



NOELLY ALVES LOPES

ATIVIDADE OCRATOXIGÊNICA DE *Aspergillus carbonarius* E *Aspergillus niger* NA PRESENÇA DE DOIS ISOLADOS BACTERIANOS

LAVRAS – MG

2013

NOELLY ALVES LOPES

**ATIVIDADE OCRATOXIGÊNICA DE A *Aspergillus carbonarius* E
Aspergillus niger NA PRESENÇA DE DOIS ISOLADOS BACTERIANOS**

Dissertação 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 Mestre.

Orientador

Dr. Luís Roberto Batista

Coorientadora

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Lopes, Noelly Alves.

Atividade ocratoxigênica de *Aspergillus carbonarius* e
Aspergillus niger na presença de dois isolados bacterianos / Noelly
Alves Lopes. – Lavras: UFLA, 2013.

55 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Luís Roberto Batista.

Bibliografia.

1. Ocratoxina A. 2. Controle biológico. 3. Condições de cultivo.
4. Atividade antagonista. 5. Fungos toxigênicos. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.23

NOELLY ALVES LOPES

**ATIVIDADE OCRATOXIGÊNICA DE A *Aspergillus carbonarius* E
Aspergillus niger NA PRESENÇA DE DOIS ISOLADOS BACTERIANOS**

Dissertação 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 Mestre.

APROVADA em 25 de setembro de 2013.

Dr. Eustáquio Souza Dias UFLA

Dr. Eduardo Alves UFLA

Dra. Sabrina Carvalho Bastos UFLA

Dr. Luís Roberto Batista

Orientador

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista

Coorientadora

LAVRAS – MG

2013

À pessoa que me concede todos os dias a oportunidade de vivenciar o amor incondicional transbordando do seu espírito, minha mãe, Edna, que me orienta, me apoia e discorda de mim sempre que é necessário. Eu a amo, com toda a verdade de que sou capaz de expressar.

À minha irmã, Poliana, que me fortalece pela sua maneira própria de viver seus dias. Pelo seu exemplo, prova de que a vida vai muito além da matéria.

Aos meus avós, Maria de Lourdes e Valdivino, e ao meu Tio, Wagner. Eles que me conhecem e me acompanham com seus olhares zelosos e de amor desde os meus primeiros dias nesta vida.

Aos meus bisavós (in memoriam), Maria Goulart e Agenor. Só Deus conhece a imensidão deste amor. Eu lhes agradeço, e minha saudade viaja além do espaço para abraçá-los a todo instante.

Aos Amigos, presentes ou distantes no tempo e no espaço. Que compõe a extensão da minha família.

A todos que, de alguma forma, contribuem para o meu crescimento.

Às oportunidades concedidas por Deus, para o meu amadurecimento moral e intelectual

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, ao Setor de Microbiologia do Departamento de Biologia e ao Departamento de Ciência dos Alimentos pela oportunidade concedida para a condução dos experimentos relacionados a esta dissertação.

Aos professores Dr. Luís Roberto Batista e Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista, pela orientação, paciência e dedicação ao ensinar.

Aos professores vinculados aos Departamentos de Biologia e de Ciência dos Alimentos, pelos ensinamentos e pela oportunidade da convivência.

Aos professores, funcionários, pesquisadores e estudantes dos demais Departamentos da Universidade Federal de Lavras, com os quais tive a oportunidade de conviver e aprender.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos ao longo do mestrado, propiciando importante experiência e aprendizado no trabalho.

Aos colegas de curso, de laboratório e de todo o ambiente universitário, pelo crescimento em conjunto, pela ajuda e amizade.

À minha família, que compõe meu apoio, minha base e inspiração.

A Deus, pela energia concedida em todos os dias da minha existência.

RESUMO

Aspergillus carbonarius e *A. niger* destacam-se como as maiores fontes de contaminação de ocratoxina A (OTA) em alimentos como frutas secas, vinho e café. Por esse motivo, é muito importante avaliar, além da sua presença nos alimentos, as condições físico-químicas ótimas para seu crescimento e produção. Atualmente, diversas pesquisas têm sido conduzidas com a finalidade de se encontrar microrganismos capazes de exercer efeito antagônico sobre o crescimento de *A. carbonarius* e *A. niger* e a produção da OTA, como alternativa aos fungicidas químicos. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de encontrar a condição físico-química mais favorável à atuação antagônica das bactérias UFLABIO 05.1 e UFLABIO 35.1.1, frente ao crescimento de *A. carbonarius* e *A. niger* e à produção de OTA por estes fungos. Para isso, foi realizado o cocultivo de *A. carbonarius* e de *A. niger* com cada uma das bactérias em diferentes condições de temperatura, pH e atividade de água, utilizando o delineamento composto central rotacional (DCCR) como ferramenta para otimizar as condições de cultivo. Ambos os isolados bacterianos, UFLABIO 05.1 e UFLABIO 35.1.1, foram capazes, em determinadas condições físico-químicas, de inibir o crescimento de *A. carbonarius* e o crescimento de *A. niger*, além de reduzir sua produção de ocratoxina A *in vitro*. O isolado bacteriano UFLABIO 05.1, sob temperatura de 27,5 °C, pH de 5,35 e atividade de água de 0,99, apesar de não interferir no crescimento final de *A. carbonarius*, reduziu em 77,6% a produção de ocratoxina A. Sob as mesmas condições físico-químicas, o isolado UFLABIO 35.1.1, além de reduzir em 86,6% o crescimento final de *A. carbonarius*, levou à produção de ocratoxina A a níveis não quantificáveis. Segundo o delineamento composto central rotacional (DCCR), o pH foi o fator mais significativo sobre a atividade antagônica de UFLABIO 35.1.1 frente ao crescimento de *A. carbonarius*, sendo que os valores mais altos de pH favoreceram sua ação frente ao crescimento do fungo. O isolado bacteriano UFLABIO 05.1, sob a temperatura de 27,5 °C, pH de 5,35 e atividade de água de 0,99, apesar de não interferir no crescimento final de *A. niger*, reduziu em 78,7% a produção de ocratoxina A. Sob as mesmas condições físico-químicas, o isolado UFLABIO 35.1.1, além de reduzir em 89,7% o crescimento final de *A. niger*, reduziu a produção de OTA em 95,5%. Segundo o delineamento composto central rotacional (DCCR), o pH foi o fator mais significativo sobre a atividade antagônica de UFLABIO 35.1.1, frente ao crescimento de *A. niger*, sendo que os valores mais altos de pH favoreceram sua ação frente ao crescimento do fungo. Quanto à produção de ocratoxina A, o mesmo delineamento estatístico demonstrou que a temperatura e o pH foram os fatores mais significativos sobre a atividade antagônica da mesma bactéria, sendo que os valores mais altos de temperatura e pH favorecem sua ação frente à produção de ocratoxina A por *Aspergillus niger*.

Palavras-chave: Ocratoxina A. Controle biológico. Condições de cultivo.

ABSTRACT

Aspergillus carbonarius and *Aspergillus niger* stand out as a major source of contamination of ochratoxin A (OTA) in foods such as dried fruits, wine and coffee. For this reason it is very important to evaluate about their presence in food, the physicochemical conditions optimal for their growth and OTA production. Currently, several researches have been conducted in order to find microorganisms capable of exerting an antagonistic effect on the growth of *A. carbonarius* and *A. niger* and production of the OTA, as alternatives to chemical fungicides. This study aimed to find the physical and chemical condition most favorable to the action of antagonistic bacteria UFLABIO 05.1 and 35.1.1 UFLABIO forward to the growth of *A. carbonarius* and *A. niger* and OTA production by these fungi. For this we performed the co-cultivation of *A. carbonarius* and *A. niger* with each of the bacteria under different conditions of temperature, pH and water activity, using the Design Central Composite Rotational (DCCR) as a tool to optimize growing conditions. Both bacterial isolates, UFLABIO 05.1 and 35.1.1 UFLABIO were able, under certain physicochemical conditions, to inhibit the growth of *A. carbonarius* and growth of *A. niger*, besides reducing its production of ochratoxin A in vitro. The isolate UFLABIO 05.1, under a temperature of 27.5°C, pH of 5.35 and 0.99 water activity, although not interfering with the final growth of *A. carbonarius*, reduced by 77.6% the production of ochratoxin A. Under the same physicochemical conditions, the isolated UFLABIO 35.1.1, in addition to 86.6% reduction in the growth end of *A. carbonarius*, led to the production of ochratoxin A at levels not quantifiable. According the central composite rotational design (DCCR), the pH was the most significant factor on the antagonistic activity of UFLABIO 35.1.1 forward to the growth of *A. carbonarius*, with the highest values of pH favored their action against the growth of the bacterial isolate fungi. The UFLABIO 05.1 bacteria, under the temperature of 27.5 ° C, pH 5.35 and water activity of 0.99, despite not to interfere in the final growth of *A. niger*, decreased 78.7% in the production of ochratoxin A. Under the same physicochemical conditions, the isolated UFLABIO 35.1.1, in addition to 89.7% reduction in the growth end of *A. niger* reduced OTA production by 95.5%. According to the central composite rotational design (DCCR), the pH was the most significant factor on the antagonistic activity of UFLABIO 35.1.1 forward to the growth of *A. niger*, and the highest values of pH favored its action against fungal growth. Regarding the production of ochratoxin A, the same experimental design showed that temperature and pH were the most significant factors on the antagonistic activity of the same bacteria, with the highest values of temperature and pH favor its action against ochratoxin A production by *Aspergillus niger*.

Keywords: Ochratoxin A. Biological control. Crop conditions.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	Uva e derivados: produção e consumo no Brasil	11
2.2	Ocratoxina A: fungos produtores isolados em uva	14
2.3	Fatores físico-químicos e o crescimento de fungos ocratoxigênicos ...	17
2.4	Controle do crescimento de fungos ocratoxigênicos em uvas	19
2.5	Microrganismos com ação antimicrobiana	19
2.6	Fatores ambientais e a ação antiocratoxigênica de bactérias e leveduras	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Isolados microbianos	24
3.2	Meios de cultura	24
3.3	Curva de crescimento dos isolados bacterianos	25
3.4	Delineamento experimental	27
3.5	Cocultivo	28
3.6	Medidas de crescimento	28
3.7	Avaliação da produção de ocratoxina A	28
4	RESULTADO E DISCUSSÃO	31
4.1	Atividade ocratoxigênica e crescimento de <i>Aspergillus carbonarius</i> na presença de dois isolados bacterianos	31
4.2	Atividade ocratoxigênica e crescimento de <i>Aspergillus niger</i> na presença de dois isolados bacterianos	41
5	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

A colonização dos fungos do gênero *Aspergillus* da secção *Nigri*, nas uvas, durante o cultivo, é a principal fonte de ocratoxina A (OTA) em vinhos, sucos de uva e derivados. Por esse motivo, a legislação atual, tanto na Europa quanto no Brasil, define o limite máximo tolerável de OTA nesses produtos em 2 µg/kg.

A. carbonarius e *A. niger* são os principais produtores desta micotoxina em uvas e são considerados fungos oportunistas porque se desenvolvem, principalmente, nas bagas danificadas durante seu amadurecimento. A OTA presente nas uvas é transferida para o vinho durante o processo de vinificação, e um aumento na concentração desse fungo ocorre após a maceração das uvas, devido à sua presença predominante na casca. Durante o envelhecimento do vinho, observa-se que a toxina permanece estável, pois a mesma concentração de OTA é encontrada no vinho após um ano de armazenamento.

A produção de OTA em uvas é influenciada pelas condições climáticas e as áreas geográficas, bem como pela variedade de uva, pelo sistema de cultivo e pelos danos causados nas uvas por insetos, infecção fúngica ou excesso de irrigação e chuva. As medidas para o controle de fungos toxigênicos devem considerar esses pontos críticos de controle. Além disso, esses fungos têm desenvolvido resistência aos fungicidas e, em alguns países, já se determina o limite de resíduos dessas substâncias que podem chegar ao ambiente.

Boas práticas de produção, como, por exemplo, a seleção e a separação dos cachos de uva com desenvolvimento fúngico visível, auxiliam, consideravelmente, na redução dos níveis de contaminação por fungos produtores de OTA, bem como dos níveis dessa micotoxina nos vinhos.

Além disso, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de encontrarem-se microrganismos não patogênicos capazes de controlar

naturalmente a ocorrência e produção de OTA por estes fungos, como alternativa aos fungicidas. Assim como a produção de OTA por *A. niger* e *A. carbonarius* é fortemente influenciada pelos fatores físico-químicos, tais como temperatura, atividade de água e pH, o mesmo ocorre com seus agentes antagonistas.

Portanto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos da temperatura, atividade de água e pH sobre a atividade de biocontrole de dois isolados bacterianos frente a *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus Níger*, avaliando sua atividade antagonista tanto sobre o crescimento dos fungos quanto sobre a produção de ocratoxina A pelos mesmos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Uva e derivados: produção e consumo no Brasil

A produção de uvas no mundo é mais antiga do que muitos imaginam. No livro “Geografia do Vinho” (DOUGHERTY, 2012) encontra-se interessante ilustração a respeito da antiguidade do vinho (Figura 1), evidenciando a presença da uva no Egito, entre 1550-1295 a.C. Além disso, relata-se a existência de recipientes com resíduos de vinho, encontrados na Geórgia, datados de 8 mil anos atrás.



Figura 1 Pintura representando a produção e o consumo de uva e vinho, encontrada no Egito, no túmulo de Nachkt. Esta pintura data de 1550-1295 a.C.

No Brasil, a viticultura é uma das atividades produtivas do setor primário que mais têm ampliado suas áreas de produção e promovido constantes mudanças nas formas e áreas de cultivo. As novas demandas de mercado, aliadas à percepção de oportunidades de geração de emprego e renda via agregação de valor do produto, são um dos grandes incentivadores dessas mudanças (MELLO; GARAGORRY; CHAIB FILHO, 2007).

A partir do ano de 1985, a produção de uvas ampliou-se, no Brasil, para além das regiões sul e sudeste. Naquele ano, a viticultura consolidou-se no Vale

do São Francisco e, na região nordeste, a área colhida com uvas foi de 964 hectares, passando para 4.838 hectares em 1995. Neste período, houve acréscimo de 5,11% da área colhida no Brasil, enquanto, na região nordeste, o acréscimo foi de 402%. Na Figura 2 é possível claramente esta ampliação da viticultura, entre os anos de 1975 e 2003 (MELLO; GARAGORRY; CHAIB FILHO, 2007).

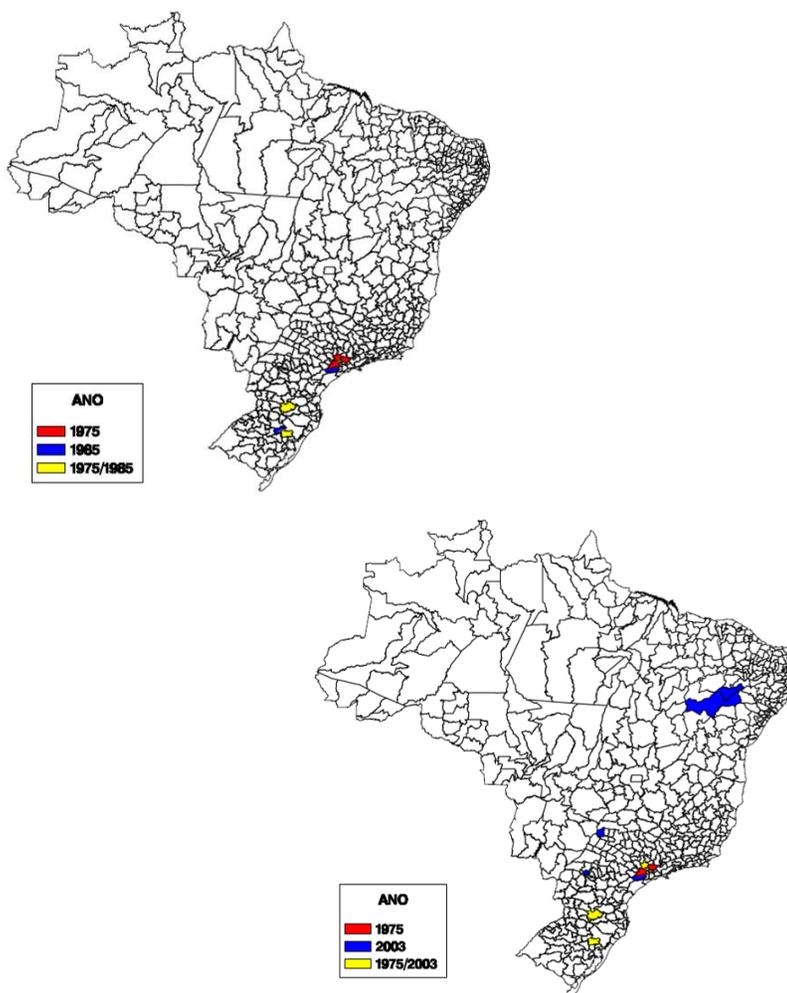


Figura 2 Desenvolvimento de novas áreas de viticultura, entre os anos de 1975 e 2003 (MELLO; GARAGORRY; CHAIB FILHO, 2007, modificado)

Em 2011, a produção de uvas no Brasil teve um aumento de 12,97%, tendo, em Pernambuco, sido observado o maior aumento da produção (24,03%), em decorrência do aumento da área plantada em 2010. Embora ainda não esteja disponível nas estatísticas do IBGE, a viticultura está sendo implantada em vários estados, como Mato Grosso do Sul, Goiás, Espírito Santo, Ceará e Piauí (MELLO, 2012a).

A produção e a destinação da uva apresentam algumas peculiaridades importantes. O produto destinado ao consumo *in natura* (mesa) para o mercado interno é dividido em dois grandes grupos: uva fina e uva rústica (comum); já a uva destinada ao mercado externo é, em sua maioria, fina e sem sementes. Esta fruta é processada para várias finalidades, como produção de suco, de vinhos de mesa, de vinhos finos de mesa e de espumantes. O vinho fino exige, para seu processamento e qualidade, que se utilize a cultivar adequada ao produto final desejado (tinto, branco, seco, frutado, de guarda leve, entre outros), além do controle de maturação das uvas e do limite de sua produtividade (MELLO; GARAGORRY; CHAIB FILHO, 2007).

Estatísticas sobre a produção e a comercialização nacional de vinhos e suco de uvas não estão disponíveis. No entanto, o estado do Rio Grande do Sul, responsável por cerca de 90% da produção nacional desses produtos, tem informações relativas à produção de uvas, vinhos e derivados e à comercialização, cuja análise permite uma boa aproximação do desempenho da agroindústria vinícola do país. Este estado apresentou aumento na comercialização de suco e vinhos no ano de 2011, em relação ao ano anterior. Para os vinhos de mesa, houve aumento de 4,10%, enquanto os vinhos finos sofreram redução de 6,65%. Em 2011, os vinhos espumantes continuaram sua trajetória crescente. Os espumantes moscatéis atingiram aumento de 1,70% e os espumantes, crescimento de 6,26% nas vendas. Os sucos de uva, em 2011, também continuaram com a trajetória crescente. O suco de uva integral

apresentou aumento, na quantidade comercializada, de 28,60% e o concentrado teve um acréscimo de 13,18%, no ano de 2011, em relação ao de 2010 (MELLO, 2012a).

No ranking mundial da área cultivada com videiras, o Brasil ocupa a vigésima colocação. A viticultura ocupa as maiores áreas da Espanha, França, Itália, China e Turquia (MELLO, 2012b).

2.2 Ocratoxina A: fungos produtores isolados em uva

As micotoxinas correspondem a substâncias resultantes do metabolismo secundário de alguns fungos. Uma variedade delas é encontrada nos alimentos e a ocratoxina A (OTA) recebe destaque por ser potencialmente nefrotóxica, imunossupressora, teratogênica e carcinogênica (BLEVE et al., 2005), além de não ser degradada sob processamento de muitos alimentos. Esta micotoxina pode ocorrer em alimentos como uva, café, cacau, pimenta e cereais.

Um dos fungos produtores de OTA, *Aspergillus carbonarius*, está presente em diversos produtos vegetais, como cereais, café, cacau, especiarias, frutos secos, amendoim e uva. A ocratoxina A foi detectada também em bebidas processadas, como cerveja e café. Desde 1996, a OTA também foi detectada em vinho e suco de uva; depois dos cereais, o vinho é considerado a principal fonte de ingestão diária de OTA (BATTILANI et al., 2004).

A descoberta das diversas micotoxinas se deu a partir do desenvolvimento de estudos mais completos a respeito de fungos presentes nos alimentos. Uma das consequências dessas descobertas embasa, por exemplo, a determinação de níveis aceitáveis da OTA em diversos produtos alimentícios (ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2010).

A OTA é composta por uma metade 7-carboxi-5-cloro-hidroxi-3,4-dihidroxi-3-R-metilisocumarina (ocratoxina α) e uma molécula de L- β -

fenilalanina, que estão ligadas, através do grupo 7-carboxi, por uma ligação amida. A via biossintética de OTA não está completamente estabelecida. Entretanto, sabe-se que a isocumarina é um pentacetídeo que deriva da via policetídica e que a L-β-fenilalanina deriva da via do ácido chiquímico. Mais precisamente, estudos experimentais com precursores marcados radioativamente demonstraram que a isocumarina é sintetizada pela condensação de cinco unidades de acetato com a subsequente adição da unidade de metionina no C7, que é subsequentemente oxidada a carboxil. Aparentemente, L-β-fenilalanina é acoplada à metade isocumarina sem ser alterada, uma vez que uma fração da enzima isolada de *A. ochraceus* foi capaz de ligar as duas porções da molécula. Finalmente, a clorina é incorporada ao C5 do NaCl (embora não se saiba em que ponto exato da biossíntese) e, provavelmente, por meio da ação de cloroperoxidasas.

Existe pouca informação sobre os genes responsáveis por estes passos biossintéticos, tendo apenas fragmentos de DNA que codificam para algumas policetídeo sintases de OTA em *P. nordicum*, *A. ochraceus* e *A. carbonarius* sido identificados. A síntese desta micotoxina depende de fatores como temperatura, atividade de água do substrato e micronutrientes, e o meio de cultura que melhor propicia sua produção é o *czapec yeast autolysate* (CYA) (ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2010).

Por tudo isso, esta micotoxina vem sendo considerada um problema mundial de saúde pública. Ela foi originalmente isolada como um metabólito secundário do fungo filamentosso *Aspergillus ochraceus* e, posteriormente, muitas outras espécies de *Aspergillus* (*A. niger*, *A. carbonarius*, *A. sulphureus* e *A. melleus*, entre outros) foram descritas como produtoras de ocratoxina A (LUNARDI et al., 2006).

Estudos relacionados à espécie *Aspergillus carbonarius* são importantes devido à sua habilidade na produção da ocratoxina A, que é bem maior do que a

produção por *A. niger* (PALACIOS-CABRERA et al., 2005). *A. carbonarius* destaca-se como uma das maiores fontes de contaminação de ocratoxina A em alimentos como frutas secas, vinho e café (LUNARDI et al., 2006).

Com relação à sua presença no vinho, Battilani e colaboradores, em 2004, publicaram uma pesquisa cujo objetivo era investigar a presença de *A. carbonarius* e a contaminação por OTA em vinte variedades diferentes de uva, cultivadas em dois vinhedos localizados em Puglia, no sul da Itália. Estes autores observaram diferentes resultados entre as variedades de uva analisadas, demonstrando a importância da pesquisa sobre a presença de *Aspergillus carbonarius* e da OTA nas diversas variedades de uva, com o objetivo de encontrar variedades mais resistentes à produção de toxina pelo fungo e à sua acumulação.

Entretanto, mesmo que sua capacidade de produção de OTA seja inferior à de *Aspergillus carbonarius*, os fungos da espécie *Aspergillus niger* são frequentemente isolados de amostras de uvas e outros alimentos, e por isso merecem atenção. Em um estudo conduzido com uvas chileas (*Vitis vinifera*) foi encontrada uma variedade de fungos ocratoxigênicos desde as etapas de pré-colheita até a produção do vinho. Estirpes produtoras de OTA foram encontradas somente entre os isolados de *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. wenti* e *A. westerdijkiae*, produzindo de 2 a 17 µg/L de OTA em meio líquido. Além disso, foi realizado o processamento do vinho utilizando 0,5%, 1% e 3% de uvas contaminadas com fungos do gênero *Aspergillus* ocratoxigênicos, obtendo-se, respectivamente, vinhos com 3,2; 4,1 e 5,2 µg/L de OTA (níveis acima do permitido pela legislação, de 2 µg/L, em vinhos e sucos de uva) (DÍAZ et al., 2009).

2.3 Fatores físico-químicos e o crescimento de fungos ocratoxigênicos

O crescimento dos microrganismos é, geralmente, influenciado por diversos fatores externos, como a temperatura, o pH, o tempo de incubação e a atividade de água, entre outros. No que diz respeito aos fungos ocratoxigênicos, é necessário observar, ainda, a diferença entre as condições ótimas de crescimento e as condições que proporcionam maior produção da micotoxina. E estes efeitos vêm sendo investigados há alguns anos.

Com o objetivo de avaliar o crescimento e a produção de ocratoxina A por fungos do gênero *Aspergillus* seção *Nigri* sob diferentes temperaturas (5-45 °C), em dois diferentes meios de cultura, *czapek yeast autolysate agar* (CYA) e *yeast extract sucrose agar* (YES), Esteban et al. (2004) realizaram uma pesquisa. Os autores avaliaram também a influência do tempo de incubação, por 30 dias. Foram testados dezoito isolados, selecionados a partir de diferentes fontes e capacidades de produção de OTA. A temperatura foi o fator de maior impacto sobre o crescimento e cada isolado testado diferiu quanto às condições ótimas de produção de OTA. Isolados de *Aspergillus niger* alcançaram níveis máximos de produção de OTA no meio YES, principalmente entre 20-25 °C. Já os isolados de *A. carbonarius* produziram os mais altos níveis de OTA em CYA entre 15-20 °C. Foi observado, também, que quantidades significativas de OTA foram produzidas com apenas cinco dias de incubação (ESTEBAN et al., 2004).

Alguns isolados de *Aspergillus niger* agregado também são conhecidos por seu potencial ocratoxigênico. Alguns desses fungos foram submetidos a diferentes condições de temperatura, atividade de água e tempo de incubação, em amendoim. Para alguns, a temperatura e a atividade de água ótimas para o crescimento foram de 30 °C e 0,995, respectivamente, com taxa de crescimento de 14,6 mm/dia. Entretanto, a produção máxima de ocratoxina A ocorreu a uma atividade de água de 0,973 e 25 °C (ASTORECA et al., 2009).

O crescimento e a produção de OTA por *Aspergillus carbonarius* em diferentes condições de temperatura (15 a 37 °C) e atividade de água (0,90 a 0,99) foram testados. Um total de oito isolados da espécie *A. carbonarius* isolados de uvas viníferas da Tunísia foi avaliado. A atividade de água (A_w) de 0,99 foi considerada ótima tanto para o crescimento do fungo quanto para a produção da OTA. Porém, a temperatura ótima para o crescimento foi de 30 °C, enquanto a produção de OTA foi favorecida a uma faixa de temperatura de 15 a 25 °C (LASRAM et al., 2010).

Observaram-se diferenças nas condições ótimas de crescimento e produção de OTA, quando as mesmas foram testadas em isolados de *Aspergillus carbonarius* de diferentes regiões, neste caso, isolados de uvas da Europa e de Israel (MITCHELL et al., 2004). Essa informação justifica a condução de experimentos semelhantes, mas com isolados das regiões brasileiras, pois os fungos podem apresentar comportamento fisiológico diferenciado. Além disso, é necessário encontrar microrganismos seguros, capazes de inibir o crescimento de *A. carbonarius* e a produção da OTA, a fim de reduzir a utilização de compostos químicos nocivos à saúde humana e ao meio ambiente.

Em grãos de milho, observaram-se o crescimento e a produção de OTA por *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus Níger*, sob diferentes condições, variando a atividade de água (0,92–0,98), a temperatura (5–45 °C) e o tempo de incubação (5-60 dias). O diâmetro das colônias, de ambos, foi significativamente maior sob atividade de água de 0,96 e 0,98. Já a faixa de temperatura ótima para o crescimento foi diferente para as duas espécies, sendo de 25-40 °C, para *Aspergillus niger* e de 20-35 °C, para *Aspergillus carbonarius*. A *niger* produziu ocratoxina A no intervalo de 15 a 40 °C, sendo o nível mais alto a 15 °C, com atividades de água de 0,96 e 0,98, mais favoráveis também à produção de OTA. *A. carbonarius* produziu OTA na faixa de 15 a 35 °C, sendo a maior concentração a 15 °C e a atividade de água de 0,98 a mais favorável. Os isolados

estudados foram capazes de produzir OTA a partir do décimo quinto dia de incubação (ALBORCH et al., 2011), demonstrando a necessidade de se estudar a fisiologia desses microrganismos em condições o mais próximo possível da realidade.

2.4 Controle do crescimento de fungos ocratoxigênicos em uvas

Devido ao aumento do número de espécies fúngicas resistentes a fungicidas químicos e ao impacto destes pesticidas no ambiente e para o ser humano, níveis máximos de resíduos químicos são regulamentados em muitos produtos. Portanto, métodos alternativos são necessários para substituir ou complementar tratamentos com fungicidas e controlar o fungo no campo e na estocagem. Reuniram-se diversas informações a respeito da utilização de leveduras como agentes de biocontrole frente a espécies de *Aspergillus* ocratoxigênicos, e as leveduras epifíticas seriam as mais promissoras nesta atividade em bagas de uva, devido à sua adaptação a esse tipo de substrato (PONSONE et al., 2012).

Nota-se, portanto, o quanto estas pesquisas estão voltadas para leveduras. Consequentemente, muito há para se investigar a respeito do potencial das bactérias.

2.5 Microrganismos com ação antimicrobiana

Há, atualmente, uma diversidade de pesquisas visando descobrir substâncias com efeito inibitório sobre microrganismos patogênicos, substâncias estas que podem ter origem em plantas (óleos essências) ou, até mesmo, serem produzidas por determinados microrganismos.

A conservação de alimentos de origem animal tem sido campo de estudo e de descoberta de bactérias fermentadoras para este fim. As bactérias lácticas, por exemplo, por meio de seus metabólitos, inibem o desenvolvimento de diversos microrganismos indesejáveis e patogênicos nos alimentos e, assim, além de lhes conferir características sensoriais desejáveis, estendem a sua vida útil e melhoram sua qualidade higiênica (PRADO et al., 2000).

Fungos com ação antimicrobiana, testados contra microrganismos patogênicos e fitopatogênicos, foram isolados de plantas tóxicas da Amazônia (*Palicourea longiflora* e *Strychnos cogens*). Sua atividade foi testada a partir de bioensaios com seus metabólitos extracelulares (SOUZA et al., 2004). Em outro trabalho, bactérias isoladas da rizosfera de *Drosera villosa* var. *villosa* e dois isolados de *Bacillus thuringiensis* foram testados quanto à sua capacidade de inibir os fungos fitopatogênicos *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum* sp. Uma das bactérias isoladas do solo conseguiu inibir os quatro fungos e *B. thuringiensis* inibiu o crescimento de três deles (BATISTA JÚNIOR et al., 2002).

Algumas leveduras foram isoladas de plantas epífitas e selecionadas quanto à sua capacidade de biocontrole de *Aspergillus carbonarius* e *A. niger*. Dentre as 144 leveduras isoladas, cinco foram selecionadas pela sua capacidade de biocontrole sobre os fungos *A. carbonarius* e *A. niger*. Estes isolados foram identificados como dois de *Issatchenkia orientalis* e os demais, como *Metschnikowia pulcherrima*, *Issatchenkia terricola* e *Cândida incommunis* (BLEVE et al., 2005). Apesar desta e de diversas descobertas da aplicação de leveduras com potencial para o biocontrole, há também a preocupação com a patogenicidade desses microrganismos, o que inviabiliza a sua utilização em produtos alimentícios. Apenas alguns desses microrganismos encontram-se entre os que podem ser considerados seguros (SUNDH; MELIN, 2010).

Outros estudos estão voltados para a descontaminação. Com relação à OTA, por exemplo, métodos biológicos utilizam microrganismos que podem degradar, transformar ou absorver a OTA para desintoxicar produtos contaminados ou para evitar os efeitos tóxicos, quando a micotoxina é ingerida. Estas técnicas são muito específicas, eficientes, ecologicamente corretas e preservam a qualidade nutritiva do produto. Entretanto, é importante salientar que os microrganismos utilizados para a descontaminação e os produtos formados durante as reações devem ser seguros (não patogênicos) (ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2010).

Também recentemente, após a seleção de uma bactéria do ácido láctico, *Lactobacillus plantarum* sp. TN635, a mesma foi submetida a diversos testes, a fim de se verificar sua atividade antagonista sobre diversos microrganismos patogênicos. A partir de testes realizados com o seu sobrenadante, verificou-se a inibição do crescimento de quatro bactérias gram-negativas (*Salmonella enterica* ATCC43972, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 49189, *Hafnia* sp. e *Serratia* sp.) e de *Cândida tropicalis* R2 CIP203. Além disso, identificou-se a substância antimicrobiana sintetizada pela bactéria *L. plantarum* sp. TN635 como uma substância de natureza proteica. Esta substância foi designada como uma bacteriocina e recebeu a denominação de BacTN635. Submetida a testes, a bacteriocina demonstrou-se estável ao calor e ao tratamento com surfactantes e solventes orgânicos (SMAOUI et al., 2010).

Recentemente, isolados de *Saccharomyces cerevisiae* foram capazes de inibir o crescimento de *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* e de promover uma redução na produção de ocratoxina A por estes fungos. Essa pesquisa teve o objetivo de selecionar estirpes de leveduras viníferas como agentes de biocontrole frente a estes fungos responsáveis pela acumulação de OTA na uva e no vinho. Como resultado, todos os isolados testados demonstraram habilidade em inibir o crescimento de *A. carbonarius* *in vivo* e *in*

vitro. Outro resultado interessante é que a adição de culturas filtradas, livres de células, dessas leveduras, resultou na completa inibição da produção de OTA (CUBAIU et al., 2012).

2.6 Fatores ambientais e a ação antiocratogênica de bactérias e leveduras

É crescente o número de pesquisas a respeito de microrganismos capazes de inibir o crescimento e a produção de micotoxinas por fungos contaminantes de alimentos. Diversas espécies de leveduras e de bactérias vêm sendo descobertas com este potencial. Entretanto, um novo passo deve ser dado para o completo entendimento e a eficiente utilização desses microrganismos. Se os fatores ambientais influenciam o crescimento do fungo e a produção da micotoxina, possivelmente, estes mesmos fatores agem sobre a habilidade de biocontrole destas leveduras e bactérias.

A eficiência de dois isolados de *Kluyveromyces thermotolerans* em evitar o crescimento e a acumulação de ocratoxina A e fungos ocratogênicos, *in vitro* e *in situ*, foi avaliada. Os dados deste estudo mostraram que ambos os isolados da levedura foram capazes de controlar o crescimento de *Aspergillus carbonarius* e de espécies de *Aspergillus niger* agregado, e acumulação de OTA. Os efeitos inibitórios foram dependentes das espécies ocratogênicas, dos isolados de leveduras, da atividade de água e da temperatura avaliadas e suas interações. Em todas as condições avaliadas, a acumulação de OTA foi reduzida de 3% a 100% e a taxa de crescimento reduzida de 11% a 82,5%, dependendo das condições (PONSONE et al., 2011).

Em um trabalho mais recente, avaliou-se a influência da temperatura e da umidade relativa sobre a atividade de três agentes microbianos de biocontrole – *Metschnikowia pulcherrima* LS16, *Aureobasidium pullulans* LS30 e AU34-2 – contra a infecção de bagas de uvas viníferas e acumulação de ocratoxina A por

Aspergillus carbonarius. Além disso, foi testada a infecção de *A. carbonarius* em bagas com a casca danificada (artificialmente) e não danificada, resultando em uma infecção muito maior nas primeiras. As bagas danificadas, pré-tratadas com os agentes de biocontrole, foram inoculadas com *A. carbonarius* e submetidas, por 5 dias, a dois níveis de umidade relativa (60% e 100%) e três diferentes temperaturas (20, 25 e 30 °C). Os três agentes de biocontrole foram capazes de prevenir infecções a 20 °C, com umidade relativa de 60%. Entretanto, nas outras diversas condições, houve muita variação de cada isolado em sua capacidade de inibição do *Aspergillus carbonarius*. Os pesquisadores concluíram que é muito importante conhecer as condições mais favoráveis e desfavoráveis à atividade antagônica desses microrganismos frente ao fungo em estudo (CURTIS et al., 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados microbianos

Os isolados fúngicos utilizados de *Aspergillus carbonarius* CDCA110 e *Aspergillus niger* CDCA101 pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA e foram isolados de uvas viníferas. Os isolados bacterianos utilizados no cocultivo, UFLA BIO 05.1 e UFLA BIO 35.1.1, pertencem à coleção de culturas do Laboratório Fisiologia e Genética de Microrganismos do Departamento de Biologia da UFLA.

3.2 Meios de cultura

A curva de crescimento dos isolados bacterianos foi realizada utilizando-se caldo nutriente (0,5% de peptona bacteriológica, 0,3% de extrato de carne, em água destilada) e ágar nutriente (0,5% de peptona bacteriológica, 0,3% de extrato de carne, 1,5% de ágar, em água destilada).

Para a condução do experimento de cocultivo, foi utilizado um meio de cultura suco de uva. Sua composição detalhada é: 17,5% de suco de uva natural, 0,5% de peptona bacteriológica e 1,5% de ágar, em água destilada. A este meio de cultura foi adicionada glicerina bidestilada, em diferentes quantidades, para a determinação dos diferentes valores de atividade de água (a_w) desejados (Tabela 1).

Tabela 1 Concentração de glicerina bidestilada presente no meio de cultura para o alcance da a_w desejada

Glicerina bidestilada	A_w
0	0,99
15%	0,96
30%	0,93
40%	0,91

O pH do meio à base de suco de uva foi ajustado utilizando-se ácido clorídrico e hidróxido de sódio, e os valores de pH utilizados foram: 3,92; 4,5; 5,35 e 6,78.

3.3 Curva de crescimento dos isolados bacterianos

Com o objetivo de padronizar o inóculo bacteriano a ser utilizado, as curvas de crescimento dos dois isolados foram descritas. Cada isolado bacteriano UFLABIO 05.1 e UFLABIO 35.1.1 foi submetido, igualmente, aos procedimentos descritos a seguir.

Após crescimento em placa de Petri contendo ágar nutriente (0,3 g de extrato de carne, 0,5 g de peptona bacteriológica e 1,5 g de ágar em 100 ml de água destilada), por 24 horas, a 28 °C, uma amostra da bactéria foi transferida para tubos de ensaio contendo 10 ml do meio caldo nutriente estéril (0,3 g de extrato de carne e 0,5 g de peptona bacteriológica em 100 ml de água destilada) e incubada, a 30 °C, por 24 horas para a reativação da bactéria (duplicata). Após o período de incubação, retirou-se uma alíquota de 1.000 μ l (1 ml) do inóculo da amostra que foi transferido para um frasco de erlenmeyer contendo 600 ml do meio caldo nutriente estéril, o qual foi incubado, a 28 °C, sob agitação constante de 150 rpm.

A fim de avaliar o crescimento microbiano no decorrer do tempo, de seis em seis horas, realizaram-se diluições seriadas, adicionando-se 100 µl do inóculo em 900 µl do diluente (água peptonada 0,1%). O número de diluições realizadas em cada avaliação foi dependente da etapa em que a curva de crescimento bacteriano encontrava-se.

Para quantificar o número de células viáveis, realizou-se, a partir das diluições seriadas e nos respectivos tempos, o plaqueamento da amostra, utilizando-se 100 µl de cada diluição, adicionadas em placas de Petri contendo 20 ml do meio ágar nutriente, em triplicata. As placas foram incubadas em BOD, a 28 °C, por 24 horas. A contagem do número de colônias entre 30 e 300, para o cálculo das UFC/ml, foi realizada após o período de incubação.

Ao mesmo tempo em que se quantificava o número de células viáveis, houve a quantificação do número de células totais presentes na amostra, retirando-se 3 ml do inóculo e transferindo-os para uma cubeta de vidro. Procedeu-se à medição da absorbância em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 600 nm. Após a estabilização das medidas de contagem de células e de leituras de absorbância, o procedimento cessou. Nas Tabelas 2 e 3 constam os valores exatos de cada contagem (UFC/ml), ao longo do tempo avaliado. E, a partir da avaliação desses resultados, foi possível selecionar o tempo de 12 horas de incubação para a utilização do inóculo de UFLABIO 05.1 e o tempo de 36 horas para o inóculo de UFLABIO 35.1.1., tendo em vista que, nestes tempos, suas contagens se assemelharam.

Tabela 2 Contagens (UFC/ml) obtidas a cada seis horas de leitura, do isolado UFLABIO 05.1

UFLABIO 05.1				
Tempo(h)	0	6	12	18
UFC/ml	$2,92 \times 10^5$	$1,13 \times 10^7$	$2,87 \times 10^8$	$1,03 \times 10^9$
Tempo(h)	24	30	36	42
UFC/ml	$1,19 \times 10^9$	$3,5 \times 10^9$	$4,6 \times 10^9$	$4,8 \times 10^9$

Tabela 3 Contagens (UFC/ml) obtidas a cada seis horas de leitura, do isolado UFLABIO 35.1.1

UFLABIO 35.1.1				
Tempo(h)	0	6	12	18
UFC/ml	$2,75 \times 10^3$	$1,58 \times 10^6$	$2,44 \times 10^7$	$9,0 \times 10^7$
Tempo(h)	24	30	36	42
UFC/ml	$9,7 \times 10^7$	$9,9 \times 10^7$	$1,07 \times 10^8$	$1,17 \times 10^8$

3.4 Delineamento experimental

O delineamento central composto rotacional (DCCR) foi utilizado como ferramenta para otimizar as condições de cultivo. Os resultados foram analisados por meio de superfície de resposta. Foram estudadas três variáveis em cinco níveis. As variáveis independentes avaliadas foram temperatura (X1), pH (X2) e atividade de água (a_w) (X3). Como variável resposta ou dependente foram determinados o crescimento do fungo (após seis dias de incubação) e a produção de ocratoxina A (após 10 dias de incubação).

As placas foram incubadas sob diferentes condições, em diferentes temperaturas, conforme os ensaios do planejamento experimental. Na Tabela 4 mostram-se as variáveis reais e codificadas, bem como os seus respectivos níveis.

Tabela 4 Variáveis experimentais com valores reais e codificados

Variáveis		-1,68	-1	0	+1	+1,68
Temperatura	X1	6,5	15	27,5	40	48
pH	X2	6,78	6,2	5,35	4,5	3,92
A_w	X3	0,91	0,93	0,96	0,99	1,01

3.5 Cocultivo

Dois isolados bacterianos (UFLABIO 05.1 e UFLABIO 35.1.1) foram cocultivados com os fungos *A. carbonarius* e *A. niger*. Para o cocultivo, utilizou-se uma suspensão de células bacterianas padronizada segundo a curva de crescimento de ambas as bactérias e uma alíquota foi espalhada, com swab, em placa de Petri contendo o meio à base de uva. Foi feita também uma suspensão de esporos de cada isolado fúngico, padronizada a 10^7 esporos/mL, com contagem em câmara de Neubauer.

Pipetaram-se 10 μ L da suspensão de esporos no centro de cada placa, logo após a inoculação com a bactéria. Foi realizado o controle inoculando-se a suspensão de esporos sem o inóculo bacteriano. O experimento foi feito em triplicata. As placas foram incubadas por 10 dias e, em seguida, os diâmetros das colônias foram medidos diariamente, utilizando-se um paquímetro.

3.6 Medidas de crescimento

O diâmetro das colônias fúngicas foi medido diariamente, durante os dez dias de incubação, das três repetições de cada tratamento, utilizando-se paquímetro eletrônico.

3.7 Avaliação da produção de ocratoxina A

A produção de ocratoxina A pelos fungos, em cocultivo e em crescimento isolado, foi quantificada pela técnica de HPLC.

O método de Bragulat, Abarca e Cabañes (2001) foi modificado e utilizado para a extração da ocratoxina A do meio de cultura. O procedimento é descrito a seguir.

- a) três plugs de ágar com o fungo (diâmetro igual a 7 mm) foram removidos em três pontos da colônia (em um ponto central, mediano e na extremidade da colônia), no último dia de incubação. Este procedimento foi realizado em duplicata;
- b) os fragmentos tiveram seus pesos anotados e foram transferidos para tubos de ensaio previamente identificados;
- c) a cada tubo de ensaio contendo os plugs, foi adicionado 1 ml de metanol;
- d) estes tubos foram homogeneizados por 5 segundos e incubados, a 25 °C, por 60 minutos;
- e) os extratos foram filtrados em unidades filtrantes de PTFE (0,22 µm) e, então, analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência HPLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo SPD-M20A, degaseificador modelo DGU 20A₃, interface modelo CBM-20A, injetor automático modelo SIL-10AF e detector de fluorescência RF-10 A_{XL}. A coluna usada foi a Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) conectada a uma pré-coluna Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 4-Pack (4,6 x 12,5 mm, 5 µm).

Foram seguidas as condições cromatográficas de comprimentos de onda: excitação de 332 nm e emissão de 476 nm. O fluxo utilizado em toda a análise foi de 0,8 mL min⁻¹ e o volume injetado das amostras e do padrão foi de 20 µL. A eluição foi realizada em sistema isocrático de 35:35:29:1 (metanol:acetonitrila:água:ácido acético). O tempo de retenção médio obtido para OTA foi de 11±0,1 minutos. A quantificação da OTA nas amostras foi realizada por meio da construção de uma curva analítica obtida por regressão

linear ($y = 1,11756 \times 10^7 x - 2592,1485$, em que y = área do pico e x = concentração de OTA), correlacionando a área do pico *versus* a concentração da respectiva solução padrão, tendo o coeficiente de determinação (r^2) obtido sido de 0,9999. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados por meio dos parâmetros obtidos para a curva analítica construída, sendo calculados pelas respectivas relações matemáticas: $LD = 3DP/m$ e $LQ = 10DP/m$ (em que DP = estimativa do desvio padrão da linha de regressão e m = coeficiente angular da linha de calibração) (HARRIS, 2008). Para estes, foram encontrados os valores de 0,0004 e 0,0016 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, enquanto as soluções padrão de OTA foram injetadas em triplicata.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Atividade ocratoxigênica e crescimento de *Aspergillus carbonarius* na presença de dois isolados bacterianos

O delineamento composto central rotacional (DCCR), utilizado com o objetivo de avaliar o efeito das condições de cultivo (temperatura, pH e a_w) sobre o crescimento de *A. carbonarius* (após seis dias de incubação) e produção de ocratoxina A (após dez dias de incubação), na ausência e na presença de bactérias, está representado na Tabela 5.

Tabela 5 Matriz do delineamento e respostas de crescimento (diâmetro da colônia, em milímetros) de *A. carbonarius* na ausência das bactérias (C_1), em cocultivo com a bactéria UFLABIO 05.1 (C_2) e em cocultivo com a bactéria UFLABIO 35.1.1 (C_3) e respostas de produção de OTA (em $\mu\text{g/g}$) por *Aspergillus carbonarius* na ausência das bactérias (OTA_1), em cocultivo com a bactéria UFLABIO 05.1 (OTA_2) e em cocultivo com a bactéria UFLABIO 35.1.1 (OTA_3)

ENSAIOS	C_1	C_2	C_3	OTA_1	OTA_2	OTA_3
1 ($a_w=0,99$ pH=5,35 T°C=27,5)	88,33	57,67	6,67	12,62	2,82	<LQ
2 ($a_w=0,96$ pH=5,35 T°C=27,5)	89,67	79,33	18	0,32	0,44	0,14
3 ($a_w=0,96$ pH=5,35 T°C=27,5)	89,67	89,33	15,33	0,18	0,30	0,24
4 ($a_w=0,96$ pH=5,35 T°C=27,5)	90	89	16,67	0,36	0,36	0,14
5 ($a_w=0,96$ pH=6,78 T°C=27,5)	90	83,33	17,33	0,56	0,65	0,32
6 ($a_w=0,96$ pH=3,92 T°C=27,5)	73,33	90	72	0,18	0,09	1,1
7 ($a_w=0,91$ pH=5,35 T°C=27,5)	7,33	0	0	0,01	<LQ	<LQ
8 ($a_w=0,93$ pH=6,2 T°C=15)	12	0	0	0,007	<LQ	<LQ
9 ($a_w=0,93$ pH=4,5 T°C=15)	8,33	0	0	0,02	<LQ	<LQ
10 ($a_w=0,99$ pH=6,2 T°C=15)	30,33	11,33	14,67	0,32	0,01	0,01
11 ($a_w=0,99$ pH=4,5 T°C=15)	22	14	28	13,29	0,27	4,21
12 ($a_w=0,99$ pH=4,5 T°C=40)	8	0	0	0,08	<LQ	<LQ
13 ($a_w=0,99$ pH=6,2 T°C=40)	8	0	0	0,003	<LQ	<LQ
14 ($a_w=0,93$ pH=4,5 T°C=40)	7,67	0	0	0,008	<LQ	<LQ
15 ($a_w=0,93$ pH=6,2 T°C=40)	7,33	0	0	0,004	<LQ	<LQ
16 ($a_w=0,96$ pH=5,35 T°C=6,5)	0	0	0	<LQ	<LQ	<LQ
17 ($a_w=0,96$ pH=5,35 T°C=48)	0	0	0	<LQ	<LQ	<LQ

Por meio dos resultados experimentais obtidos, foi possível determinar os coeficientes de regressão e ajustar um modelo quadrático que relaciona o crescimento de *A. carbonarius* com os parâmetros estudados. Para todos os casos, um modelo quadrático foi o que melhor descreveu a relação entre as condições de cultivo e a variável resposta. Na Tabela 6 mostram-se os modelos

obtidos e os coeficientes de determinação (R^2) para a variável resposta crescimento.

Tabela 6 Modelos preditos para o crescimento de *A. carbonarius* na ausência das bactérias (C_1), em cocultivo com UFLABIO 05.1 (C_2) e em cocultivo com UFLABIO 35.1.1 (C_3)

Tratamentos	Modelo predito	R^2
C_1	$C_1 = -206,92 + 59,05T + 16,18pH + 206,81a_w - 10,03T.pH - 25,65T.a_w + 4,46pH.a_w - 298,95T^2 - 62,84pH^2 - 206,13a_w^2$	0,945
C_2	$C_2 = -5,8 + 1,21T + 0,3pH + 5,84a_w + 0,05T.pH - 0,5T.a_w - 0,05pH.a_w - 6,75T^2 - 0,86pH^2 - 5,82a_w^2$	0,930
C_3	$C_3 = -12,46 + 8,66T - 2,75pH + 12,65a_w + 2,49T.pH - 7,97T.a_w - 2,49pH.a_w - 13,75T^2 + 15,12pH^2 - 12,11a_w^2$	0,737

A partir destes modelos quadráticos foram construídas as curvas de contorno para a visualização das condições que mais favorecem o crescimento de *A. carbonarius*, além da determinação das condições que favorecem a atividade antagônica das bactérias testadas.

O diagrama de Pareto constante na Figura 3A foi utilizado para avaliar a significância e o tipo dos efeitos (sinérgico ou antagônico) sobre o crescimento de *A. carbonarius* na ausência das bactérias, ou seja, no tratamento controle. De acordo com o diagrama referido, os efeitos de todas as variáveis, e também de suas interações, foram significativos ($p > 0,05$) sobre o crescimento de *A. carbonarius*. Segundo o digrama de Pareto (Figura 3A), o maior crescimento de *A. carbonarius*, provavelmente, se dá em níveis superiores de a_w e de pH e em menores temperaturas avaliadas. Segundo as informações apresentadas nas

curvas de contorno (Figura 3A), o crescimento máximo de *A. carbonarius* na ausência das bactérias está entre 82-87 mm e, para se obter esse maior crescimento, é necessário que a temperatura esteja entre 15 e 40 °C, associada a uma a_w entre 0,94 e 0,99. Nestas condições ótimas, em uma ampla faixa de pH (4,5 e 6,5), observou-se o crescimento máximo.

A presença da bactéria UFLABIO 05.1 fez com que apenas a variação da a_w tivesse efeito significativo sobre o crescimento de *A. carbonarius* (Figura 3B). A curva de contorno que ilustra a interação entre a temperatura e a a_w demonstra que a temperatura foi a variável que mais influenciou no efeito da a_w sobre o crescimento fúngico, reduzindo seu diâmetro máximo a 74 mm, em condições ajustadas entre 20 e 35 °C, se a_w estiver entre 0,94 e 0,98. Ainda na Figura 3B, observando-se a curva de contorno que descreve a interação entre o pH e a temperatura, nota-se o diâmetro máximo reduzido do fungo (49,7 mm) em condições de 15 e 30 °C, quando o pH encontra-se ajustado em 4. Ao contrário do efeito de interação entre pH e a_w , em que o fungo alcançou valores máximos de crescimento superiores (81 mm) em ampla faixa de pH (4,5-6) quando a_w encontra-se ajustada entre 0,95 e 0,97. Embora estas interações não tenham sido consideradas significativas, segundo o diagrama de Pareto da Figura 3B.

De modo diverso, na presença da bactéria UFLABIO 35.1.1, todos os fatores tiveram, de forma isolada, efeito significativo sobre o crescimento de *A. carbonarius* e somente a interação entre temperatura e a_w teve efeito significativo (Figura 3C). O crescimento máximo de *A. carbonarius* em cocultivo com UFLABIO 35.1.1 foi ainda mais reduzido, atingindo apenas 13,4 mm, estando limitado a valores de temperatura entre 15 e 35 °C, a_w entre 0,94 e 0,99 e ampla faixa de pH (4,5-6).

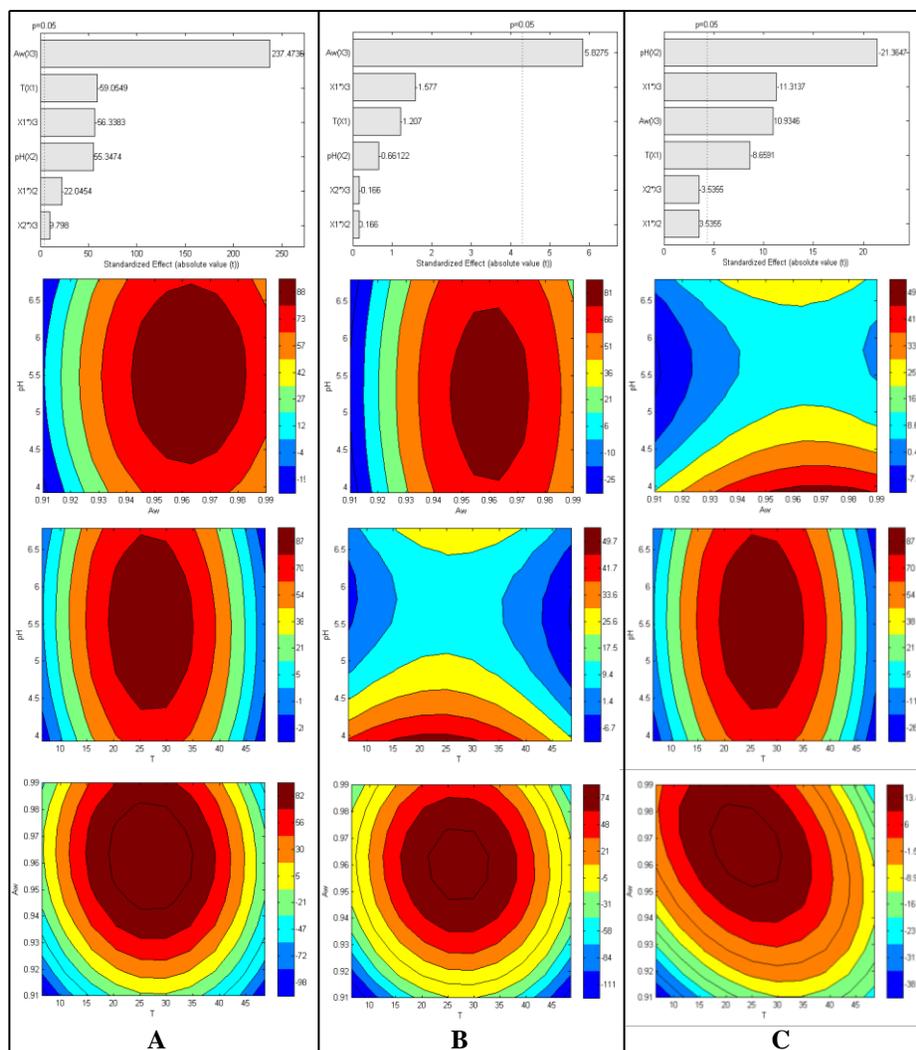


Figura 3 Diagrama de Pareto e curvas de contorno com os efeitos da temperatura (X1), pH (X2), atividade de água (X3) e de suas interações sobre o crescimento de *A. carbonarius* na ausência das bactérias (A), na presença de UFLABIO 05.1 (B) e na presença de UFLABIO 35.1.1 (C)

A porcentagem de variância explicada (R^2) pelos modelos foi satisfatória, entretanto, apenas para as respostas do crescimento de *A. carbonarius*. Para as respostas de produção de OTA, a variância explicada (R^2)

no DCCR alcançou valores inferiores a 0,7, demonstrando que este modelo não explica a variação na produção de OTA por *A. carbonarius*, nas condições estudadas. Portanto, para avaliar esta variável resposta, foi realizado o delineamento central composto (DCC), com a retirada dos pontos axiais. Na Tabela 7 mostram-se as variáveis reais e codificadas, bem como os seus respectivos níveis.

Tabela 7 Variáveis experimentais com valores reais e codificados

Variáveis		-1	0	+1
Temperatura	X1	15	27,5	40
pH	X2	6,2	5,35	4,5
A _w	X3	0,93	0,96	0,99

A matriz do delineamento com os ensaios e as repostas da variável produção de OTA é apresentada na Tabela 8.

Tabela 8 Matriz do delineamento e respostas de produção de OTA (em µg/g) por *Aspergillus carbonarius* na ausência das bactérias (OTA₁), em cocultivo com a bactéria UFLABIO 05.1 (OTA₂) e em cocultivo com a bactéria UFLABIO 35.1.1 (OTA₃)

ENSAIOS	OTA ₁	OTA ₂	OTA ₃
1 (a_w=0,96 pH=5,35 T°C=27,5)	0,32	0,44	0,14
2 (a_w=0,96 pH=5,35 T°C=27,5)	0,18	0,30	0,24
3 (a_w=0,96 pH=5,35 T°C=27,5)	0,36	0,36	0,14
4 (a_w=0,93 pH=6,2 T°C=15)	0,007	<LQ	<LQ
5 (a_w=0,93 pH=4,5 T°C=15)	0,02	<LQ	<LQ
6 (a_w=0,99 pH=6,2 T°C=15)	0,32	0,01	0,01
7 (a_w=0,99 pH=4,5 T°C=15)	13,29	0,27	4,21
8 (a_w=0,99 pH=4,5 T°C=40)	0,08	<LQ	<LQ
9 (a_w=0,99 pH=6,2 T°C=40)	0,003	<LQ	<LQ
10 (a_w=0,93 pH=4,5 T°C=40)	0,008	<LQ	<LQ
11 (a_w=0,93 pH=6,2 T°C=40)	0,004	<LQ	<LQ

Por meio dos resultados experimentais obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão e ajustar um modelo de interação que relaciona a produção de OTA por *A. carbonarius* com os parâmetros estudados. Para o tratamento controle e para o cocultivo de *A. carbonarius* com UFLABIO 35.1.1, o modelo de interação foi o que melhor descreveu a relação entre as condições de cultivo e a produção de OTA. No entanto, nenhum modelo conseguiu correlacionar a variação dos parâmetros avaliados (temperatura, pH e a_w) com a produção de OTA por *A. carbonarius* em cocultivo com UFLABIO 05.1. Na Tabela 9 mostram-se os modelos obtidos e os coeficientes de determinação (R²), para a variável resposta produção de OTA.

Tabela 9 Modelos preditos para a produção de OTA por *A. carbonarius* na ausência das bactérias (OTA₁), em cocultivo com UFLABIO 05.1 (OTA₂) e em cocultivo com UFLABIO 35.1.1 (OTA₃)

Tratamentos	Modelo predito	R ²
OTA ₁	OTA ₁ = -8,74 +5,27T +5,96pH 9,46a _w +6,55T.pH - 6,88T. a _w -6,63pH.a _w	0,808
OTA ₃	OTA ₃ = -4,28 -2,51T +2,95pH +4,64a _w +3,29T.pH - 3,31T.a _w -3,29pH.a _w	0,714

Segundo o diagrama de Pareto (Figura 4A), os efeitos de todas as variáveis e de suas interações foram significativos sobre a produção de OTA por *A. carbonarius* na ausência das bactérias (tratamento controle), sendo que a_w, cujo efeito foi positivo, teve maior influência. A produção máxima de OTA nesta condição variou entre 4,8 e 8,0 µg/g. Segundo, ainda, as curvas de contorno, este fungo deve produzir essa quantidade máxima de OTA quando a temperatura encontrar-se ajustada em 15 °C e com a_w de 0,99 e pH igual a 4,5, na ausência das bactérias.

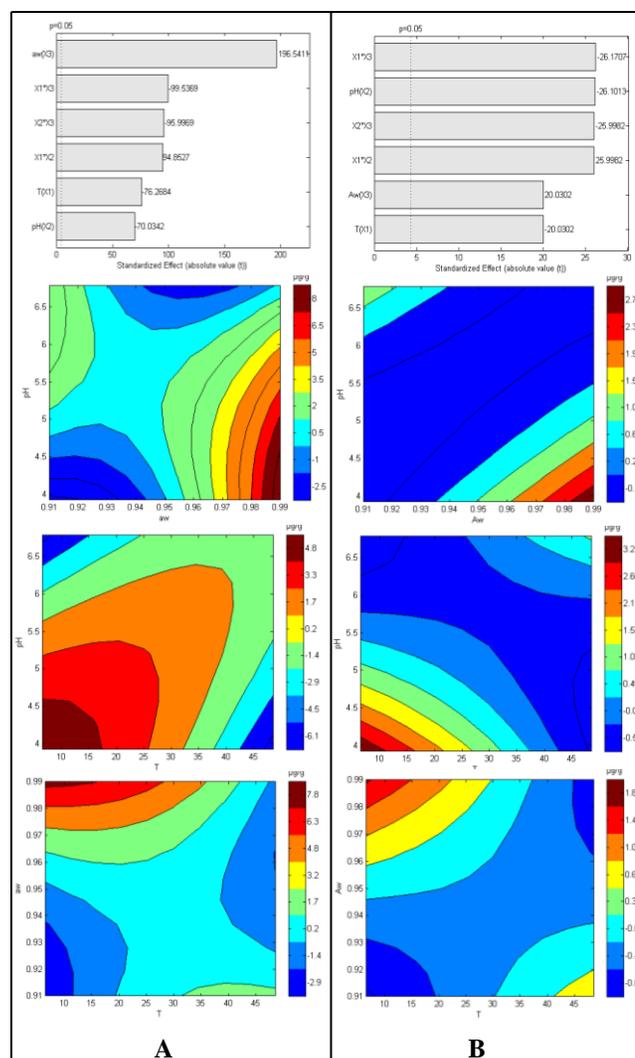


Figura 4 Diagrama de Pareto e curvas de contorno com os efeitos da temperatura ($X1$), pH ($X2$), a_w ($X3$) e de suas interações sobre a produção de OTA por *A. carbonarius* na ausência das bactérias (A) e na presença de UFLABIO 35.1.1 (B)

Em cocultivo com a bactéria UFLABIO 35.1.1, os efeitos de todas as variáveis e de suas interações sobre a produção de OTA por *A. carbonarius* continuaram significativos, embora com menos intensidade (Figura 4B). A

produção máxima de OTA variou de 1,88 a 3,2 µg/g, ou seja, muito menor em comparação com o controle, embora as condições ótimas para isso tenham sido mantidas (temperatura de 15 °C, aw de 0,99 e pH igual a 4,5), de acordo com as curvas de contorno apresentadas.

As pesquisas avaliando potenciais agentes de biocontrole frente a *Aspergillus carbonarius* e outros fungos ocratoxigênicos são frequentemente voltadas para a avaliação de leveduras. Outro ponto importante é que grande parte destes estudos avalia apenas o efeito da temperatura, a atividade de água e o tempo de incubação, desconsiderando o possível efeito do pH.

Dois isolados de *Kluyveromyces thermotolerans* foram avaliados em sua capacidade de evitar o crescimento e a acumulação de ocratoxina A de fungos ocratoxigênicos, *in vitro* e *in situ*. Ambos os isolados da levedura foram capazes de controlar o crescimento de *Aspergillus carbonarius* e espécies de *Aspergillus niger* agregado, e acumulação de OTA. Além disso, os efeitos inibitórios foram dependentes das espécies ocratoxigênicas, dos isolados de leveduras, da atividade de água e da temperatura avaliadas e suas interações. Em todas as condições avaliadas, a acumulação de OTA foi reduzida de 3% a 100% e a taxa de crescimento reduzida de 11% a 82,5%, dependendo das condições (PONSONE et al., 2011). No presente trabalho, a capacidade de inibição do crescimento de *Aspergillus carbonarius* também variou entre os dois isolados bacterianos.

Em um trabalho mais recente, avaliou-se a influência da temperatura e da umidade relativa sobre a atividade de três agentes microbianos de biocontrole – *Metschnikowia pulcherrima* LS16, *Aureobasidium pullulans* LS30 e AU34-2 – contra a infecção de bagas de uvas viníferas e acumulação de ocratoxina A por *Aspergillus carbonarius*. Além disso, foi testada a infecção de *A. carbonarius* em bagas com a casca danificada (artificialmente) e não danificada, resultando em uma infecção muito maior nas primeiras. As bagas então danificadas, pré-

tratadas com os agentes de biocontrole, foram inoculadas com *A. carbonarius* e submetidas, por 5 dias, a dois níveis de umidade relativa (60% e 100%) e três diferentes temperaturas (20, 25 e 30 °C). Os três agentes de biocontrole foram capazes de prevenir infecções a 20 °C, com umidade relativa de 60%. Entretanto, nas outras diversas condições, houve muita variação de cada isolado em sua capacidade de inibição do *Aspergillus carbonarius*. Os pesquisadores concluíram que é muito importante conhecer as condições mais favoráveis e desfavoráveis à atividade antagonista desses microrganismos frente ao fungo em estudo (CURTIS et al., 2012).

4.2 Atividade ocratoxigênica e crescimento de *Aspergillus niger* na presença de dois isolados bacterianos

O delineamento composto central rotacional (DCCR) foi utilizado com o objetivo de avaliar o efeito da variação das condições de cultivo (temperatura, pH e a_w) sobre o crescimento de *A. niger* e produção de ocratoxina A (OTA), na ausência e na presença de bactérias. Na Tabela 5 apresentam-se a matriz do delineamento e as respostas obtidas (crescimento da colônia após os dez dias de incubação e produção de OTA, em $\mu\text{g/g}$ por *A. niger*) na ausência e na presença das bactérias UFLABIO 05.1 e UFLABIO 35.1.1.

Tabela 5 Matriz do delineamento e respostas de crescimento (diâmetro da colônia, em milímetros) de *Aspergillus niger* na ausência das bactérias (C₁), em cocultivo com a bactéria UFLABIO 05.1 (C₂) e em cocultivo com a bactéria UFLABIO 35.1.1 (C₃) e respostas de produção de OTA (em µg/g) por *Aspergillus niger* na ausência das bactérias (OTA₁), em cocultivo com a bactéria UFLABIO 05.1 (OTA₂) e em cocultivo com a bactéria UFLABIO 35.1.1 (OTA₃)

ENSAIOS	C ₁	C ₂	C ₃	OTA ₁	OTA ₂	OTA ₃
1 (a _w =0,99 pH=5,35 T°C=27,5)	87	75,7	8,33	12,6	2,68	0,56
2 (a _w =0,96 pH=5,35 T°C=27,5)	90	89,7	32,7	4,39	3,11	0,16
3 (a _w =0,96 pH=5,35 T°C=27,5)	89	84	26,7	5,0	4,06	0,66
4 (a _w =0,96 pH=5,35 T°C=27,5)	89,3	84,3	26,7	4,57	3,48	0,12
5 (a _w =0,96 pH=6,78 T°C=27,5)	90	81	31	3,42	2,91	0,18
6 (a _w =0,96 pH=3,92 T°C=27,5)	75,3	90	89,7	0,55	2,64	1,18
7 (a _w =0,91 pH=5,35 T°C=27,5)	7,67	0	0	0,002	<LQ	<LQ
8 (a _w =0,93 pH=6,2 T°C=15)	8,33	0	0	0,008	<LQ	<LQ
9 (a _w =0,93 pH=4,5 T°C=15)	8,67	0	0	0,007	<LQ	<LQ
10 (a _w =0,99 pH=6,2 T°C=15)	19,7	16,3	10	18,2	0,006	0,02
11 (a _w =0,99 pH=4,5 T°C=15)	18,7	12,3	24	8,1	5,8	6,6
12 (a _w =0,99 pH=4,5 T°C=40)	16,7	33,3	22,3	0,03	0,04	0,02
13 (a _w =0,99 pH=6,2 T°C=40)	17,33	32	0	0,04	0,03	0,02
14 (a _w =0,93 pH=4,5 T°C=40)	7	0	6	0,01	<LQ	0,01
15 (a _w =0,93 pH=6,2 T°C=40)	8	0	0	0,007	<LQ	<LQ
16 (a _w =0,96 pH=5,35 T°C=6,5)	0	0	0	<LQ	<LQ	<LQ
17 (a _w =0,96 pH=5,35 T°C=48)	0	0	0	<LQ	<LQ	<LQ

Por meio dos resultados experimentais obtidos, foi possível determinar os coeficientes de regressão e ajustar um modelo quadrático que relaciona o crescimento e a produção de OTA por *A. niger* com os parâmetros estudados. Para todos os casos, um modelo quadrático foi o que melhor descreveu a relação entre as condições de cultivo e as variáveis resposta. Na Tabela 6 mostram-se os

modelos obtidos e os coeficientes de determinação (R^2) para a variável resposta crescimento.

Tabela 6 Modelos preditos para o crescimento de *A. niger* na ausência das bactérias (C_1), em cocultivo com UFLABIO 05.1 (C_2) e em cocultivo com UFLABIO 35.1.1 (C_3)

Tratamentos	Modelo predito	R^2
C_1	$C_1 = -1,12 + 19,52T + 41,81pH + 1,12a_w + 9,25T.pH + 203,09T.a_w + 40,85pH.a_w - 1,97T^2 - 257,32pH^2 - 1,13a_w^2$	0,968
C_2	$C_2 = -148,63 + 5,05T + 13,47pH + 149,05a_w - 7,18T.pH + 21,46T.a_w - 4,48pH.a_w - 220,92T^2 - 28,99pH^2 - 148,59a_w^2$	0,948
C_3	$C_3 = -3,27 + 0,79T + 0,66pH + 3,22a_w - 0,9T.pH - 0,2T.a_w - 1,64pH.a_w - 3,88T^2 + 2,86pH^2 - 3,05a_w^2$	0,874

A porcentagem de variância explicada (R^2) pelos modelos foi satisfatória para todas as respostas do estudo. A partir desses modelos quadráticos, foram construídas as curvas de contorno para a visualização das condições que mais favorecem o crescimento de *A. niger*, além da determinação das condições que favorecem a atividade antagonista das bactérias testadas.

A. niger, cultivado isoladamente (tratamento controle), sofreu efeito significativo apenas da a_w e do pH sobre o seu crescimento (Figura 5A). De acordo com a curva de contorno, que relaciona as melhores condições de temperatura e a_w para o seu crescimento, o diâmetro máximo alcançado pelo fungo varia entre 81 e 87 mm, quando a_w é ajustada entre 0,94 e 0,99 e a temperatura está entre 20 e 35 °C.

O efeito da variação destes parâmetros (temperatura, pH e a_w) frente ao cocultivo de *A. niger* com a bactéria UFLABIO 05.1 também foi avaliado e está resumido no diagrama de Pareto da Figura 5B.

De acordo com os dados da Figura 5B, apenas a_w teve efeito significativo sobre o crescimento de *A. niger*. Apesar de as condições ótimas para seu crescimento terem sido mantidas (a_w entre 0,94 e 0,99 e temperatura entre 20 e 35 °C), o seu crescimento máximo (76 mm) foi menor em relação ao controle (Figura 5A). Na presença da bactéria UFLABIO 35.1.1, porém, o efeito do pH, além da a_w , passou a ser significativo sobre o crescimento do fungo (Figura 5C). Nesta situação, porém, o crescimento máximo de *A. niger* foi de apenas 66,5 mm, favorecido por baixos valores de pH (entre 3,92 e 4) e altos valores de a_w (entre 0,95 e 0,99).

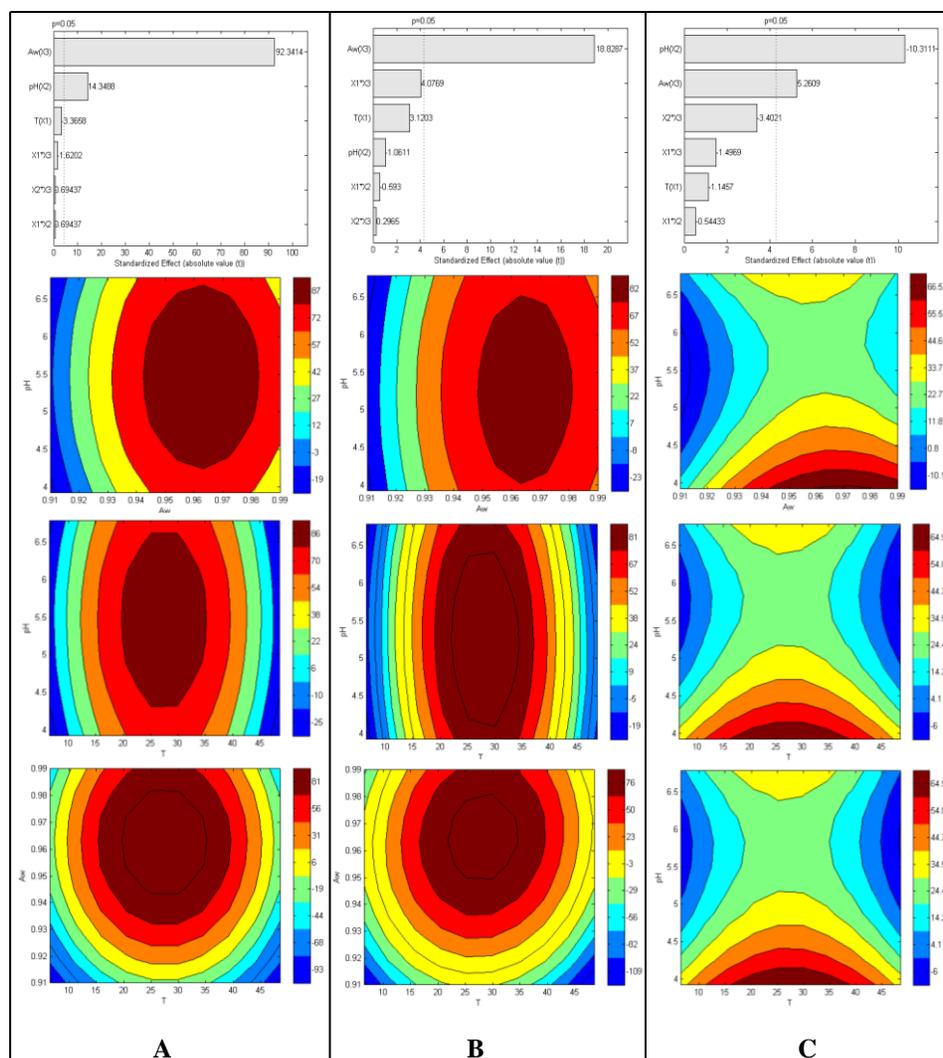


Figura 5 Diagrama de Pareto e curvas de contorno com os efeitos da temperatura (X1), pH (X2), atividade de água (X3) e de suas interações sobre o crescimento de *A. niger* na ausência das bactérias (A), na presença de UFLABIO 05.1 (B) e na presença de UFLABIO 35.1.1 (C)

Na Tabela 7 apresentam-se os mesmos dados para a variável resposta produção de OTA.

Tabela 7 Modelos preditos para a produção de OTA por *A. niger* na ausência das bactérias (OTA₁), em cocultivo com UFLABIO 05.1 (OTA₂) e em cocultivo com UFLABIO 35.1.1 (OTA₃)

Tratamentos	Modelo predito	R ²
OTA ₁	OTA ₁ = 4,3 +22,85T -4,31pH -5,06a _w -7,99T.pH -20,69T.a _w +8,01pH.a _w -13,85T ² -8,41pH ² +5,36a _w ²	0,824
OTA ₂	OTA ₂ = -5,51 +3,28T +3,37pH +5,14a _w +3,28T.pH -3,26T.a _w -3,26pH.a _w -7,24T ² -1,78pH ² -4,69a _w ²	0,769
OTA ₃	OTA ₃ = 26,04+74,43T +71,56pH -37,14a _w +97,37T.pH -97,91T.a _w -97,4pH.a _w +5,73T ² +40,76pH ² +50,92a _w ²	0,772

A porcentagem de variância explicada (R²) pelos modelos foi satisfatória para todas as respostas do estudo. A partir desses modelos quadráticos, foram construídas as curvas de contorno para a visualização das condições que mais favorecem a produção de OTA por *A. niger*, além da determinação das condições que favorecem a atividade antagonista das bactérias testadas.

Quanto à produção de OTA por *A. niger* na ausência das bactérias (tratamento controle), a_w foi a variável de efeito mais significativo, sendo o mesmo positivo. O diagrama de Pareto (Figura 6A) evidencia também que o efeito de todas as outras variáveis e de suas interações foi significativo sobre a produção de OTA. A_w apresentou, ainda, efeito de interação antagonista com a temperatura e sinérgico com o pH; portanto, os maiores níveis de produção de OTA possivelmente ocorrem em níveis mais altos de a_w e pH, e em menores temperaturas. Segundo as curvas de contorno, os níveis mais altos de OTA (10,3 µg/g) são produzidos por *A. niger* quando a_w se encontra ajustada em 0,99 e o pH entre 5,5 e 6,5. Os picos de produção de OTA por *A. niger* também tendem a

ocorrer quando a temperatura encontra-se entre 10 e 25 °C e a_w entre 0,98 e 0,99, ou nesta mesma faixa de temperatura, com pH ajustado entre 6 e 6,5.

Em cocultivo com a bactéria UFLABIO 05.1, apenas a variável a_w e a interação entre a temperatura e o pH apresentaram efeito significativo sobre a produção de OTA por *A. niger* (Figura 6B). O efeito da variável a_w sobre a produção de OTA foi considerado positivo, assim como o efeito da interação da temperatura com o pH, segundo o diagrama de Pareto da Figura 6A. Portanto, é possível que, na presença desta bactéria, *A. niger* produza altos níveis de OTA quando o pH e a temperatura são reduzidos e a_w é elevada. Conforme a Figura 6A, a produção máxima de OTA na presença de UFLABIO 05.1 tende a ser bem menor (3.41 µg/g) do que na sua ausência e encontra condições ótimas em um intervalo de temperatura entre 10 e 30 °C, com pH ajustado entre 5,5 e 4. É importante notar também que, na presença desta bactéria, os níveis mais altos de OTA tendem a ser produzidos em níveis de pH mais baixos, ao contrário do tratamento controle.

De forma diversa à situação anterior, na presença da bactéria UFLABIO 35.1.1, os efeitos de todas as variáveis e de suas interações foram fortemente significativos sobre a produção de OTA por *A. niger* (Figura 6C). Isoladamente, a variável cujo efeito foi mais significativo foi o pH, mas a interação entre temperatura e a_w teve efeito mais significativo. Considerando que os efeitos do pH e de sua interação com a_w foram negativos, supõe-se que a redução do pH e o aumento da a_w resultam em níveis mais altos de OTA. Observando-se a Figura 13b, esta tendência é confirmada e a produção máxima de OTA (4,08 µg/g), embora bem mais reduzida do que o controle, tende a ocorrer quando o pH é ajustado em 4 e a a_w encontra-se entre 0,98 e 0,99.

Além disso, o diagrama de Pareto (Figura 6C) demonstra que a interação entre temperatura e a_w teve efeito negativo sobre a produção de OTA, portanto, a produção de OTA por *A. niger* na presença UFLABIO 35.1.1 também deve ser

mais alta quando se reduz a temperatura e se eleva a a_w . Tendência confirmada nas curvas de contorno (Figura 6C), em que a produção de OTA alcança níveis máximos (3,19 $\mu\text{g/g}$) em temperaturas abaixo de 15 °C e a_w ajustada entre 0,98 e 0,99. Picos de produção de OTA (3,8 $\mu\text{g/g}$) por *A. niger* na presença da bactéria UFLABIO 35.1.1 também são observados em baixas temperaturas (abaixo de 15 °C) e com pH ajustado em 4.

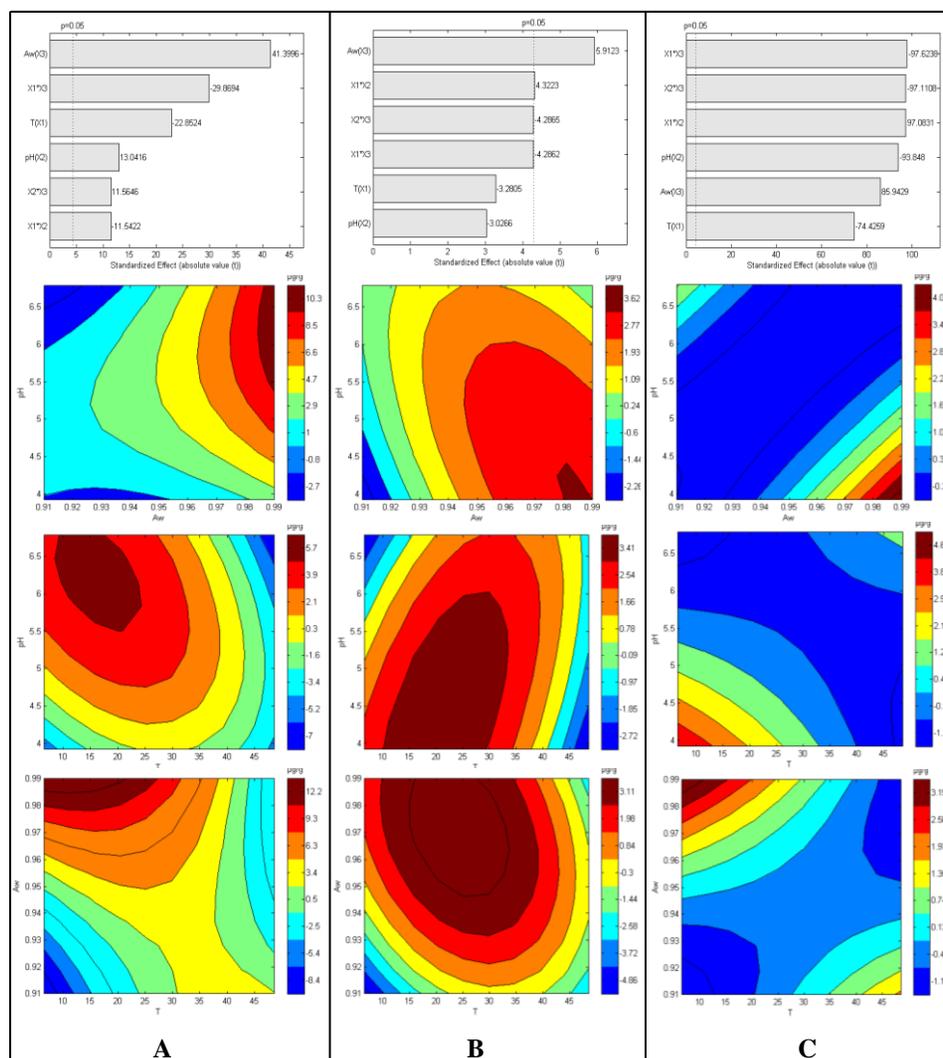


Figura 6 Diagrama de Pareto e curvas de contorno com efeito da temperatura (X1), pH (X2), atividade de água (X3) e suas interações sobre a produção de OTA por *A. niger* na ausência das bactérias (A), na presença da bactéria UFLABIO 05.1 (B) e na presença da bactéria UFLABIO 35.1.1 (C)

É possível verificar, também, que esta bactéria restringiu a produção de OTA por *A. niger* a valores de pH e temperatura muito mais baixos do que a produção da micotoxina na sua ausência. Pode-se supor, portanto, que o pH e a

temperatura foram os fatores mais significativos sobre a atividade antagônica desta bactéria, tendo os valores mais altos de pH e de temperatura favorecido sua ação antagônica frente à produção de OTA por *A. niger*.

Pesquisas avaliando potenciais agentes de biocontrole frente a *Aspergillus niger* e outros fungos ocratoxigênicos são frequentemente voltadas para a avaliação de leveduras. Outro ponto importante é que grande parte desses estudos não avalia o possível efeito do pH.

Pesquisadores do Egito e da Arábia Saudita avaliaram a capacidade de ação antagônica de diversos isolados bacterianos (*Bacillus pumilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bugarius*, *Lactobacillus plantarum* e isolados de Actinomicetos). O actinomiceto identificado como *Streptomyces noursei* teve ação mais efetiva contra *Aspergillus niger*. Estes pesquisadores encontraram, como condições ótimas para *S. noursei* produzir sua substância antifúngica, crescimento por sete dias em meio de cultura de amido, com pH igual a 7, a uma temperatura de 30 °C. Esta substância com ação antifúngica foi identificada como uma substância proteica (ALLAM et al., 2012). Interessante notar que estas condições ótimas tendem para um valor de pH e temperatura mais altos, semelhantes aos do presente estudo.

Em trabalho publicado em 2012, relata-se a eficiência de uma estirpe de *Rhodotorulaglutinis* e de um isolado *Streptomyces aureofaciens* na inibição do crescimento de *Aspergillus niger* ocratoxigênico. O experimento foi conduzido em campo, entre 2011 e 2012. As uvas receberam um spray de *Rhodotorulaglutinis* e *Streptomyces aureofaciens*. *Rhodotorulaglutinis* inibiu completamente a produção de ocratoxina A por *Aspergillus niger* nas uvas, por um período de estocagem de 40 dias (HAGGAG; ABDALL, 2012).

5 CONCLUSÕES

Ambos os isolados bacterianos, UFLABIO 05.1 e UFLABIO 35.1.1, foram capazes, em determinadas condições físico-químicas, de inibir o crescimento de *Aspergillus carbonarius* e de *Aspergillus niger* e reduzir sua produção de ocratoxina A *in vitro*.

Segundo o DCCR, o pH foi o fator mais significativo sobre a atividade antagônica de UFLABIO 35.1.1 frente ao crescimento de *A. carbonarius* e de *A. niger*, tendo os valores mais altos de pH favorecido sua ação frente ao crescimento do fungo. No entanto, é preciso avaliar a possibilidade de modificação do pH do meio de cultura por ação da bactéria.

Quanto à produção de OTA por *A. niger*, o DCCR demonstrou que a temperatura e o pH foram os fatores de efeito mais significativo sobre a atividade antagônica de UFLABIO 35.1.1, tendo os valores mais altos de temperatura e pH favorecido sua ação frente à produção de OTA.

REFERÊNCIAS

ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R. R. M.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of Ochratoxin A for food and feed decontamination. **Toxins**, New York, v. 2, n. 5, p. 1078-1099, May 2010.

ALBORCH, L. et al. Effect of water activity, temperature and incubation time on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* on maize kernels. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 147, n. 2, p. 53-57, Mar. 2011.

ALLAM, N. G. et al. Biological activity of *Streptomyces noursei* against ochratoxin A producing *Aspergillus niger*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 11, n. 3, p. 666-677, 2012.

ASTORECA, A. et al. Ecophysiological factor effect on growth rate, lag phase and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate strains on irradiated peanut seeds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 129, n. 2, p. 131-135, Feb. 2009.

BATISTA JÚNIOR, C. B. et al. Efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis* e de outras bactérias sobre alguns fungos patogênicos: nota científica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 8, p. 1189-1194, ago. 2002.

BATTILANI, P. et al. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, n. 1, p. 1736-1740, Aug. 2004.

BLEVE, G. et al. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 204-208, Jan. 2005.

BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 71, n. 2/3, p. 139-144, 2001.

CUBAIU, L. et al. A *Saccharomyces cerevisiae* wine strain inhibits growth and decrease ochratoxin A biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus*. **Toxins**, New York, v. 4, n. 2, p. 1468-1481, Apr. 2012.

CURTIS, F. et al. Environmental factors affect the activity of biocontrol agents against ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* on wine grape. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 159, n. 1, p. 17-24, Sept. 2012.

DÍAZ, G. A. et al. Ochratoxigenic *Aspergillus* species on grapes from Chilean vineyards and *Aspergillus* threshold levels on grapes: short communication. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 133, n. 1, p. 195-199, July 2009.

DOUGHERTY, P. H. Introduction to the geographical study of viticulture and wine production. In: _____. **The geography of wine: regions, terroir and techniques**. Pennsylvania: Springer, 2012. p. 3-36.

ESTEBAN, A. et al. Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. **Research in Microbiology**, Paris, v. 155, n. 10, p. 861-866, Dec. 2004.

HAGGAG, W. M.; ABDALL, A. M. Evaluation of *Streptomyces Aureofaciens* and *Rhodotorulaglutinis* against Ochratoxin A producing *Aspergillus niger* Grapevines. **Journal of Microbiology Research**, Rosemead, v. 2, n. 6, p. 170-175, 2012.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 886 p.

LASRAM, S. et al. Water activity and temperature effects on fungal growth and ochratoxin A production by Ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* isolated from Tunisian grapes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 75, n. 2, p. 89-97, 2010.

LUNARDI, L. U. et al. Generation of *Aspergillus carbonarius* mutants by *Agrobacterium tumefaciens*: mediated transformation method. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 27, n. 2, p. 95-104, 2006.

MELLO, L. M. R. **Vitivinicultura brasileira: panorama 2011**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2012a. 4 p. (Comunicado Técnico, 115).

MELLO, L. M. R. **Vitivinicultura mundial: principais países e posição do Brasil**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2012b. 8 p. (Comunicado Técnico, 121).

MELLO, L. M. R.; GARAGORRY, F. L.; CHAIB FILHO, H. **Evolução e dinâmica da produção de uva no Brasil no período de 1975 a 2003**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2007. 38 p. (Documentos, 62).

MITCHELL, D. et al. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 2, p. 439-445, Aug. 2004.

PALACIOS-CABRERA, H. et al. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 24-28, Mar. 2005.

PONSONE, M. L. et al. Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 151, n. 1, p. 70-77, Aug. 2011.

PONSONE, M. L. et al. Control of ochratoxin A production in grapes. **Toxins**, New York, v. 4, n. 5, p. 364-372, May 2012.

PRADO, C. S. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas de embutidos curados frente a *Listeria monocytogenes*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 4, p. 417-423, ago. 2000.

SMAOUI, S. et al. Inhibition of fungi and gram-negative bacteria by bacteriocin BacTN635 produced by *Lactobacillus plantarum* sp. TN635. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 162, n. 4, p. 1132-1146, Nov. 2010.

SOUZA, A. Q. L. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens bentham*. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

SUNDH, I.; MELIN, P. Safety and regulation of yeasts used for biocontrol or biopreservation in the food or feed chain. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 113-119, Jan. 2010.