAIU et al., 2012). Em climas tropicais, esta ocratoxina é produzida geralmente pelos fungos das espécies *A. ochraceus* e *A. carbonarius* (ALEXANDER et al., 2006).

A fórmula química da OTA é $C_{20}H_{18}O_6NCl$ e seu peso molecular 403,82 g/mol. É formada por um anel de 3,4-dihidro metil isocumarina unido, por meio de um grupo carboxil e através de uma ligação do tipo amida, a uma molécula de fenilalanina, como representado na Figura 1 (ALEXANDER et al., 2006). É pouco solúvel em água e solúvel em solventes orgânicos polares, possuindo características de ácido fraco e é capaz de emitir fluorescência ao ser excitada com luz ultravioleta (ANLI; ALKIS, 2010).

Figura 1 – Estrutura química da molécula de ocratoxina A.



Fonte: Alexander et al., 2006.

Na biossíntese da OTA, a porção fenilalanina se origina a partir do ácido shikímico e a porção dihidroisocumarina via policetídeo. O'Callaghan, Caddick e Dobson (2003)

demonstraram que houve expressão do gene que codifica uma policetídeo sintase (PKS), responsável pela síntese do policetídeo em *A. ochraceus*, apenas quando foi cultivado em condições ideais para a produção de metabólitos secundários e durante as fases iniciais de produção da OTA.

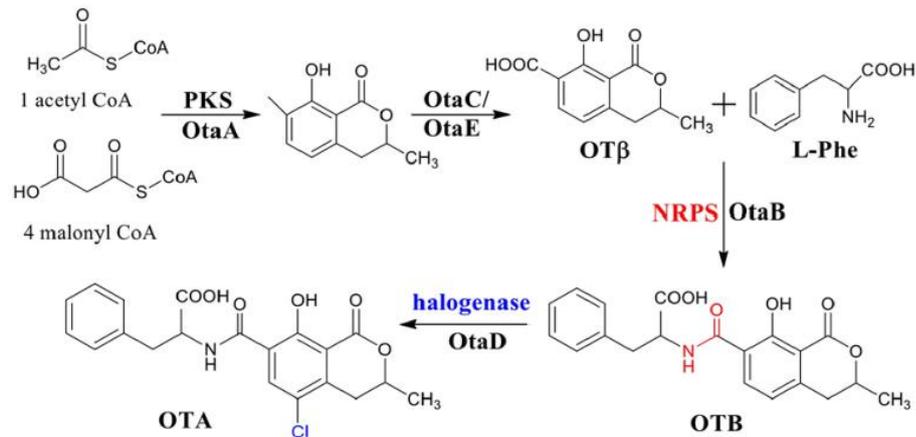
A produção de metabólitos secundários é um processo complexo que requer várias etapas enzimáticas. Os genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo secundário não são expressos constitutivamente e geralmente encontram-se organizados um ao lado do outro, ou seja, em *clusters*. Este agrupamento gênico comumente contém genes que codificam hidrolases, oxidases, metilases, proteínas reguladoras e proteínas de transporte que estão adjacentes a genes que codificam PKS e peptídeos não-ribossomais sintases (NRPS). Sendo que, os genes PKS e NRPS são característicos de metabolismo secundário (BRAKHAGE; SCHROECKH, 2011).

A primeira hipótese para a biossíntese de OTA foi apresentada por Huff e Hamilton (1979). A OTA é derivada da ocratoxina B (molécula sem cloro) e da ocratoxina C (molécula com éster etílico). Para a biossíntese da OTA haveria: a formação de um policetídeo não ramificado a partir de um acetil e um malonil-CoA; sua então ciclização e aromatização para formar uma isocumarina; a metilação, oxidação e cloração de um carboxil; e, a ligação da molécula formada com um éster de fenilalanina que é formado via ácido chiquímico.

Desde a primeira hipótese publicada para a biossíntese de OTA, vários estudos foram realizados na tentativa de compreender a formação desta molécula e os requisitos para sua construção (HARRIS; MANTLE, 2001; HUFFMAN et al., 2010; GALLO et al., 2012; WANG et al., 2016; GALLO et al., 2017). Em 2010, Huffman, Gerber e Du, demonstraram que o requisito genético mínimo necessário para a biossíntese de OTA é a presença de genes que codificam uma enzima policetídeo sintase para a síntese do policetídeo dihidroisocumarina; uma metiltransferase e uma enzima oxidativa para a formação do grupo carboxil; um peptídeo não ribossomal para catalisar a ligação da fenilalanina com o policetídeo; e uma halogenase para incorporar o átomo de cloro.

A hipótese mais atual para a biossíntese de OTA é apresentada por Wang et al. (2018) (FIGURA 2), onde é sugerido que a síntese da molécula se inicia com a PKS OtaA ligando acetil-CoA e malonil-CoA para sintetizar a 7-metilmelaína, que é então oxidada em OT por OtaC. OT e L-fenilalanina são combinados pelo NRPS (OtaB) pela ligação amida, formando o OTB. OTB é clorado pela halogenase OtaD gerando o produto final, OTA.

Figura 2 – Mecanismo biossintético de formação da ocratoxina A.



Fonte: Wang et al. (2018).

O'Callaghan, Caddick e Dobson (2003), foram os primeiros a identificar uma porção de um gene codificador de uma PKS envolvida na biossíntese de OTA em *A. ochraceus*. Para chegar a esta descrição, os autores realizaram experimentos de hibridação subtrativa (SSH), detectando uma sequência de 1,4 Kb que incorporava um domínio AT de uma PKS e era expressa em condições permissivas para a produção de OTA, mas não em condições restritivas. Após o nocaute deste gene, a linhagem mutante de *A. ochraceus* se tornou incapaz de produzir a toxina. Em 2006, os mesmos autores reportaram que a expressão do gene PKS em *A. ochraceus* está relacionada com a expressão de dois genes monooxigenases p450 (p450-b03 e p450-h11) (O'CALLAGHAN; STAPLETON e DOBSON, 2006). Em 2015, Wang e seus colaboradores relataram outros dois genes PKS para *A. ochraceus*, os quais foram denominados de AoOTApks-1 e AoOTApks-2 sendo este apenas parcialmente ligado a biossíntese de OTA.

A OTA foi isolada pela primeira vez a partir de uma cultura de *A. ochraceus* em 1965, na África do Sul (MERWE et al., 1965). Desde então, apesar dos esforços para controlar a contaminação fúngica, evitá-la é quase impossível, pois os principais fungos toxigênicos estão presentes na natureza e ocorrem regularmente em produtos agrícolas susceptíveis, tais como grãos, cereais e frutas (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009; MURPHY et al., 2006).

A melhor estratégia de prevenção da contaminação dos alimentos pela OTA é um manejo adequado pré-colheita com aplicação de boas práticas agrícolas. No entanto, se a contaminação ocorrer ou persistir, é necessária a aplicação de estratégias de remediação. Na fase pós-colheita, o armazenamento e processamento são as principais áreas para a aplicação

de métodos de descontaminação, que pode consistir em métodos físicos, químicos ou biológicos (AMÉZQUETA et al., 2009).

2.3 Incidência da ocratoxina A em café

O consumo de café no mundo vem aumentando a cada ano, sendo que de 2014 a 2018 o aumento no consumo mundial foi de 2,1% (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION, 2019). No Brasil, o consumo de café é de 21 milhões de sacas e o consumo per capita é 6,02 kg/ano de café cru e 4,82 kg/ano de café torrado e moído, o que equivale a aproximadamente 80 litros/habitante/ano e que mantém o Brasil como o segundo maior consumidor de café do mundo. Já em relação a sua produção, o Brasil é o maior produtor de café do mundo e sua exportação vem batendo recordes a cada ano – na safra de 2017/18 exportou 21.997 centenas de toneladas, correspondendo a um aumento de 2,7% em relação à anos anteriores (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2019). Assim, esta cultura é essencial para a economia do país e necessita de grande atenção para que sua qualidade sanitária continue elevada.

No Brasil, a Resolução – RDC N° 7 de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, define que o LMT de OTA para café torrado (moído ou em grão) e solúvel é de 10 µg/kg. A Resolução destaca ainda que melhores práticas e tecnologias na produção, manipulação, armazenamento, processamento e embalagem devem ser aplicadas com o intuito dos níveis de micotoxinas serem os mais baixos possíveis (DIÁRIO OFICIAL DA UNIAO, 2011).

O processo de produção agrícola do café está relacionado com os níveis de contaminação fúngica e consequentes níveis de OTA encontrados. Várias pesquisas têm sido realizadas para analisar a presença de *A. ochraceus* e OTA em café (BATISTA et al., 2003; TANIWAKI et al., 2003; FRISVAD et al., 2004; PERRONE et al., 2007; BATISTA et al., 2009; GIL-SERNA et al., 2011). Rezende et al. (2013), encontraram *A. ochraceus* em 89,55% dos grãos de café que estudaram, provenientes de culturas orgânicas e convencionais do Sul de Minas Gerais.

A presença de fungos nos grãos de café não representa apenas um risco de segurança para o produto final devido à produção das micotoxinas, já que podem ser prejudiciais para consumidores, mas também afeta sua qualidade em termos de sabor e aroma da bebida (VILELA et al., 2010). O aumento da produtividade e consumo de café e o risco à saúde humana na ingestão de produtos contaminados com OTA, aponta que estudos para o

desenvolvimento de potenciais formas de controle eficiente da contaminação fúngica devem ser desenvolvidos.

2.4 Controle biológico dos fungos produtores de ocratoxina A

As principais estratégias adotadas para prevenir o problema com a OTA tem sido a utilização de plantas resistentes, colheita e estocagem apropriada, controle de insetos e roedores, controle de temperatura, umidade e tempo de estocagem (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009). O conhecimento da faixa de temperatura e da atividade de água ideal para a proliferação do fungo e formação da toxina é útil para aperfeiçoar as condições de colheita e estocagem do alimento (MAGNOLI; ASTORECA; CHIACCHIERA, 2007).

Controle biológico pode ser definido como o uso de organismos para suprimir as atividades de outro organismo patogênico, ou seja, que provoca doença. A interação destes organismos se dá de maneira direta ou indireta através do antagonismo (competição, parasitismo ou predação), onde a relação é negativa para pelo menos um dos organismos (PAL; GARDENER, 2006). Os métodos biológicos de descontaminação são considerados os mais apropriados por garantirem as propriedades nutritivas dos alimentos, pois geralmente são mediados por reações enzimáticas (AMÉZQUETA et al., 2009). Anli e Alkis (2010) indicam ainda que o método ideal para a desintoxicação deve ser de fácil manuseio, economicamente viável e que não produza compostos tóxicos ou altere a qualidade do alimento.

Nos últimos anos, o controle biológico tem ganhado bastante atenção por ser um controle para os fungos toxigênicos eficiente e economicamente viável e, principalmente, por diminuir o uso de pesticidas químicos (ZHU et al., 2015). Vários estudos já mostraram a eficácia do uso de leveduras para o biocontrole de fungos ocratoxigênicos e da produção de OTA (PÉTERI et al., 2007; PATHARAJAN et al., 2011; VIRGILI et al., 2012; FIORI et al., 2014; PETRUZZI et al., 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem dos isolados e caracterização toxigênica

Dezessete isolados de *A. ochraceus* pertencentes a Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (CCDCA1023, CCDCA1029, CCDCA1030, CCDCA1034, CCDCA1037, CCDCA1040, CCDCA1099, CCDCA10404, CCDCA10490, CCDCA10493, CCDCA10506,

CCDCA10521, CCDCA10612, CCDCA10716, CCDCA10717, CCDCA10718 e CCDCA10719), foram testados quanto à sua capacidade de produção de OTA. Os isolados estocados em discos de papel filtro a -15 °C da Coleção de Cultura foram reativados em meio de cultivo YES (20 g/L de extrato de levedura, 150 g/L de sacarose e 20 g/L de ágar) e incubados a 25 °C por 10 dias.

Para o teste de confirmação da produção de OTA foi realizada a Cromatografia de Camada Delgada (CCD) através do método *Plug Agar* (FILTENBORG; FRISVAD; SVENDSEN, 1983). Um corte circular de aproximadamente 25 mm do micélio do fungo com ágar foi colocado sobre uma placa de cromatografia em camada fina (sílica-gel Merck 60, 20 x 20) previamente ativada contendo 10 µL de Ocratoxina A padrão (Sigma- Aldrich). O micélio foi retirado da placa e foi realizada a diluição em uma cuba de vidro, contendo a fase móvel TEF (tolueno, acetato de etila e ácido fórmico 90% - 60:30:10). Após a diluição, as placas foram secas pelo fluxo de ar em capela de exaustão. A produção de OTA foi confirmada em luz ultravioleta com λ 366nm, em cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Foram considerados como produtores de OTA, os isolados que apresentarem um RF (fator de retenção) e um ponto (spot) de fluorescência semelhante ao do padrão da Ocratoxina A.

3.2 Caracterização molecular dos isolados

3.2.1 Extração de DNA

Os isolados que apresentaram OTA positiva foram caracterizados empregando-se o método RAPD, com o objetivo de selecionar alguns representantes para os testes seguintes. Para a extração de DNA, os fungos filamentosos foram cultivados em meio líquido MEA (20 g/L de extrato de malte, 1 g/L de peptona bacteriológica, 10 g/L de glicose e 20 g/L de ágar) sob agitação de 120 rpm e 25 °C, por 10 dias. O micélio resultante foi seco com papel absorvente estéril e transferido para um cadinho de porcelana, onde foi triturado utilizando nitrogênio líquido. Um grama do micélio seco foi transferido para *ependorf* contendo 3 mL de tampão de extração (200 mM de Tris pH 8, 250 mM de NaCl, 50 mM de EDTA pH 8, SDS 2%, 100 mg/mL de protease).

A mistura do tampão de extração e micélio foi agitada com movimentos suaves e incubada a 65 °C por 15 minutos. Após incubação, adicionou-se 30 µL de uma solução 1:1 fenol-clorofórmio e fazendo movimentos suaves por 15 minutos, tomando-se o cuidado de manter a mistura sempre gelada. O material foi centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos, a fase aquosa foi recolhida e transferida para novos *ependorfs*. A operação de adição de fenol :

clorofórmio, agitação suave por 15 minutos, seguida de centrifugação (10.000 rpm por 10 minutos) e recolhimento da fase aquosa foi repetida por mais duas vezes. Na última operação utilizou-se apenas ½ volume de clorofórmio no lugar da solução fenol-clorofórmio.

Após desproteinização, foi adicionado 2 volumes de etanol absoluto e agitou-se lentamente os tubos por 15 minutos para precipitar o DNA. A mistura foi centrifugada a 1200 rpm por 15 minutos, e depois foi despregado o sobrenadante para posterior secagem do DNA em estufa a 35 °C por 30 minutos. O pellet foi ressuspensão em 100 µL de Tris EDTA (1 mL de Tris, 0,2 mL de EDTA e 98,8 mL de água destilada).

3.2.2 RAPD

Para obtenção do polimorfismo por RAPD foram utilizados os *primers* A13 (5' CAGCACCCAC 3'), A10 (5' GTGATCGCAT 3'), E19 (5' ACGGCGTATG 3'), M18 (5' CACCATCCGT 3') e R02 (5' GTCCTCGTGT 3'). A solução de PCR consistiu em: 13 µL de água estéril, 5 µL de tampão para a reação (5x *Green GoTaq® flexi buffer*, Promega), 1 µL de mix dNTP (Amersham Pharmacia Biotech), 2 µL de MgCl₂ (25 mM, Fermentas), 2 µL de *primer* (10 mM), 1 µL de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 1 µL de amostra de DNA. A reação foi realizada em termociclador, nas seguintes condições: 4 minutos a 94 °C, 45 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 45 segundos a 36 °C e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C e extensão final de 4 minutos a 72 °C. Um controle branco com todos os reagentes de PCR exceto a amostra de DNA foi incluído em cada reação.

Para a análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA foi utilizado gel de agarose 1,5% (preparado com TAE 1x) em cuba horizontal 12x25 cm, com a eletroforese ajustada para 100 V por 60 minutos. O gel foi visualizado em um transiluminador UV e fotodocumentado.

Cada banda de RAPD gerada foi considerada como uma característica independente e a presença (1) ou ausência (0) de bandas foi registrada em uma planilha. O cálculo da similaridade foi realizado com base no coeficiente de correlação de *Pearson* e os dendogramas foram construídos com o *software* Statistica 7.0 (ABOIM et al., 2008). A partir do resultado do RAPD, foram selecionados os isolados do fungo *A. ochraceus* que apresentaram perfis distintos para uso nos testes posteriores.

3.3 Teste de antagonismo *in vitro*

3.3.1 Padronização dos inóculos

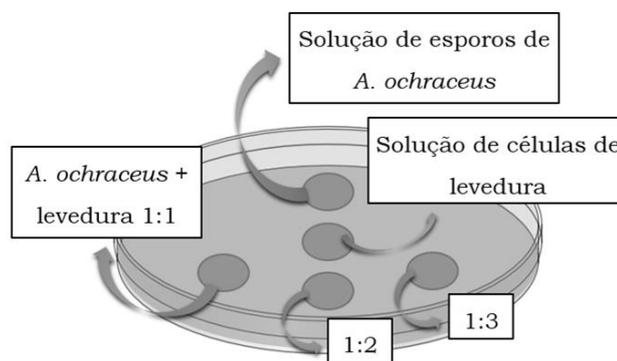
Foram utilizados para o teste de antagonismo, 5 cepas de leveduras pertencentes à Coleção de Cultura da Microbiologia Agrícola (DBI/UFLA) (*C. guilliermondii* CCMA153, *C. parapsilosis* CCMA158, *S. cerevisiae* CCMA160, *S. cerevisiae* CCMA162 e *C. krusei* CCMA163) e os isolados do fungo *A. ochraceus* selecionados pelo método RAPD.

Os inóculos foram padronizados por contagem direta em microscópio com câmara de Neubauer. Foram preparadas suspensão de células de leveduras em solução salina estéril na concentração de 10^7 células/mL e suspensão de esporos fúngicos de *A. ochraceus* em solução *tween* 80% estéril na concentração de 10^5 esporos/mL, de acordo com Souza et al. (2017).

3.3.2 Ensaio

Para o teste de antagonismo foi utilizada placa de *Petri* de 90 mm de diâmetro contendo meio MEA com 5 poços de 10 mm de diâmetro. Os poços foram feitos no meio sólido com o auxílio de um dos lados de uma ponteira e preenchidos com 100 μ L das seguintes soluções: suspensão de esporos de *A. ochraceus*, suspensão de levedura, suspensão de esporos + levedura na concentração em três diferentes concentrações (1:1, 1:2 e 1:3), , como ilustrado na Figura 3. O teste foi realizado em três diferentes temperaturas (15, 20 e 25 °C) e as placas foram incubadas em B.O.D. por 7 dias. O teste foi realizado em duplicata e os poços com apenas esporos ou apenas leveduras representam os controles.

Figura 3 – Ilustração da montagem do teste de antagonismo *in vitro*.



Fonte: Do autor (2019).

Foi medido o diâmetro da colônia de *A. ochraceus* formada e os valores são apresentados como média das duplicatas realizadas. Para avaliar a diferença significativa entre as diferentes concentrações do teste foi utilizado a estatística ANOVA e Teste de Tukey

($p < 0,05$). E para a diferença entre os ensaios e o controle, foi utilizado o Teste de Qui-Quadrado ($p < 0,05$).

3.3.3 Avaliação da produção de OTA

Para a avaliação da inibição da produção de OTA por *A. ochraceus* na presença de leveduras, o teste de antagonismo foi feito em meio YES com o controle de cada isolado e a concentração 1:1 de suspensão de esporos mais células de levedura. As placas foram incubadas a 15, 20 e 25 °C por 10 dias. Após este período, foi realizada a Cromatografia de Camada Delgada como descrito anteriormente.

3.4 Teste de antagonismo *in situ*

Foram coletados frutos de café cereja e separados em amostras de 30 frutos. Após serem lavados, os frutos foram desinfestados por imersão em álcool 70% e hipoclorito de sódio 2%, imersos em água destilada estéril para a remoção do excesso de descontaminante e secos com gaze estéril. Cada amostra de café foi transferida para um frasco *Erlenmeyer*, onde foi inoculado com 450 µL de suspensão de esporos de *A. ochraceus* (CCDCA1023, CCDCA1037, CCDCA10506 e CCDCA10718) na concentração de 10^5 esporos/mL e 450 µL de suspensão de células de levedura (*S. cerevisiae* CCMA160, *S. cerevisiae* CCMA162) na concentração de 10^7 células/mL. Os frutos com as suspensões foram homogeneizados e distribuídos 5 frutos em cada placa de *Petri* contendo ágar (para manter os frutos separados), totalizando 6 placas com o mesmo tratamento. O controle do teste consistiu na amostra de café inoculada com 900 µL de solução de esporos fúngicos. As placas foram incubadas a 25 °C por 7 dias. Após este período, foi avaliada a quantidade de frutos de café contaminados por *A. ochraceus*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Origem dos isolados e caracterização toxigênica

Dos 17 isolados de *A. ochraceus* submetidos ao teste de produção de toxina por CCD, 11 foram caracterizados como produtores de ocratoxina A (CCDCA1023, CCDCA1034, CCDCA1037, CCDCA1099, CCDCA10404, CCDCA10490, CCDCA10506, CCDCA10612, CCDCA10716, CCDCA10717 e CCDCA10718). Os isolados produtores de OTA, são provenientes de solo do cerrado (CCDCA1023), solo não discriminado (CCDCA10404), solo

de vinhedo (CCDCA10490 e CCDCA10506) e café (CCDCA1034, CCDCA1037, CCDCA1099, CCDCA10612, CCDCA10716, CCDCA10717 e CCDCA10718).

4.2 Caracterização molecular dos isolados

Os 11 isolados de *A. ochraceus* produtores de OTA foram caracterizados através do método RAPD. O polimorfismo por RAPD foi obtido utilizando-se os *primers* A13, A10, E19, M18 e R02 como mostrado na Figura 4.

Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose mostrando os padrões de RAPD. (Continua)

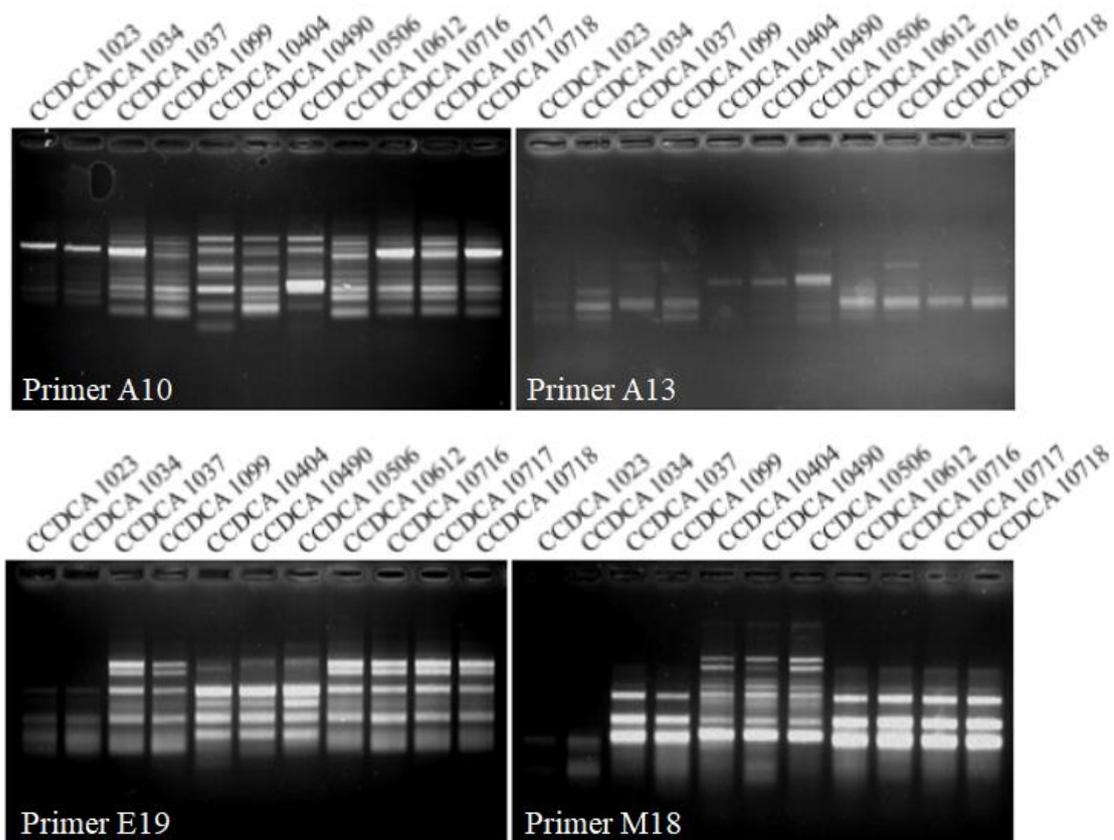
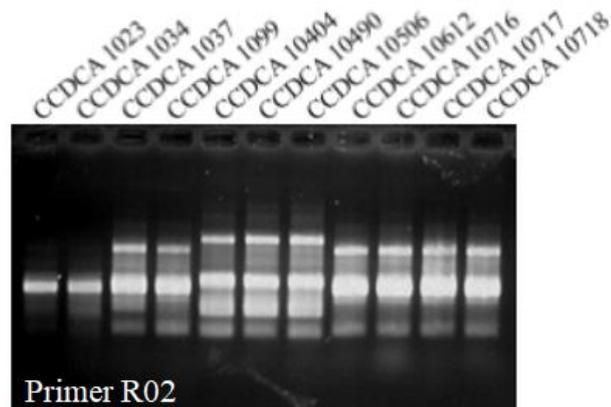


Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose mostrando os padrões de RAPD. (Conclusão)



Legenda: O RAPD foi realizado com 11 isolados de *A. ochraceus* (CCDCA1023, CCDCA1034, CCDCA1037, CCDCA1099, CCDCA10404, CCDCA10490, CCDCA10506, CCDCA10612, CCDCA10716, CCDCA10717 e CCDCA10718) (CCDCA1023, CCDCA1037, CCDCA10506 e CCDCA10718) utilizando os *primers* A10, A13, E19, M18 e R02.

Fonte: Do autor (2019).

Os cinco *primers* decâmeros geraram cerca de 46 marcadores RAPD, uma média de 9,2 marcadores por *primer*. Dos 46 marcadores, 5 foram polimórficos, obtendo-se uma média de 1 banda polimórfica por *primer*. O baixo número de marcadores polimórficos evidencia a baixa variabilidade genética dos isolados analisados. Tal resultado já era esperado, tendo em vista de que se trata da mesma espécie de fungo filamentososo e que vários isolados são provenientes do mesmo habitat (solo não discriminado, solo do cerrado, solo de vinhedo e café), estreitando a base genética dos indivíduos analisados.

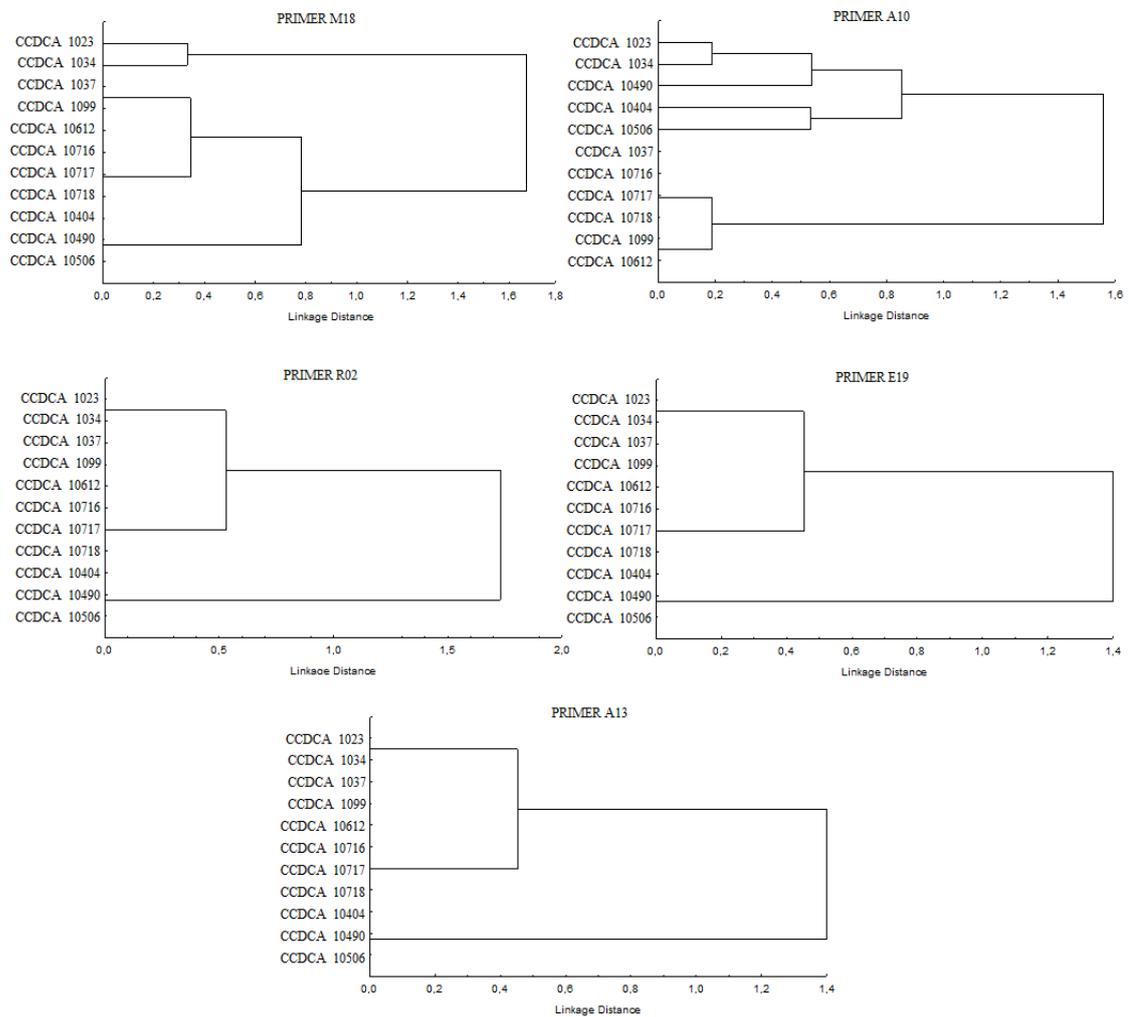
Os dendogramas construídos com o software Statistica 7.0, considerando cada banda de RAPD gerada como uma característica independente, são apresentados na Figura 5. A partir dos resultados obtidos, foram selecionados 4 isolados (CCDCA1023, CCDCA1037, CCDCA10506 e CCDCA10718), para serem testados frente a ação antagônica das leveduras, por apresentarem os padrões de bandas de DNA mais distintos. De acordo com os padrões de sequenciamento obtidos com os *primers* utilizados, de uma maneira geral, o isolado CCDCA 1034 foi considerado muito similar ao isolado 1023; assim como, os isolados CCDCA 1099, CCDCA 10404, CCDCA 10490 foram similares ao isolado CCDCA 1037; CCDCA 10612 similares ao CCDCA 10506; e, CCDCA 10716 e CCDCA 10717 similares ao CCDCA 10718.

A partir de marcadores moleculares RAPD, constatou-se que, dentro da mesma espécie, há variabilidade genética entre os isolados de *A. ochraceus*. Indicando que seu

comportamento fenotípico, como a produção de metabólitos secundários, pode ser diferente em cada isolado e ressaltando a importância das técnicas moleculares para auxiliar os trabalhos de seleção em programas de controle biológico.

Ao se comparar somente o padrão de bandas de DNA dos 4 isolados de *A. ochraceus* selecionados, verifica-se a ocorrência da seguinte quantidade de bandas polimórficas: CCDCA 1023 uma, CCDCA 1037 três, CCDCA 10506 onze e CCDCA 10718 seis.

Figura 5 – Dendograma de agrupamento com base no resultado do teste molecular RAPD.



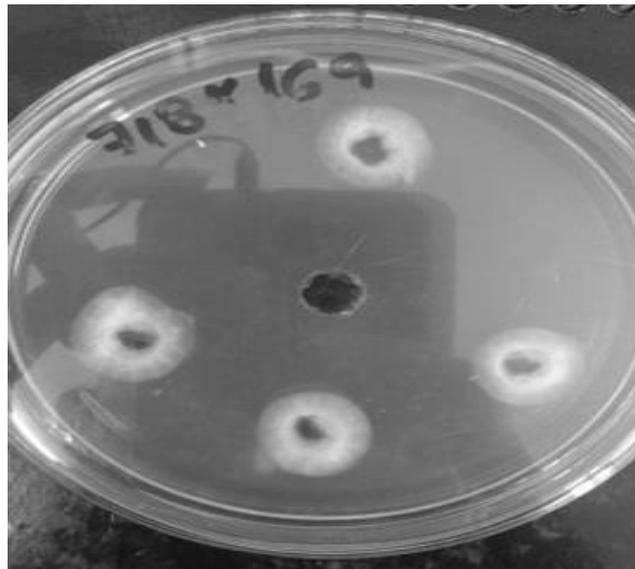
Fonte: Do autor (2019).

4.3 Teste de antagonismo *in vitro*

4.3.1 Ensaio

Um exemplo do teste de antagonismo *in vitro* realizado entre 5 cepas de leveduras e 4 isolados de *A. ochraceus* é mostrado na Figura 6 e os resultados do teste são apresentados na Figura 7 como médias do diâmetro da colônia formada.

Figura 6 – Exemplo do teste de antagonismo *in vitro*.



Fonte: Do autor (2019).

Baseando-se nos resultados obtidos do teste de antagonismo *in vitro*, foram selecionadas as leveduras *S. cerevisiae* CCMA 160, *S. cerevisiae* CCMA 162 e *C. krusei* CCMA 163 para continuidade dos trabalhos. As leveduras *C. guilliermondii* CCMA 153 e *C. parapsilosis* CCMA 158 não cresceram nas temperaturas utilizadas para o teste. Apesar de algumas espécies do gênero *C.* conseguirem se desenvolver em temperaturas mais baixas, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis* possuem temperatura ideal de crescimento entre 30 °C e 37 °C (TAVANTI et al., 2005; DUDIUK et al., 2017; MARCOS-ZAMBRANO et al., 2017). As concentrações da suspensão de esporos de *A. ochraceus* + levedura nas proporções 1:2 e 1:3 também foram excluídas para os testes posteriores, por não apresentarem diferença significativa da concentração 1:1, de acordo com a ANOVA e o Teste de Tukey.

Pode se observar na Figura 7 que, na maioria dos co-cultivos, a presença das leveduras limitou o crescimento das colônias dos isolados de *A. ochraceus*. Porém, de acordo com o Teste de Qui-Quadrado aplicado para avaliar a diferença significativa entre o controle e os ensaios, apenas entre as cepas de leveduras *S. cerevisiae* CCMA 160 e CCMA 162 x *A.*

ochraceus CCDCA 10506 e *S. cerevisiae* CCMA 162 x *A. ochraceus* CCDCA 10718 a 15 °C, houve diferença significativa no crescimento fúngico.

Figura 7 – Resultados do teste de antagonismo *in vitro*. (Continua)

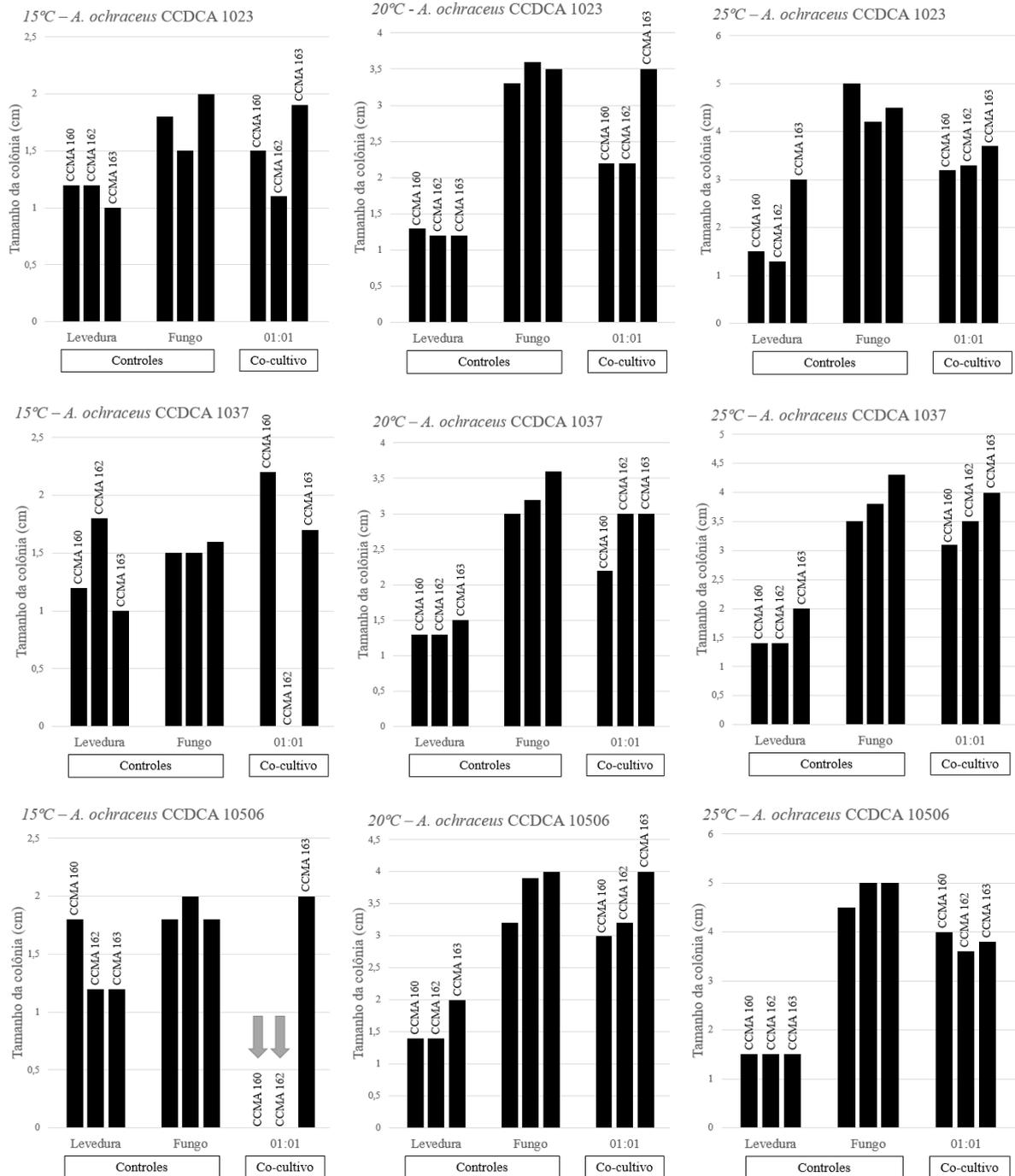
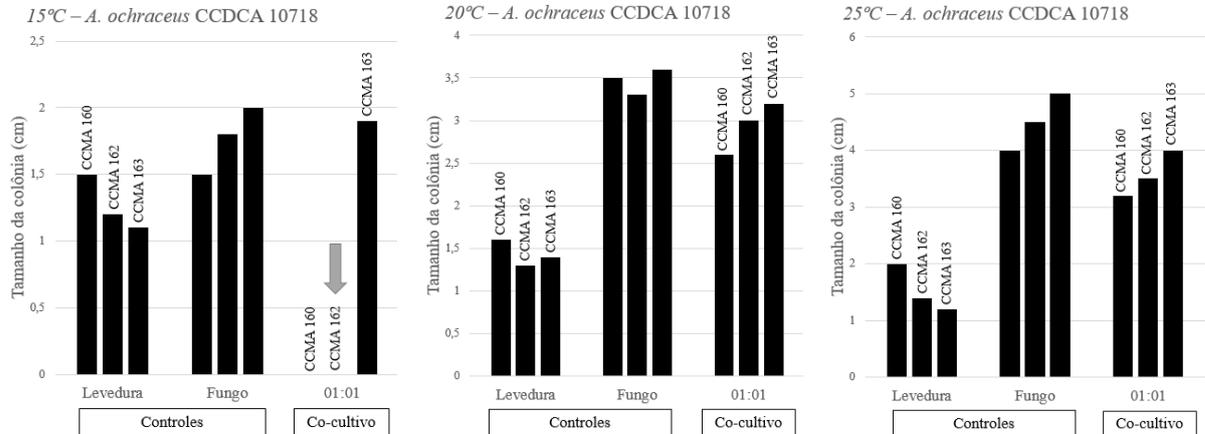


Figura 7 – Resultados do teste de antagonismo *in vitro*. (Conclusão)

Legenda: O teste foi realizado entre os isolados de *A. ochraceus* (CCDCA1023, CCDCA1037, CCDCA10506 e CCDCA10718) e cepas de leveduras (CCMA160, CCMA162 e CCMA163) na proporção de 1:1, mostrando o diâmetro (cm) da colônia de levedura (controle), de *A. ochraceus* (controle) e do co-cultivo (tamanho mostrado da colônia de *A. ochraceus*). A seta indica o ensaio que foi diferente significativamente do controle.

Fonte: Do autor (2019).

4.3.2 Avaliação da produção de OTA

Os resultados da avaliação da inibição da produção de OTA no teste de antagonismo *in vitro* são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultado do teste de toxicidade.

<i>A. ochraceus</i>	Temperatura	Controle	Levedura		
			CCMA 160	CCMA 162	CCMA 163
CCDCA 1023	15 °C	+	-	-	-
CCDCA 1037		-	-	-	-
CCDCA 10506		-	-	-	-
CCDCA 10718		-	-	-	-
CCDCA 1023	20 °C	+	-	-	+
CCDCA 1037		+	-	-	-
CCDCA 10506		-	-	-	+
CCDCA 10718		-	-	-	-
CCDCA 1023	25 °C	+	-	-	+
CCDCA 1037		+	-	+	+
CCDCA 10506		+	-	-	+
CCDCA 10718		+	-	-	-

Legenda: O teste foi realizado a partir do ensaio de antagonismo *in vitro* entre isolados de *A. ochraceus* (CCDCA1023, CCDCA1037, CCDCA10506 e CCDCA10718) e cepas de leveduras (CCMA160, CCMA162 e CCMA163). Sendo: (-) sem e (+) com produção de ocratoxina A.

Fonte: Do autor (2019).

As temperaturas 15 °C e 20 °C, foram excluídas dos testes posteriores, pois a maioria dos fungos *A. ochraceus* estudados não produziu ocratoxina A nestas condições, como observado na Tabela 1 em controle. Logo, será considerada a temperatura de 25 °C, pois todos os quatro isolados de *A. ochraceus* produziram OTA nesta temperatura e assim será mais confiável afirmar se a presença da levedura inibe a produção de toxina nos ensaios.

A temperatura é um dos fatores mais importantes que influenciam o crescimento e a produção de OTA de fungos ocratoxigênicos. Passamani et al. (2014), avaliaram a influência da temperatura no desenvolvimento e produção de OTA em meio de cultura semissintético de uva por *Aspergillus carbonarius* e *A. niger*. *A. carbonarius* apresentou o maior crescimento a temperaturas de 20 a 33 °C, enquanto *A. niger*, de 24 a 37 °C. Em ambas as espécies, os maiores níveis de OTA foram encontrados a 15 °C. Estes resultados mostram que os fungos avaliados são capazes de crescer e produzir OTA em uma ampla faixa de temperatura e que as condições ótimas para a produção da toxina podem ser diferentes das ideais para o crescimento fúngico.

De Souza et al. (2016) verificaram que a temperatura afeta a produção de OTA por fungos filamentosos, utilizando 3 isolados de *A. ochraceus* provenientes de café e combinando diferentes meios de culturas, temperatura e tempo de incubação para avaliar o efeito destes fatores no crescimento micelial e produção de OTA. O meio de cultura YES (com alto teor de sacarose, que é uma fonte de carbono rica em energia), foi o melhor substrato para a produção de OTA. Considerando o cultivo no meio YES, após 5 dias a produção de OTA entre os isolados de *A. ochraceus* foi maior a 25°C (6,11 µg/g – média entre os 3 isolados) do que a 15°C (2,83 µg/g). Seus resultados corroboram com os resultados encontrados no teste de toxicidade realizado, onde todos os isolados de *A. ochraceus* produziram a toxina à 25°C. Palacios-Cabrera et al. (2005) constataram que a melhor faixa de temperatura de crescimento de *A. ochraceus* é de 25 a 30 °C. E outros autores, verificaram que a produção máxima de OTA por esta espécie ocorre na mesma faixa de temperatura (RAMOS et al., 1998; PARDO et al., 2004; ALI et al., 2013).

Analisando os resultados da avaliação da produção de OTA no teste de antagonismo *in vitro* (TABELA 1), observou-se que *S. cerevisiae* CCMA 160 foi a mais eficiente no controle da produção de OTA por *A. ochraceus*. Pois este indicou a ausência da toxina quando a levedura foi cultivada com os 4 isolados de fungo filamentoso. Em seguida, *S. cerevisiae* CCMA 162 também se mostrou eficiente, já que impediu a produção de toxina pela maioria dos isolados de *A. ochraceus* (menos de CCDCA 1037).

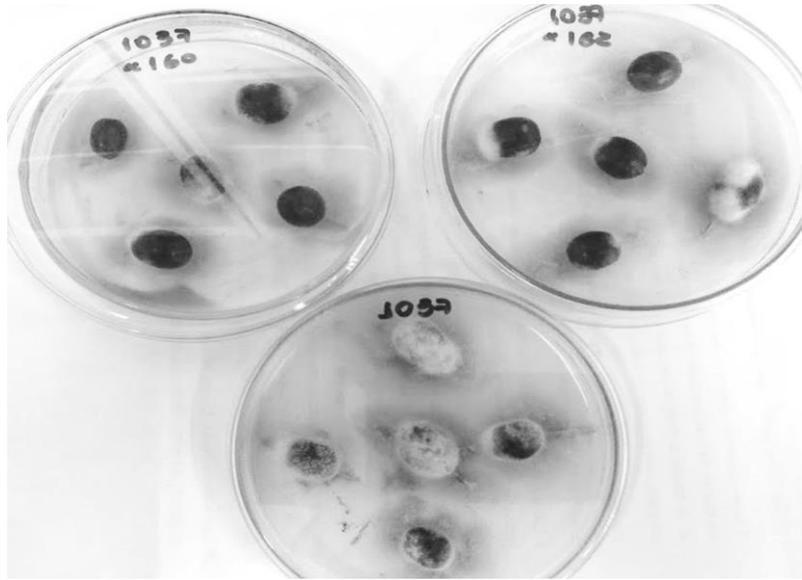
S. cerevisiae tem sido relatada como eficiente antagonista de fungos filamentosos produtores de micotoxinas. Armando et al. (2013) mostraram em estudos *in vitro*, que cepas desta espécie diminuíram o crescimento de *A. carbonarius* e *Fusarium graminearum* e sua produção de micotoxina (ocratoxina A, zearalenona e desoxinivalenol). Persons et al. (2013) observaram em testes *in vitro* que a presença da levedura *S. cerevisiae* afetou o crescimento de *A. flavus* e *A. parasiticus*, porém o estudo não demonstrou seu efeito na diminuição de micotoxinas.

O uso de leveduras para o controle de fungos toxigênicos pode apresentar grande potencial na redução dos danos causados na agricultura. A proteção dos produtos agrícolas fornecida pelas leveduras pode ser realizada pela inibição do crescimento do fungo filamentoso ou inibição da produção de toxina por este, através da absorção ou degradação destes compostos tóxicos (PFLIEGLER et al., 2015). A parede celular de *S. cerevisiae* é constituída por macromoléculas (β -glucanos e manoproteínas) que possuem capacidade de adsorção. Yiannikouris et al. (2003), descreveram a adsorção da micotoxina zearalenona pela parede celular de *S. cerevisiae* em experimentos *in vitro*. Bejaoui e seus colaboradores em 2004, verificaram que a diminuição dos níveis de OTA no meio com a presença desta levedura era resultado da adsorção pois quando compararam os níveis de OTA no meio com células de leveduras viáveis em fase estacionária de crescimento e células inviáveis não houve diferença significativa. Isso mostrou que a OTA não foi metabolizada, o que indica que a adsorção, e não o catabolismo, é o mecanismo que reduz as concentrações de OTA no meio.

4.4 Teste de antagonismo *in situ*

Um exemplo do teste de antagonismo *in situ* realizado entre 2 cepas de leveduras e 4 isolados de *A. ochraceus* é mostrado na Figura 8 e os resultados do teste são apresentados na Figura 9 como média da quantidade de frutos contaminados (que apresentaram crescimento fúngico visível).

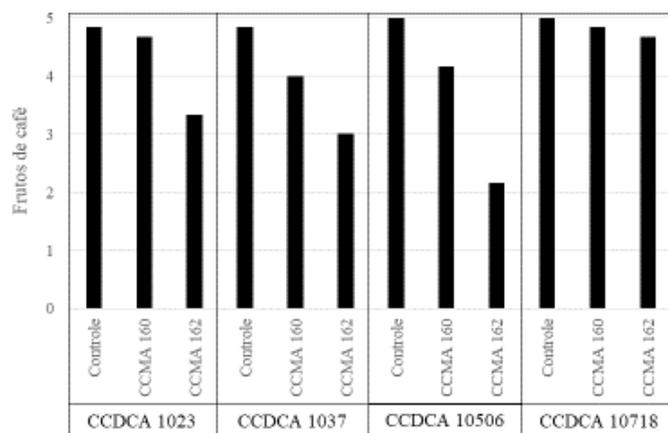
Figura 8 – Exemplo do teste de antagonismo *in situ*.



Fonte: Do autor (2019).

Pode se observar na Figura 9 que o antagonismo das leveduras, de uma forma geral, é eficiente na redução da quantidade de grãos infectados pelo fungo *A. ochraceus* quando comparado ao controle. Porém, de acordo com o Teste de Qui-Quadrado aplicado para avaliar a diferença significativa entre o controle e os co-cultivos, nenhuma das duas cepas de leveduras testadas reduziram a contaminação fúngica.

Figura 9 – Resultado do teste de antagonismo *in situ*.



Legenda: O teste foi realizado entre os isolados de *A. ochraceus* (CCDCA1023, CCDCA1037, CCDCA10506 e CCDCA10718) e cepas de *S. cerevisiae* (CCMA160 e CCMA162), mostrando a média da quantidade de frutos infectados.

Fonte: Do autor (2019).

Os tipos de amostras de café analisados podem diferir quanto a presença e quantidade de OTA (BATISTA & CHALFOUN, 2007). A ocratoxina A tem sido amplamente documentada como contaminante de café verde (ROMANI et al., 2000; REZENDE et al., 2013; GIL-SERNA et al., 2014) e café torrado (LEONI et al., 2000; VANESA & ANA, 2013; BENITES et al., 2017). Para uma prevenção adequada da contaminação fúngica e consequente ocorrência de ocratoxina A em café, as espécies contaminantes e os pontos críticos do pré-processamento do grão devem ser conhecidos (BATISTA & CHALFOUN, 2007). A aplicação prévia de agentes de controle biológico adequados pode permitir uma proteção mais efetiva contra os agentes patogênicos da planta e, posteriormente, os estoques de armazenamento durante as condições pós-colheita (PFLIEGLER et al., 2015; BROISSIN-VARGAS et al., 2017).

Zhu et al. (2015) realizaram testes *in vitro* e *in vivo* (uva) com diferentes espécies de leveduras, entre elas *S. cerevisiae* que apresentou os melhores resultados. Estes autores notaram que esta espécie inibiu o crescimento de *A. carbonarius* e *A. ochraceus* e a produção de OTA também diminuiu significativamente nos testes *in vivo*. Velmourougane et al. (2011) demonstraram que essa espécie de levedura também é eficiente no combate de *A. ochraceus* e produção de OTA no café. *S. cerevisiae* se apresenta como uma boa candidata para o processo de controle biológico, pois além de reduzir o teor de toxinas em produtos alimentícios, ela ainda participa do processo tecnológico de fermentação do mesmo e possui propriedades probióticas (ABRUNHOSA et al., 2010; PIOTROWSKA & MASEK, 2015). O desenvolvimento de uma tecnologia eficiente baseada no uso de leveduras para controle biológico requer uma maior compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na interação antagonista com o fungo toxigênico e a toxina, tais como absorção, degradação, efeito na qualidade do produto alimentício e controle genético ligado à produção da toxina (PFLIEGLER et al., 2015).

5 CONCLUSÃO

O café, que é mais do que uma mera bebida, devido às suas propriedades funcionais e sensoriais, pode representar um risco à saúde para seu consumidor considerando os níveis de OTA presentes. São recomendadas boas práticas de fabricação e padrões de higiene durante a produção de café para reduzir o risco de contaminação com fungos ocratoxigênicos. Além disso, é necessário investir em conhecimento para desenvolver e/ou melhorar tecnologias eficazes e amigáveis para controlar essa contaminação.

A inclusão de controle biológico na cadeia de processamento de frutos de café pode ser uma abordagem promissora, a fim de não apenas eliminar os fungos produtores de OTA, mas também, a toxicidade causada pela OTA. As leveduras, em especial a *S. cerevisiae*, pode ser aplicada como tratamento na indústria cafeeira sem alterar seu processo de fabricação. O controle biológico pode ser aplicado sem afetar os atributos sensoriais que tornam o café um dos produtos mais agradáveis, promovendo a segurança e a qualidade dos alimentos. No entanto, novos estudos são necessários não apenas no que diz respeito à melhoria das cepas selecionadas, mas também o modo e momento de sua aplicação no tratamento do café, garantindo sua eficácia e segurança no produto final.

REFERÊNCIAS

- ABOIM, M. C. R.; COUTINHO, H. L. C.; PEIXOTO, R. S.; BARBOSA, J. C.; ROSADO, A. S. Soil bacterial community structure and soil quality in a slash-and-burn cultivation system in Southeastern Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 38, p. 100-108, 2008.
- ABREU, A. R.; ARMENDÁRIZ, C. R.; FERNÁNDEZ, A. J. G; TOREE, H. La ocratoxina A en alimentos de consumo humano. **Nutrición Hospitalaria**, v. 26, p. 1215–1226, 2011.
- ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of Ochratoxin A for Food and Feed Decontamination. **Toxins**, v. 2, p. 1078-1099, 2010.
- ALEXANDER, J.; AUTRUP, H.; BARD, D.; BENFORD, D.; CARERE, A.; GUIDO, L. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. **EFSA Journal**, v. 365, p. 1–56, 2006.
- AMÉZQUETA, S.; GONZALEZ-PENAS, E.; MURILLO-ARBIZU, M.; CERAIN, A. L. Ochratoxin A decontamination: A review. **Food Control**, v. 20, p. 326-333, 2009.
- ANLI, E.; ALKIS, I. M. Ochratoxin A and brewing technology: A review. **Journal of the Intitute of Brewing**, v. 116, n. 1, p. 23–32, 2010.
- ARMANDO, M. R.; DOGI, C. A.; POLONI, V.; ROSA, C. A. R.; DALCERO, A. M.; CAVAGLIERI, L. R. In vitro study on the effect of *S. cerevisiae* strains on growth and mycotoxin production by *A. carbonarius* and *Fusarium graminearum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, p. 182-188, 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 24/09/2019.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p. 293-300. 2003.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M. Incidência de ocratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea arabica* L.): bóia, mistura e varrição após secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. **Ciência Agrotecnológica**, v. 31, p. 804-813. 2007.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; SILVA, C.F.; CIRILLO, M.; VARGA, E. A.; SCHWAN, R. F. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, v. 20, p. 784-790, 2009.
- BEJAOUI, H.; MATHIEU, F.; TAILLANDIER, P.; LEBRIHI, A. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *S.* strains.
- BENITES, A. J.; FERNANDES, M.; BOLETO, A. R.; AZEVEDO, S.; SILVA, S.; LEITÃO, A. L. Occurrence of ochratoxin A in roasted coffee samples commercialized in Portugal. **Food Control**, v. 73, p. 1223-1228. 2017.
- BRAKHAGE, A. A.; SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites - Strategies to activate

silent gene clusters. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 1, p. 15–22, 2011.

BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 21-32, 2013.

BROISSIN-VARGAS, L. M.; SNELL-CASTRO, R.; GODON, J. J.; GONZÁLEZ-RÍOS, O.; SUÁREZ-QUIROZ, M. L. Impact of storage conditions on fungal community composition of green coffee beans *Coffea arabica* L. stored in jute sacks during 1 year. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, p. 547-558. 2017.

CUBAIU, L.; ABBAS, H.; DOBSON, A.; BUDRONI, M.; MIGHELI, Q. A *S. cerevisiae* wine strain inhibits growth and decreases ochratoxin A biosynthesis by *A. carbonarius* and *A. ochraceus*. **Toxins**, v. 4, p. 1468–1481, 2012.

DE SOUZA, S. C.; PEREIRA, V M.; PASSAMANI, F. R. F.; CIRILLO, M. A.; CUNHA, R. L.; CARDOSO, M. G.; SANTIAGO, W. D.; SOUZA, S. M. C.; BATISTA, L. R. Effects of temperature and incubation time on growth and ochratoxin A biosynthesis by *A. carbonarius* and *A. ochraceus* in grain-based media. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, p. 1306-1314. 2016.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. **Resolução – RDC N° 7, DE 18 DE FEVEREIRO DE 2011**. 2011.

DUDIUK, C.; MACEDO, D.; LEONARDELLI, F.; THEILL, L.; CABEZA, M. S.; GAMARRA, S.; GARCIA-EFFRON, G. G. Molecular confirmation of the relationship between *C. guilliermondii* Fks1p substitutions and Its intrinsic reduced echinocandin susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, p. 1-5. 2017.

FIORI, S.; URGEGHE, P. P.; HAMMAMI, W.; RAZZU, S.; JAOUA, S.; MIGHELI, Q. Biocontrol activity of four non- and low- fermenting yeast strains against *A. carbonarius* and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 189, p. 45-50. 2014.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **As micotoxinas**, v. 7, p. 32–40, 2009.

FRISVAD, J. C.; FRANK, J. M.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJPERS, A. F. A.; SAMSON, R. A. New ochratoxin A producing species of *A. section Circumdati*. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 23-43, 2004.

GALLO, A.; BRUNO, K. S.; SOLFRIZZO, M.; PERRONE, G.; MULE, G.; VISCONTI, A.; BAKER, S. E. New insight into the ochratoxin a biosynthetic pathway through deletion of a nonribosomal peptide synthetase gene in *A. carbonarius*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 23, p. 8208–8218, 2012.

GALLO, A.; FERRARA, M.; PERRONE, G. Recent advances on the molecular aspects of ochratoxin A biosynthesis. **Current Opinion in Food Science**, v. 17, p. 49-56, 2017.

GIL-SERNA, J.; VÁZQUEZ, C.; SARDIÑAS, N.; GONZÁLEZ-JAÉN, M. T.; PATIÑO, B. Revision of ochratoxin a production capacity by the main species of *A. Section Circumdati*: *A. steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. **Food Control**, v. 22, p. 343-345, 2011.

- GIL-SERNA, J.; VÁZQUEZ, C.; SANDINO, F. G.; VALLE, A. M.; GONZ-ALEZ-JAÉN, T.; PATIÑO, B. Evaluation of growth and ochratoxin A production by *A. steynii* and *A. westerdijkiae* in green-coffee based medium under different environmental conditions. **Food Research International**, v. 61, p. 127-131. 2014.
- HARRIS, J. P.; MANTLE, P. G. Biosynthesis of ochratoxins by *A. ochraceus*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 709-716, 2001.
- HUFF, W. E.; HAMILTON, P. B. Mycotoxins – Their biosynthesis in fungi: Ochratoxins – Metabolites of combined pathways. **Journal of Food Protection**, vol. 42, n. 10, p. 815-820, 1979.
- HUFFMAN, J.; GERBER, R.; DU, L. Review recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. **Biopolymers**, v. 93, n. 9, p. 764–776, 2010.
- INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **World coffee consumption**. Disponível em: <<http://www.ico.org/prices/new-consumption-table.pdf>>. Acesso em: 24/09/2019.
- MAGNOLI, C. E.; ASTORECA, A. L.; CHIACCHIERA, S. M.; DALCERO, A. M.. Occurrence of ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. **Mycopathologia**, v. 163, p. 249–260, 2007.
- MARCOS-ZAMBRANO, L. J.; PUIG-ASENSIO, M.; PÉREZ-GARCÍA, F.; ESCRIBANO, P.; SÁNCHEZ-CARILLO, C.; ZARAGOZA, O.; PADILLA, B.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ALMIRANTE, B.; MATÍN-GÓMEZ M. T.; MUÑOZ, P.; BOUZA, E.; GUINEA, J. C. *guilliermondii* complex is characterization by high antifungal resistance but low mortality in 22 cases of candidemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 6, p. 1-10. 2017.
- MERWE, K. J.; STEYN, P. S.; FOURIE, L.; SCOTT, B.; THERON, J. J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *A. ochraceus* Wilh. **Nature**, v. 205, p. 1112-1113, 1965.
- MURPHY, P. A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C. M. Food mycotoxins: An update. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 5, p. 51–65, 2006.
- O'CALLAGHAN, J.; CADDICK, M. X.; DOBSON, A. D W. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *A. ochraceus*. **Microbiology**, v. 149, n. 12, p. 3485–3491, 2003.
- O'CALLAGHAN, J.; STAPLETON, P. C.; DOBSON, A. D. W. Ochratoxin A biosynthetic genes in *A. ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. **Fungal Genetics and Biology**, v. 43, n. 4, p. 213–221, 2006.
- ONO, E. Y. S.; MENDES, A. M.; MEIRELLES, P. G.; HIROOKA, E. Y.; ONO, M. A. Micotoxinas em alimentos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 32, p. 69–80, 2004.
- PAL, K. K.; GARDENER, B. Biological Control of Plant Pathogens. **The Plant Health Instructor**, p. 1–25, 2006.
- PALACIOS-CABRERA, H; TANIWAKI, M. H.; HASHIMOTO, J. M.; MENEZES, H. C.

Growth of *A. ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, p. 24–28, 2005.

PARDO, E.; MARÍN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by *A. ochraceus* on irradiated barley grain as influenced by temperature and water activity. *International Journal of Food Microbiology*, v. 95, p. 79–88. 2004.

PASSAMANI, F. R. F.; HERNANDES, T.; LOPES, N. A.; BASTOS, S. C.; SANTIAGO, W. D.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R. Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin A by *A. niger* and *A. carbonarius* from Brazilian grapes. *Journal of Food Protection*, v. 77, p. 1947–1952. 2014.

PATHARAJAN, S.; REDDY, K. R. N.; KARTHIKEYAN, V.; SPADARO, D.; LORE, A.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Potential of yeast antagonists on *in vitro* biodegradation of ochratoxin A. *Food Control*, v. 22, p. 290–296. 2011.

PERRONE, G.; SUSCA, A.; COZZI, G.; EHRlich, J.; VARGA, J. C.; FRISVAD, M.; MEIJER, A.; NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; SAMSON, R. A. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology*, v. 59, p. 53–66, 2007.

PERSONS, K.; RAINES, J. M.; RODRIGUEZ, J. M. Antagonist effects of *S. cerevisiae* on the growth of *A. flavus* and *A. parasiticus* at varying temperatures. *Mycology*, v. 4, p. 38–43, 2013.

PÉTERI, Z.; TÉREN, J.; VÁGVOLGYI, C.; VARGA, J. Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiology*, v. 24, p. 205–210. 2007.

PETRUZZI, L.; BEVILACQUA, A.; BAIANO, A.; BENEDEUCE, L.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M. Study of *S. cerevisiae* W13 as a functional starter for the removal of ochratoxin A. *Food Control*, v. 35, p. 373–377. 2014.

PFLIEGLER, W. P.; PUSZTAHELYI, T.; PÓCSI, I. Mycotoxins – prevention and decontamination by yeasts. *Journal of Basic Microbiology*, v. 55, p. 805–818, 2015.

PIOTROWSKA, M.; MASEK, A. *S. cerevisiae* cell wall components as tools for ochratoxin A decontamination. *Toxins*, v. 7, p. 1151–1162, 2015.

PITT, J. I.; BASÍLICO, J. C.; ABARCA, M. L.; LÓPEZ, C. Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology*, v. 38, n. Supplement 1, p. 41–46, 2000.

RAMOS, A. J.; LABERNIA, N.; MARÍN, S.; SANCHIS, V.; MAGAN, N. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *A. ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. *International Journal of Food Microbiology*, v. 44, p. 133–140. 1998.

REZENDE, E. F.; BORGES, J. G.; CIRILLO, A.; PRADO, G.; PAIVA, L. C.; BATISTA, L. R. Ochratoxigenic fungi associated with green coffee beans (*Coffea arabica* L.) in conventional and organic cultivation in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n.

2, p. 377-384, 2013.

ROMANI, S.; SACCHETTI, G.; LOPEZ, C. C.; PINNAVAIA, G. G.; ROSA, M. D. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3616–3619. 2000.

SOUZA, M. L.; PASSAMANI, F. R. F.; ÁVILA, C. L. S.; BATISTA, L. R.; SCHWAN, R. F.; SILVA, C. F. Use of wild yeasts as a biocontrol agente against toxigenic fungi and OTA production. **Acta Scientiarum**, v. 39, p. 349-358. 2017.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A. R.; MAIDEN, M. C. J.; ODDS, F. C. C. *orthopsilosis* and *C. metapsilosis* spp. nov. to replace *C. parapsilosis* groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 284-292. 2005.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; TEIXEIRA A. A.; IAMANAKA, B. T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal Food Microbiology**, v. 82, p. 173-179, 2003.

TSITSIGIANNIS, D. I.; DIMAKOPOULOU, M.; ANTONIOU, P. P.; TJAMOS, E. C. Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 51, n. 1, p. 158–174, 2012.
UDVARDI, M. K.; CZECHOWSHI, T.; SCHEIBLE, W. R. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. **The Plant Cell**, v. 20, p. 1736-1737. 2008.

VANESA, D.; ANA, P. Occurrence of ochratoxin A in coffee beans, ground roasted coffee and soluble coffee and method validation. **Food Control**, v. 30, p. 675-678. 2013.

VELMOUROUGANE, K.; BHAT, R.; GOPINANDHAN, T. N.; PANNEERSELVAM, P. Management of *A. ochraceus* and ochratoxin A contamination in coffee during on-farm processing through commercial yeast inoculation. **Biological Control**, v. 57, p. 215-221, 2011.

VILELA, D. M.; PEREIRA, G. V.; SILVA, C. F.; BATISTA, R.; SCHWAN, R. F. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, v. 27, p. 1128-1135, 2010.

VIRGILI, R.; SIMONCINI, N.; TOSCANI, T.; LEGGIERI, M. C.; FORMENTI, S.; BATTILANI, P. Biocontrol of *Penicillium nordicum* growth and ochratoxin A production by native yeasts of dry cured ham. **Toxins**, v. 4, p. 68-82. 2012.

WANG, L.; WANG, Y.; WANG, Q.; LIU, F.; SELVARAJ, J. N.; LIU, L.; XING, F.; ZHAO, Y.; ZHOU, L.; LIU, Y. Functional characterization of new polyketide synthase genes involved in ochratoxin A biosynthesis in *A. ochraceus* fc-1. **Toxins**, v. 7, p. 2723-2738, 2015.

WANG, Y.; WANG, L.; LIU, F.; WANG, Q.; SELVARAJ, J. N.; XING, F.; ZHAO, Y.; LIU, Y. Ochratoxin A producing fungi, biosynthetic pathway and regulatory mechanisms. **Toxins**, v. 8, n. 83, p. 1-15, 2016.

WANG, Y.; WANG, L.; WU, F.; LIU, F.; WANG, Q.; ZHANG, X.; SELVARAJ, J. N.; ZHAO, Y.; XING, F.; YIN, W.; LIU, Y. A consensus ochratoxin A biosynthetic pathway:

Insights from the genome sequence of *Aspergillus ochraceus* and a comparative genomic analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 84, p. 1-15, 2018.

YIANNIKOURIS, A.; POUGHON, L.; CAMELEYRE, X.; DUSSAP, C.; FRANÇOIS, J.; BERTIN, G.; JOUANY, J. A novel technique to evaluate interactions between *S. cerevisiae* cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 783-789. 2003.

ZHU, C.; SHI, J.; JIANG, C.; LIU, Y. Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *A. carbonarius* and *A. ochraceus* in vitro and in vivo through antagonistic yeasts. **Food Control**, v. 50, p. 125–132, 2015.

CAPÍTULO 2

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COVS) PRODUZIDOS POR LEVEDURAS E FUNGOS FILAMENTOSOS DURANTE INTERAÇÃO ANTAGONISTA

RESUMO

Os COVs produzidos por fungos e leveduras têm sido estudados há décadas com foco principalmente na indústria alimentícia e agrícola pela exploração de suas propriedades gustativas e de biocontrole. No entanto, as aplicações desses compostos rompem as fronteiras da indústria alimentícia e ecologia e recentemente tem se voltado para a bioprospecção de biofiltros e biocombustíveis. Diante disso, estudos visando o isolamento desses compostos a partir de microrganismos conhecidos e facilmente manipuláveis podem contribuir para o conhecimento das rotas metabólicas de sua biossíntese bem como os produtos da interação entre os organismos em condições de co-cultivo. No presente estudo foram utilizadas cepas das leveduras, *Rhodotorula mucilaginosa* e *S. cerevisiae*, em cultivos individuais e co-cultivos associados aos fungos filamentosos *A. carbonarius* e *A. ochraceus* objetivando identificar compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos durante essa interação antagonista, que apresentem potencial biotecnológico além da inibição do crescimento de fungos toxigênicos. Os tratamentos foram realizados com o uso de *vials* e analisados em cromatógrafo GC-MS e os perfis identificados com base nas bibliotecas existentes. Foi observada, principalmente, a presença de álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas e aromáticos; houve variação entre as classes dos compostos produzidos nos cultivos individuais e co-cultivos; e, foi detectada ação antagonista entre os microrganismos. Os resultados obtidos são de extrema relevância, uma vez que, o conhecimento dos compostos produzidos por esses organismos individualmente e em condições de co-cultivo podem contribuir para maior exploração dos COVs em aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Biotecnologia. Compostos voláteis. Fungos toxigênicos. Leveduras.

ABSTRACT

VOCs produced by fungi and yeast have been studied for decades focusing mainly on the food and agricultural industry by exploiting their taste and biocontrol properties. However, the applications of these compounds break the boundaries of the food industry and ecology and have recently focused on bioprospecting biofilters and biofuels. Therefore, studies aiming at the isolation of these compounds from known and easily manipulated microorganisms may contribute to the knowledge of the metabolic pathways of their biosynthesis as well as the products of the interaction between the organisms under co-cultivation conditions. In the present study, strains of yeast, *Rhodotorula mucilaginosa* and *S. cerevisiae* were used in individual and co-cultivations associated with the filamentous fungi *A. carbonarius* and *A. ochraceus* aiming to identify volatile organic compounds (VOCs) produced during this antagonistic interaction. biotechnological potential besides inhibiting the growth of toxigenic fungi. The treatments were performed using vials and analyzed in GC-MS chromatograph and the profiles identified based on the existing libraries. It was observed mainly the presence of alcohols, esters, aldehydes, ketones and aromatics; There was variation between the classes of compounds produced in individual and co-cultivations; and, antagonist action was detected between the microorganisms. The results obtained are extremely relevant, as knowledge of the compounds produced by these organisms individually and under co-cultivation conditions can contribute to greater exploitation of VOCs in biotechnological applications.

Keywords: Biotechnology. Volatile compounds. Toxigenic fungi. Yeast.

1 INTRODUÇÃO

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) são sintetizados em plantas, bactérias e fungos como parte de estratégias evolutivas de defesa. Em fungos, podem ser produtos de vias metabólicas do metabolismo primário ou secundário, cuja produção depende da espécie e das condições do meio em que se encontram (KORPI et al., 2009). Constitui uma mistura complexa de compostos que pode conter hidrocarbonetos simples, heterociclos, álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, tióis, ésteres e seus derivados, entre outros, podendo incluir derivados de benzenos e ciclohexanos (KORPI et al., 2009; HUNG; LEE; BENNETT, 2015).

Estes compostos têm facilidade de transpor membranas e podem ser espalhados rapidamente na atmosfera ou no solo na ausência de uma barreira de difusão (PICHERSKY; NOEL; DUDAREVA, 2006), sendo por isso considerados “infoquímicos” ideais (BENNETT et al., 2013). Devido a essas propriedades, possuem maior área de atuação no meio e podem atuar como promotores ou inibidores do crescimento de outros microrganismos (KAI et al., 2009), incluindo inibição do crescimento micelial e da esporulação de alguns fungos filamentosos (CHANG et al., 2015; PARAFATI et al., 2017).

São compostos de baixo peso molecular que evaporam facilmente a temperaturas (~20 °C) e pressões (0,01 kPa) normais (PAGANS et al., 2006). Podem ser sólidos ou líquidos, a base de carbono e em sua maioria, são lipossolúveis, apresentando, portanto, baixa solubilidade em água (MORATH; HUNG; BENNETT, 2012) e geralmente apresentam um odor característico, ou seja, todos os compostos de aroma são compostos orgânicos voláteis.

O interesse em COVs fúngicos surgiu a partir de fungos que emitem odores aos humanos e tem crescido em torno do interesse econômico, principalmente nos setores culinário e médico (MORATH; HUNG; BENNETT, 2012). Na literatura, tem sido dada muito mais ênfase aos COVs de origem bacteriana e seu papel ecológico (JUNKER; THOLL, 2013; PIECHULLA; DEGENHARDT, 2014), no entanto, mais de 300 COVs fúngicos já foram descritos, sendo que a maioria desses compostos é exclusiva do metabolismo fúngico, e a classe de sesquiterpenóides voláteis é a mais citada (KORPI et al., 2009; KRAMER; ABRAHAM, 2012; LEMFACK et al., 2014).

Os estudos focados nos COVs fúngicos abrangem uma ampla gama de áreas de interesse, como propriedades gustativas na fermentação alcoólica, panificação, e outros produtos alimentícios (KARLSHOJ et al., 2007; FRAATZ; ZORN, 2010), doenças na agricultura (CASALINUOVO et al., 2006) ou na medicina (BAZEMORE et al., 2012; HEDDERGOTT et al., 2014). Além desses, são notáveis estudos voltados para a

quimiotaxonomia (HUSSAIN et al., 2010; MULLER et al., 2013); sinalização química (AZEEM et al., 2015; DAVIS et al., 2013), efeitos em plantas (PAUL; PARK, 2013; NAZNIN et al., 2014), controle biológico e micofumigação (BERENDSEN et al., 2013; HERRERO-GARCIA et al., 2011).

Em cultivos controlados em laboratório, as espécies individuais de fungos produzem um padrão típico de COVs que varia dependendo das condições de crescimento, como o tipo de meio utilizado, pH e temperatura (CHIRON; MICHELOT, 2005; KORPI et al., 2009). Por exemplo, quanto maior a disponibilidade de fontes de carbono no meio, mais complexa é sua composição de COVs (FIALHO et al., 2010). *A.* está entre os gêneros que produzem COVs mais comumente encontrados em ambientes internos (CLAESON, 2006) e as leveduras como *S. cerevisiae* são considerados os microrganismos mais intensamente utilizados nos processos biotecnológicos.

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi identificar compostos orgânicos voláteis (COVs) que apresentem potencial biotecnológico, durante a interação entre leveduras antagonistas e fungos filamentosos toxigênicos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

Os isolados *A. carbonarius* CCDCA 10608 e *A. ochraceus* CCDCA 10612 pertencem à Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Ciências dos Alimentos (CCDCA), da Universidade Federal de Lavras. Os isolados de leveduras, sendo *S. cerevisiae* (CCMA 0159, 1299, 1302, 1306, 1313, 1315 e 1317) e *Rhodotorula mucilaginosa* CCMA 1305, pertencem à Coleção de Cultura da Microbiologia Agrícola (CCMA), do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras. As cepas de leveduras já apresentam potencial antagonista, e foram reativados e cultivados conforme descrito em Souza et al. (2017).

2.2 Identificação de COVs por GC-MS

Todos os isolados de leveduras e fungos filamentosos foram cultivados isoladamente e em co-cultivo totalizando 26 ensaios. Os cultivos foram realizados em *vials* de 15 mL com septo contendo 2 mL de meio MEA. Todos os cultivos foram incubados por 7 dias a 25 °C. As análises dos COVs foram realizadas de acordo com Fialho et al. (2010). O cromatógrafo GC-MS (Shimadzu, modelo GCMS-QP2010 SE) foi equipado com coluna capilar de sílica

fundida modelo Rtx®-5MS (Restek, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) e fase estacionária (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano). O injetor foi operado em modo *splitless* com gás hélio como arraste. A temperatura do injetor e do detector foi mantida a 250 °C. A temperatura do forno manteve-se à 40 °C/5 min, 3°C/min até 100 °C, em seguida aumento de 20 °C/min até 250 °C, o qual foi mantido por 10 min/250 °C. A faixa de detecção no espectrômetro de massa foi de 35 e 350 m/z. Os COVs foram identificados comparando seus espectros de massas com os da biblioteca NIST 11. Uma série de alcanos (C10-C40) foi usada para calcular o índice de retenção (RI) para cada composto e foram comparados com RI encontrados em dados da literatura.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise por GC-MS permitiu identificar 58 COVs, pertencentes a diferentes classes químicas, como álcoois (8 compostos), ésteres (22), cetonas (4), aromáticos (2), ácidos (4), aldeídos (4), furano (1), entre outros (13) (Figura 1). Compostos similares foram identificados por Bruce et al. (2004) e Rude e Schinmer (2009) em cultivos de leveduras *S. cerevisiae*. Os COVs produzidos pelos microrganismos foram relatados de acordo com sua presença e ausência (Figura 1).

Alguns compostos foram predominantes quando os isolados foram cultivados isoladamente e a mesma tendência foi observada quando os isolados foram co-cultivados. A produção de ésteres (12 compostos) e álcoois (7) foi predominante no cultivo de *A. carbonarius* CCDCA 10608, *A. ochraceus* CCDCA 10612 (7 compostos ésteres e 5 compostos álcoois), e no cultivo de todas as cepas de *S. cerevisiae* (15 compostos ésteres e 5 compostos álcoois) e de *R. mucilaginosa* (13 compostos ésteres e 5 compostos álcoois), ou seja, em todos os ensaios foram produzidos principalmente compostos pertencentes aos grupos dos álcoois e ésteres.

Em *S. cerevisiae*, a produção de etanol tem importância evolutiva na competitividade inibindo o crescimento de outros microrganismos (MACLEAN; GUDELJ, 2006). Além de seu papel ecológico, os subprodutos da fermentação alcoólica em *S. cerevisiae* são empregados na panificação e outros fatores de crescimento, além de seu conhecido papel na produção de bebidas alcoólicas, ou ainda na produção de um combustível alternativo e renovável (ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2014).

Figura 1 - Compostos orgânicos voláteis (COVs) identificados por GC/MS.

Grupo e Compostos	Amostras																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
Álcoois																											
Ethanol																											
2,3-Butanediol																											
2-Methyl-1-propanol																											
2-Heptanol																											
2-Methyl-1-butanol																											
3-Methyl-1-butanol																											
2-Nonanol																											
PhenylethylAlcohol																											
Ésteres																											
EthylAcetate																											
Ammoniumacetate																											
Ethylpropanoate																											
Ethyl 2-methylpropanoate																											
Isobutylacetate																											
Ethylbutyrate																											
1-Butanol, 2-methyl-, acetate																											
1-Butanol, 3-methyl-, acetate																											
1-Butanol, 2-methyl-, acetate																											
Ethyl 2-aminopropanoate																											
1-Butanol, 3-methyl-, propanoate																											
Ethylhexanoate																											
Ethyl octanoate																											
2-Phenethyl acetate																											
Ethyl 9-decanoate																											
Ethyldecanoate																											
Hexanoicacid, ethylester																											
Propanoicacid, pentylester																											
Heptanoicacid, ethylester																											
Octanoicacid, 3-methylbutyl ester																											
Sulfuricacid, dibutylester																											
Pentadecanoicacid, 3-methylbutyl ester																											
Cetonas																											
Acetone																											
2-Pentanone																											
2-Heptanone																											
2-Nonanone																											
Aromáticos																											
Styrene																											
1,3-bis(1,1-dimethylethyl) benzene																											
Ácidos																											
Aceticacid																											
Propanoicacid, 2-hydroxyethyl ester																											
Glyoxalicacid																											
Oxalicacid																											
Aldeídos																											
Acetaldehyde																											
Propanal, 2-methyl																											
2-Methyl-1-butanol																											
3-Methyl-1-butanol																											
Furano																											
Ethanone, 1-(3-hydroxy-2-furanyl)																											
Outros																											
Heptane																											
Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-(1-methylpropyl)																											
2,4,5-Trimethyl-1,3-dioxolane																											
Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)																											
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-(1-oxopropyl) phenol																											
Oxime-, methoxy-phenyl cis-Thujopsene																											
2-Propen-1-amine																											
Dimethylamine																											
2-Amino-1-propanol																											
2-Propanamine																											
1,3-Pentadiene																											
Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)-[1S(1.alpha.2.Beta.4.beta.)]																											

Legenda: Cultivos individuais de fungos: (1) *A. carbonarius* CCDCA 10608; (2) *A. ochraceus* CCDCA 10612; Cultivos individuais de leveduras: (3) *S. cerevisiae* CCMA 0159; (4) *S. cerevisiae* CCMA 1299; (5) *S. cerevisiae* CCMA 1302; (6) *S. cerevisiae* CCMA 1306; (7) *S. cerevisiae* CCMA 1313; (8) *S. cerevisiae* CCMA 1315; (9) *S. cerevisiae* CCMA 1317; (10) *R. mucilaginosa* CCMA

1305; Co-cultivos de fungos e leveduras: (11) *A. carbonarius* CCDCA 10608 + *S. cerevisiae* CCMA 0159; (12) *A. carbonarius* CCDCA 10608 + *S. cerevisiae* CCMA 1299; (13) *A. carbonarius* CCDCA 10608 + *S. cerevisiae* CCMA1302; (14) *A. carbonarius* CCDCA 10608 + *S. cerevisiae* CCMA306; (15) *A. carbonarius* CCDCA 10608 + *S. cerevisiae* CCMA1313; (16) *A. carbonarius* CCDCA 10608 + *S. cerevisiae* CCMA1315; (17) *A. carbonarius* CCDCA 10608 + *S. cerevisiae* CCMA 1317; (18) *A. carbonarius* CCDCA 10608 + *R. mucilaginosa* CCMA 1305; (19) *A. ochraceus* CCDCA 10612 + *S. cerevisiae* CCMA 0159; (20) *A. ochraceus* CCDCA 10612 + *S. cerevisiae* CCMA 1299; (21) *A. ochraceus* CCDCA 10612 + *S. cerevisiae* CCMA1302; (22) *A. ochraceus* CCDCA 10612 + *S. cerevisiae* CCMA1306; (23) *A. ochraceus* CCDCA 10612 + *S. cerevisiae* CCMA1313; (24) *A. ochraceus* CCDCA 10612 + *S. cerevisiae* CCMA1315; (25) *A. ochraceus* CCDCA 10612 + *S. cerevisiae* CCMA 1317; (26) *A. ochraceus* CCDCA 10612 + *R. mucilaginosa* CCMA 1305. Os compostos em negrito possuem ação antifúngica. Os quadrados pintados de verde apontam a presença do composto na amostra.

Fonte: Do autor (2019).

Além do etanol, comum à fermentação de fungos e leveduras, os álcoois superiores alifáticos, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol, com atividade antifúngica, e o álcool aromático, feniletilálcool, foram detectados em todos os cultivos. Estes álcoois são conhecidos por contribuir para o aroma de bebidas fermentadas como a cerveja e o vinho (SAMAPPITO; BUTKHUP, 2010). Acredita-se que os álcoois superiores são formados a partir de aminoácidos, especificamente leucina e valina por processos de transaminação envolvendo intermediários (cetoácidos) do ciclo de Krebs (HAZELWOOD et al., 2008). Em *S. cerevisiae* foi observada uma variedade de substratos e cetoácidos (p.ex. piruvato, alfa-cetogluturato, acetoacetato) que possibilitam ação enzimática para produção dos álcoois superiores, importantes precursores de biocombustíveis (ATSUMI; HANAI; LIAO, 2008).

A. carbonarius CCDCA 10608 produziu 2-heptanol e 2-nonanol isoladamente ou na presença de todas as cepas de *S. cerevisiae*. Contrariamente, na presença de *R. mucilaginosa* houve provável inibição da produção de ambos compostos. Adicionalmente, o álcool 2-nonanol foi produzido também no co-cultivo entre *A. ochraceus* e três cepas de *S. cerevisiae* (CCMA 0159, CCMA 1299 e CCMA1302). Esses compostos foram relatados atuando na inibição de basidiomicetos mesmo quando presentes em baixas concentrações (HUMPHRIS; WHEATHLEY; BRUCE, 2001), demonstrando potencial para utilização no biocontrole. O 3-metil-1-butanol e álcool fenilético também já foram relatados como produtos do metabolismo de *S. cerevisiae* atuando como potenciais compostos de biocontrole fúngico (CONTARINO et al., 2019). No entanto, este composto também foi detectado nos cultivos dos isolados de *A.* e de *Rhodotorula* isoladamente.

Os ésteres também são comumente formados durante a fermentação por leveduras e são gerados por reações enzimáticas entre ácidos ativados sob a forma de AcetilS-CoA e álcoois correspondentes (CLAESON, 2006). Dos 22 ésteres identificados, 12 foram

detectados, também, nos isolados de *A.*. Acetato de etila, presente em todos os ensaios, é o principal éster produzido por leveduras e é conhecido por sua atividade antifúngica (CONTARINO et al., 2019; FIALHO et al., 2010). Esses compostos são catalisados a partir de álcoois superiores e ácidos graxos de cadeia longa (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000) que são produtos do metabolismo secundário desses organismos, sendo que os álcoois superiores foram diretamente relacionados com a taxa de crescimento da levedura (JANZANTTI, 2004). A produção de acetato de amônio foi induzida apenas quando ocorreu o co-cultivo entre *R. mucilaginosa* e *A. ochraceus*. Alguns ésteres foram inibidos (-) no co-cultivo ou estimulados (+) durante a interação. Todas as cepas de *S. cerevisiae* isoladamente produziram 1-butanol-3-metil propanoato, acetato de etila, isobutilacetato, etilbutirato (-), 1-butanol-2 metil acetato (+), etil octanoato, 2-fenilacetato, etil 9- decenoato, etildecanoato. *A. carbonarius* produziu etilhexanoato que foi inibido na presença de todas as cepas leveduras, todos compostos resultantes do metabolismo secundário.

O co-cultivo entre todas as cepas de *S. cerevisiae* com *A. carbonarius* e *A. ochraceus* produziu o composto ácido hexanóico, esse composto apenas não foi produzido nos co-cultivos envolvendo *R. mucilaginosa*, sugerindo possível inibição de produção por esses microrganismos; *A. carbonarius* inibiu a produção de ácido octanóico por *R. mucilaginosa*; e, *A. carbonarius* e *A. ochraceus* inibiram a produção de dibutilsulfato por *R. mucilaginosa*.

Ainda na classe dos ésteres, o composto etilpropanoato é produzido pela maioria das cepas de *S. cerevisiae* (CCMA 0159, CCMA 1299, CCMA 1302, CCMA 1315 e CCMA 1317). A presença de *A. carbonarius* pode ter induzido a produção desse composto pelas cepas de *S. cerevisiae* (CCMA 1306 e CCMA 1313) e *R. mucilaginosa*, antes não produtoras deste composto, e pode ainda ter inibido sua produção nas cepas *S. cerevisiae* (CCMA 1315 e CCMA 131). Masoud, Poll e Jakobsen (2005) verificaram que as leveduras *Pichia anomala*, *P. kluyveri* e *Hanseniaspora uvarum* produziram ésteres etil acetato, isobutil acetato, 2-fenil etil acetato, etilpropanoato, os quais foram detectados no presente estudo. Os COVs produzidos por estas três leveduras foram capazes de inibirem o crescimento de *A. ochraceus*.

Para os aldeídos, o *A. carbonarius* pode ter inibido a produção de acetaldeído em *S. cerevisiae* CCMA 1317; as cepas de *S. cerevisiae* inibiram a produção de propanal por *A. carbonarius*; e, algumas cepas de *S. cerevisiae* (CCMA 1306, CCMA 1313 e CCMA 1317) inibiram a produção de 3-metil 1-butanal por *A. carbonarius* e, sobre o mesmo composto, *S. cerevisiae* (CCMA 1299 e CCMA 1317) inibiu a produção por *A. ochraceus*.

Em relação as cetonas, observou-se que *R. mucilaginosa* inibiu a produção de 2-heptanone e 2-nonanone por *A. carbonarius*. Li et al. (2015), identificaram estas cetonas em

oito linhagens de *Bacillus* para o biocontrole *Fusarium solani*. Os autores indicam que estes compostos voláteis são bioativos e que estudos devem ser dirigidos para determinar os efeitos desses compostos contra patógenos e seus possíveis mecanismos de ação. A biossíntese dessas cetonas ocorre pela descarboxilação de ácidos respectivamente intermediários na β -oxidação de ácidos graxos correlacionando-se, portanto, com a biossíntese dos aldeídos que podem ser formados por reduções enzimáticas de ácidos análogos também intermediários na β -oxidação ou síntese de ácidos graxos (CLAESON, 2006).

Os compostos observados no presente trabalho, em sua maioria correspondem aos comumente encontrados na literatura para fungos e leveduras (KORPI et al., 2009; GRIFFIN et al., 2010). Apesar de apresentarem classes distintas (álcoois, ésteres, cetonas, aldeídos, ácidos, entre outros) e da grande quantidade de rotas metabólicas existentes em um sistema biológico, as descritas aqui como sendo envolvidas na biossíntese dos compostos identificados correspondem a glicólise, ciclo de Krebs e metabolismos dos ácidos graxos que se interconectam e possuem produtos comuns, o que pode explicar a ação de inibição observada em alguns co-cultivos. A biossíntese desses compostos está condicionada à disponibilidade de substratos presentes no meio e moléculas de potencial redutor como o NADH e em situações de co-cultivo há competição por esses recursos e entre as rotas metabólicas favorecendo um ou outro composto. Além dos nutrientes e fases de crescimento, as condições de pH, umidade e temperatura afetam diretamente a produção dos COVs, e todas essas variáveis podem ser alterada por associação com outro microrganismo.

Da quantidade total de compostos voláteis produzidos no presente estudos, *A. carbonarius* CCDCA 10608 produziu 29 compostos voláteis, enquanto *A. ochraceus* CCDCA 10612 produziu 19. As cepas de leveduras *S. cerevisiae* CCMA 0159, CCMA 1299, CCMA 1302, CCMA 1306, CCMA 1313, CCMA 1315 e CCMA 1317 produziram 29, 27, 28, 26, 30, 25 e 29 COVs, respectivamente, e *R. mucilaginosa* CCMA 1305, 25. O co-cultivo entre todas as 7 cepas de *S. cerevisiae* com os dois fungos filamentosos aumentou a produção de COVs, como mostrado na Tabela 1. No presente estudo a maior quantidade de compostos foi observada nos co-cultivos quando comparados aos cultivos individuais, diferente do relatado para co-cultivos de leveduras com bactérias (FREIRE; RAMOS; SCHWAN, 2015).

Tabela 1 - Quantidade de compostos orgânicos voláteis (COVs) identificados por GC/MS.

Amostras	COVs	Amostras	COVs	Amostras	COVs
1	29				
2	19				
3	29	11	33	19	30
4	27	12	34	20	31
5	28	13	32	21	29
6	26	14	33	22	29
7	30	15	33	23	30
8	25	16	31	24	28
9	29	17	32	25	29
10	25	18	25	26	24

Legenda: Cultivos individuais de fungos: (1) *A. carbonarius* CCDCA 10608; (2) *A. ochraceus* CCDCA 10612; Cultivos individuais de leveduras: (3) *S. cerevisiae* CCMA 0159; (4) *S. cerevisiae* CCMA 1299; (5) *S. cerevisiae* CCMA 1302; (6) *S. cerevisiae* CCMA 1306; (7) *S. cerevisiae* CCMA 1313; (8) *S. cerevisiae* CCMA 1315; (9) *S. cerevisiae* CCMA 1317; (10) *R. mucilaginosa* CCMA 1305; Co-cultivo de fungos e leveduras: (11) *A. carbonarius* CCDCA 10608 + *S. cerevisiae* CCMA 0159; (12) *A. carbonarius* CCDCA 10608 + *S. cerevisiae* CCMA 1299; (13) *A. carbonarius* CCDCA 10608 + *S. cerevisiae* CCMA1302; (14) *A. carbonarius* CCDCA 10608 + *S. cerevisiae* CCMA1306; (15) *A. carbonarius* CCDCA 10608 + *S. cerevisiae* CCMA1313; (16) *A. carbonarius* CCDCA 10608 + *S. cerevisiae* CCMA1315; (17) *A. carbonarius* CCDCA 10608 + *S. cerevisiae* CCMA 1317; (18) *A. carbonarius* CCDCA 10608 + *R. mucilaginosa* CCMA 1305; (19) *A. ochraceus* CCDCA 10612 + *S. cerevisiae* CCMA 0159; (20) *A. ochraceus* CCDCA 10612 + *S. cerevisiae* CCMA 1299; (21) *A. ochraceus* CCDCA 10612 + *S. cerevisiae* CCMA1302; (22) *A. ochraceus* CCDCA 10612 + *S. cerevisiae* CCMA1306; (23) *A. ochraceus* CCDCA 10612 + *S. cerevisiae* CCMA1313; (24) *A. ochraceus* CCDCA 10612 + *S. cerevisiae* CCMA1315; (25) *A. ochraceus* CCDCA 10612 + *S. cerevisiae* CCMA 1317; (26) *A. ochraceus* CCDCA 10612 + *R. mucilaginosa* CCMA 1305.

Fonte: Do autor (2019).

Nos últimos anos, tornou-se cada vez mais evidente que os microrganismos podem desempenhar papéis importantes em suas interações (MORATH; HUNG; BENNETT, 2012; SCHMIDT et al., 2015). Muitas cepas de levedura com capacidade de biocontrole podem produzir compostos orgânicos voláteis e, em alguns casos, os voláteis mostraram-se como fatores principais da capacidade antagônica. Por exemplo, Yang et al. (2018) verificaram que os compostos voláteis de *Streptomyces alboflavus* inibe a germinação dos conídios e o crescimento micelial de *A. ochraceus* e Gong et al. (2019) verificaram que os COVs produzidos por *Enterobacter asburiae* foram capazes de inibir o crescimento de *A. flavus* e consequentemente a produção de aflatoxinas demonstrando que COVs também podem ser eficientes no controle de micotoxinas presentes em alimentos.

O biocontrole tornou-se um componente essencial à agricultura e nesse contexto as espécies do gênero *Trichoderma* é bem conhecido por exibir uma excelente capacidade para suprimir doenças e estimular o crescimento e desenvolvimento de plantas (STOPPACHER et al., 2010) e por isso mesmo tem sido amplamente explorado para a prospecção de produtos em todo o mundo. No entanto, as aplicações dos voláteis fúngicos vão além do biocontrole. Estudos têm demonstrado a utilização de COVs fúngicos para o controle de doenças em plantas durante a pós-colheita, que tem sido denominado de micofumigação (LEE et al., 2009; MERCIER; JIMÉNEZ, 2004; STINSON et al., 2003).

Apesar da grande importância ecológica dos COVs fúngicos, grande parte do conhecimento disponível atualmente tem vindo de pesquisas conduzidas para fins práticos na busca de encontrar novos produtos biotecnológicos, caracterizada como bioprospecção. Esses compostos têm sido explorados para obter propriedades desejáveis de sabor de produtos alimentícios e monitoramento da qualidade desses alimentos (BRUNA et al., 2001; KARLSHOJ et al., 2007) ou ainda para monitorar odores indesejados em instalações de compostagem e resíduos biológicos (MULLER et al., 2004).

Estudos recentes têm levado a identificação e ao estudo de novos metabólitos bioativos de interesse e COVs com potencial biocombustível. COVs fúngicos podem ainda ter papel na utilização de fontes de energia de base biológica pela conversão de resíduos vegetais diretamente em diesel (STROBEL et al., 2011). A exemplo de COVs produzidos por várias espécies de *Ascocoryne* constituídos de alcanos, alcenos, álcoois, ésteres, cetonas, ácidos, benzenos e terpenos, moléculas análogas às moléculas alvo de biocombustível (GRIFFIN et al., 2010).

4 CONCLUSÃO

O papel dos COVs produzidos por fungos e leveduras vêm sendo investigados. No presente estudo os COVs produzidos por cepas de leveduras das espécies *S. cerevisiae* e *R. mucilaginosa* foram identificados por GC-MS em cultivos individuais e associados com as duas espécies de fungos filamentosos (*A. carbonarius*, *A. ochraceus*). No total foram detectados 58 COVs produzidos por todos os ensaios e controles estudados sendo a maioria álcoois e ésteres com maior quantidade de produtos sendo observada nos co-cultivos em comparação com os individuais. Mais trabalhos serão realizados para avaliar o papel dos principais compostos voláteis identificados, sozinhos ou em combinação, visando explorar

suas rotas metabólicas e interações a fim de ampliar seu potencial efeito na inibição de patógenos fúngicos espécies e outras aplicações biotecnológicas.

Ao longo das últimas décadas, a bioprospecção em torno de compostos fúngicos têm se concentrado em substâncias de valor alimentício ou medicinal e utilização de enzimas, no entanto, o potencial desses voláteis para biotecnologia ainda não foi completamente explorado e pode servir de base para descobertas de novos produtos e ampliação nas fronteiras do conhecimento científico acerca destes organismos.

REFERÊNCIAS

ATSUMI, S.; HANAI, T.; LIAO, J.C. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. **Nature**, v. 451, n. 7174, p. 86, 2008.

AZEEM, M. et al. A fungal metabolite masks the host plant odor for the pine weevil (*Hylobius abietis*). **Fungal ecology**, v. 13, p. 103-111, 2015.

BAZEMORE, R. et al. Biomedically important pathogenic fungi detection with volatile biomarkers. **Journal of breath research**, v. 6, n. 1, p. 016002, 2012.

BENNETT, J.W. et al. 18 Fungal and bacterial volatile organic compounds: an overview and their role as ecological signaling agents. In: **Fungal associations**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. p. 373-393.

BERENDSEN, R.L. et al. Effects of the mushroom-volatile 1-octen-3-ol on dry bubble disease. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 12, p. 5535-5543, 2013.

BRUCE, A. et al. Identification of volatile organic compounds (VOCs) from bacteria and yeast causing growth inhibition of sapstain fungi. **Holzforschung**, v. 58, n. 2, p. 193-198, 2004.

BRUNA, J.M. et al. The contribution of *Penicillium aurantiogriseum* to the volatile composition and sensory quality of dry fermented sausages. **Meat Science**, v. 59, n. 1, p. 97-107, 2001.

CASALINUOVO, I. et al. Application of electronic noses for disease diagnosis and food spoilage detection. **Sensors**, v. 6, n. 11, p. 1428-1439, 2006.

CHANG, P.K.; HUA, S.S.T.; SARREAL, S.B.L.; LI, R.W. Suppression of aflatoxin biosynthesis in *A. flavus* by 2-phenylethanol is associated with stimulated growth and decreased degradation of branched-chain amino acids. **Toxins**, 7, 3887–3902. 2015.

CHIRON, N.; MICHELOT, D. Odeurs des champignons: chimie et rôle dans les interactions biotiques-une revue. 2005.

CLAESON, A. **Volatile organic compounds from microorganisms**. 2006. Tese de Doutorado. Ph. D. Thesis, Umeå University, Umeå.

CONTARINO, R. et al. Volatile organic compounds (VOCs) produced by biocontrol yeasts. **Food Microbiology**, 82, 70-74. 2019.

DAVIS, T.S. et al. Microbial volatile emissions as insect semiochemicals. **Journal of chemical ecology**, v. 39, n. 7, p. 840-859, 2013.

FIALHO, M.B. et al. Volatile organic compounds produced by *S. cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 26, 925-932. 2010.

FRAATZ, M.A.; ZORN, H. Fungal flavours. In: **Industrial applications**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 249-268.

FREIRE, A.L.; RAMOS, C.L.; SCHWAN, R.F. Microbiological and chemical parameters during cassava based-substrate fermentation using potential starter cultures of lactic acid bacteria and yeast. **Food Research International**, v. 76, p. 787-795, 2015.

GONG, A. et al. Antifungal activity of volatile emitted from *Enterobacter asburiae* Vt-7 against *A. flavus* and aflatoxins in peanuts during storage. **Food Control**, 106, 1-9. 2019.

GRIFFIN, M.A. et al. Volatile organic compound production by organisms in the genus *Ascocoryne* and a re-evaluation of myco-diesel production by NRRL 50072. **Microbiology**, v. 156, n. 12, p. 3814-3829, 2010.

HAZELWOOD, L.A. et al. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *S. cerevisiae* metabolism. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, n. 8, p. 2259-2266, 2008.

HEDDERGOTT, C.; Calvo, A.M.; Latgé, J.P. The volatome of *A. fumigatus*. **Eukaryotic cell**, v. 13, n. 8, p. 1014-1025, 2014.

HERRERO-GARCIA, E. et al. 8-Carbon oxylipins inhibit germination and growth and stimulate aerial conidiation in *A. nidulans*. **Fungal Biology**, v. 115, n. 4-5, p. 393-400, 2011.

HUMPHRIS, S.N.; WHEATLEY, R.E.; BRUCE, A. The effects of specific volatile organic compounds produced by *Trichoderma* spp. on the growth of wood decay basidiomycetes. **Holzforschung**, v. 55, n. 3, p. 233-237, 2001.

HUNG, R.; LEE, S.; BENNET, J.W. Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 8, p. 3395-3405, 2015.

HUSSAIN, A. et al. Differential fluctuation in virulence and VOC profiles among different cultures of entomopathogenic fungi. **Journal of invertebrate pathology**, v. 104, n. 3, p. 166-171, 2010.

JANZANTTI, N.S. **Compostos de voláteis e qualidade de sabor da cachaça**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004.

JUNKER, R.R.; THOLL, D. Volatile organic compound mediated interactions at the plant-microbe interface. **Journal of chemical ecology**, v. 39, n. 7, p. 810-825, 2013.

KAI, M. et al. Bacterial volatiles and their action potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 81, 1001–1012. 2009.

KARLSHOJ, K.; NIELSEN, P.V.; LARSEN, T.O. Prediction of *Penicillium expansum* spoilage and patulin concentration in apples used for apple juice production by electronic nose analysis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 11, p. 4289-4298, 2007.

KORPI, A.; JARNBERG, J.; PASANEN, A.L. Microbial volatile organic compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, 39, 139–193. 2009.

KRAMER, R.; ABRAHAM, W. Volatile sesquiterpenes from fungi: what are they good for? **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 1, p. 15-37, 2012.

LAMBRECHTS, M.G.; PRETORIUS, I.S. Yeast and its importance to wine aroma-a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 21, n. 1, p. 97-129, 2000.

LEE, S. O. et al. Mycofumigation with *Oxyporus latemarginatus* EF069 for control of postharvest apple decay and *Rhizoctonia* root rot on moth orchid. **Journal of applied microbiology**, v. 106, n. 4, p. 1213-1219, 2009.

LEMFACK, M.C. et al. mVOC 2.0: a database of microbial volatiles. **Nucleic acids research**, v. 46, n. D1, p. D1261-D1265, 2017.

MACLEAN, R.C.; GUDELJ, I. Resource competition and social conflict in experimental populations of yeast. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 498, 2006.

MASOUD, W.; POLL, L.; JAKOBSEN, M. Influence of volatile compounds produced by yeasts predominant during processing of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *A. ochraceus*. **Yeast**, 22, 1133-1142. 2005.

MERCIER, J.; JIMÉNEZ, J.I. Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 31, n. 1, p. 1-8, 2004.

MORATH, S.U.; HUNG, R.; BENNETT, J.W. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biology Reviews**, 26, 73–83. 2012.

MULLER, T. et al. (M) VOC and composting facilities Part 1:(M) VOC emissions from municipal biowaste and plant refuse. **Environmental science and pollution research**, v. 11, n. 2, p. 91-97, 2004.

MULLER, A. et al. Volatile profiles of fungi—chemotyping of species and ecological functions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 54, p. 25-33, 2013.

NAZNIN, H.A. et al. Systemic resistance induced by volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting fungi in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e86882, 2014.

PAGANS, E.; FONT, X.; SÁNCHEZ, A. Emission of volatile organic compounds from composting of different solid wastes: abatement by biofiltration. **Journal of hazardous materials**, v. 131, n. 1-3, p. 179-186, 2006.

PAUL, D.; PARK, K. Identification of volatiles produced by *Cladosporium cladosporioides* CL-1, a fungal biocontrol agent that promotes plant growth. **Sensors**, v. 13, n. 10, p. 13969-13977, 2013.

- PARAFATI, L. et al. Performance evaluation of volatile organic compounds by antagonistic yeasts immobilized on hydrogel spheres against gray, green and blue postharvest decays. **Food Microbiology**, 63, 191–198. 2017.
- PIECHULLA, B.; DEGENHARDT, J. The emerging importance of microbial volatile organic compounds. **Plant, cell & environment**, v. 37, n. 4, p. 811-812, 2014.
- PICHERSKY, E.; NOEL, J.P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, v. 311, n. 5762, p. 808-811, 2006.
- RUDE, M.A.; SCHIRMER, A. New microbial fuels: a biotech perspective. **Current opinion in microbiology**, v. 12, n. 3, p. 274-281, 2009.
- SAMAPPITO, S.; BUTKHUP, L. Effect of skin contact treatments on the aroma profile and chemical components of mulberry (*Morus alba* Linn.) wines. **African Journal of Food Science**, v. 4, n. 2, p. 052-061, 2010.
- SCHMIDT, R. et al. Volatile affairs in microbial interactions. **The ISME Journal**, 9, 2329–2335. 2015.
- SOUZA, M.L. et al. Use of wild yeasts as a biocontrol agent against toxigenic fungi and OTA production. **Acta Scientiarum – Agronomy**, 39, 349-358. 2017.
- STINSON, M. et al. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. **Plant Science**, v. 165, n. 4, p. 913-922, 2003.
- STOPPACHER, N. et al. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, n. 2, p. 187-193, 2010.
- STROBEL, G.A. et al. An endophytic/pathogenic *Phoma* sp. from creosote bush producing biologically active volatile compounds having fuel potential. **FEMS microbiology letters**, v. 320, n. 2, p. 87-94, 2011.
- YANG, M. et al. Biofumigation with volatile organic compounds from *Streptomyces alboflavus* TD-1 and pure chemicals to control *A. ochraceus*. **Annals of Applied Biology**, 173, 313-322. 2018.