

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA EDLING DE BARROS

REMOÇÃO DE OCRATOXINA A POR LEVEDURAS

PONTA GROSSA

2022

AMANDA EDLING DE BARROS

REMOÇÃO DE OCHRATOXINA A POR LEVEDURAS

Removal of ochratoxin A by yeast

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentada como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Elisabete Hiromi Hashimoto.

PONTA GROSSA

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

AMANDA EDLING DE BARROS

REMOÇÃO DE OCRATOXINA A POR LEVEDURAS

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 28/novembro/2022

Elisabete Hiromi Hashimoto
Doutora
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Juliana Vitória Messias Bittencourt
Doutora
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Maria Oliveira Ribeiro
Doutora
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

PONTA GROSSA

2022

AGRADECIMENTOS

Concedo minha gratidão primeiramente à Deus. Agradeço aos meus pais por me apoiarem ao longo desta jornada, sem este apoio não seria possível concluir essa etapa. Minha irmã e meu queridíssimo noivo por sempre me apoiar.

Agradeço à minha orientadora Prof.(a) Dra. Elisabete, pela paciência em ensinar e a forma muito cuidadosa que me orientou.

Ao departamento do Curso, pela cooperação.

Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta pesquisa.

RESUMO

A ocratoxina A (OTA) é uma toxina altamente prejudicial a saúde humana, produzida por fungos do gênero *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. A contaminação de ocratoxina A em uvas e produtos derivados é frequentemente relatada. Desta forma, para prevenir a contaminação e detoxificar vários métodos de controle têm sido propostos, tais como: controle biológico, químico e físico. O trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de remoção de ocratoxina A por meio de leveduras isoladas do vinho. Uma vez que a indústria de vinho utiliza amplamente os sulfatos em seu processo e este aditivo químico tem uma função antimicrobiana, as leveduras que obtiram melhores resultados no teste de remoção da OTA foram submetidas ao teste de tolerância ao metabissulfito de sódio. Foram realizados dois teste de remoção de OTA durante 96 horas, com as leveduras MW01, MW06, MW09, PL3, PL8, L1, L2, L3 e L4. Em que no teste a única fonte de carbono das leveduras foi a OTA. A detecção de ocratoxina A nas amostras, foi realizada por cromatografia de camada delgada (CCD). Apenas a levedura 4 apresentou potencial de remoção de OTA e prosseguiu para o teste de resistência ao metabissulfito de sódio. Nas três diferentes concentrações testadas de metabissulfito de sódio: 0,0225 g/mL, 0,030 g/mL e 0,0375 g/mL, a concentração que teve um menor impacto no crescimento celular foi 0,030 g/L. Nesta metodologia proposta foi possível elencar a avaliar que a L4 tem potencial de remoção de OTA.

Palavras-chave: ocratoxina A; vinho; controle biológico; aditivo químico; leveduras.

ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA) is a toxin highly harmful to human health, produced by fungi of the genus *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. Ochratoxin A contamination in grapes and derived products is frequently reported. Thus, to prevent contamination and detoxify several control methods have been proposed, such as biological, chemical and physical control. The objective of this study was to evaluate the potential removal of ochratoxin A by yeasts isolated from wine. Since the wine industry widely uses sulfites in its process and this chemical additive has an antimicrobial function, the yeasts that obtained the best results in the OTA removal test were submitted to the sodium metabisulfite tolerance test. Two OTA removal tests were performed for 96 hours, with the yeasts MW01, MW06, MW09, PL3, PL8, L1, L2, L3, and L4. Where in the test the only carbon source of the yeasts was OTA. The detection of ochratoxin A in the samples was done by thin layer chromatography (TLC). Only yeast 4 showed potential for OTA removal and proceeded to the sodium metabisulfite resistance test. In the three different concentrations tested of sodium metabisulfite: 0.0225 g/mL, 0.030 g/mL and 0.0375 g/mL, the concentration that had the least impact on cell growth was 0.030 g/L. In this proposed methodology, it was possible to assess that L4 has potential for OTA removal.

Keywords: ochratoxin A; wine; biological control; chemical additives; yeast.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química da ocratoxina A	17
Figura 2 - Via enzimática de descontaminação da ocratoxina A	18
Figura 3 - – Estrutura química do dióxido de enxofre e metabissulfito de sódio	23
Fotografia 1 - Cromatografia de camada delgada	31
Fotografia 2 - Ensaio do teste de resistência à metabissulfito de sódio	32
Fotografia 3 - Leitura de amostras por CCD	34
Fotografia 4 - Leitura das amostras das leveduras L1, L2, L3 e L4 por CCD	37
Gráfico 1 - Curva de calibração de nº de células.....	38
Gráfico 2 - Curva de crescimento sem adição de metabissulfito de sódio.....	39
Gráfico 3 - Curva de crescimento comparativa	39
Quadro 1 - Crescimento da levedura 4	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fator de correção espectrofotômetro	33
Tabela 2 - Soluções padrão de ocratoxina A	33
Tabela 3 - Fator de retenção do experimento com ocratoxina A padrão	35
Tabela 4 - Fator de retenção do experimento com extrato de <i>A. ochraceus</i>	36
Tabela 5 - Relação entre absorvância e contagem de células	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral.....	15
2.1.1	Objetivos específicos.....	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	Ocratoxina A	16
3.2	Toxicidade.....	17
3.3	Biodegradação/remoção de ocratoxina A.....	18
3.4	Controle químico	18
3.5	Controle físico	19
3.6	Controle biológico.....	20
3.7	Aspectos relacionados à contaminação de ocratoxina A em vinhos.....	21
3.8	Fermentação de vinhos por leveduras.....	22
3.9	Aditivos químicos: Metabissulfito de sódio.....	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	Culturas.....	25
4.2	Solução de ocratoxina A.....	26
4.2.1	Obtenção do extrato de OTA por meio de culturas de <i>A. ochraceus</i>	26
4.2.2	Calibração do equipamento.....	27
4.2.3	Padrão de ocratoxina A.....	28
4.3	Padronização da contagem celular de leveduras.....	28
4.4	Teste de degradação de ocratoxina A.....	29
4.5	Cromatografia de camada delgada.....	30
4.6	Teste de tolerância a metabissulfito de sódio.....	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	33
5.1	Calibração do espectrofotômetro.....	33
5.2	Extração de OTA por meio de culturas de <i>A. Ochraceus</i>.....	34
5.3	Teste de degradação de ocratoxina A.....	35
5.4	Curva de calibração de nº de células.....	37
5.5	Teste de tolerância a metabissulfito de sódio.....	38
6	Considerações finais.....	42

REFERÊNCIAS.....	43
APÊNDICE A - Meios de cultura.....	51
ANEXO A - Lei n. 9.610, de 19 de fevereiro de 1998.....	52

1 INTRODUÇÃO

As micotoxinas são compostos produzidos por fungos em condições de estresse que causam prejuízos ao agronegócio e à saúde pública. Dentre as micotoxinas, se destacam as aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona e fumonisinas (KUPSKI, 2015). O grupo das ocratoxinas é constituído por sete metabólitos secundários, dos quais a ocratoxina A (OTA) é a mais conhecida e tóxica. Essa toxina é produzida por fungos do gênero *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. (ABREU, 2013).

A ocratoxina A está presente em diversos alimentos, como: produtos vegetais, cereais, café, cacau, especiarias, frutos secos, amendoim e uva (LOPES, 2013). A uva e seus produtos derivados recebem destaque, devido ao potencial de controle e remoção da ocratoxina A através das leveduras do vinho (ABREU, 2013). Devido ao risco que as micotoxinas apresentam à saúde, o Ministério da Saúde no Brasil instituiu na legislação o limite máximo tolerável (LMT) de ocratoxina A em sucos de uva, polpa de uva, vinho e derivado o LMT é 2,0 µg/ kg de produto (BRASIL, 2011).

Embora os estudos sobre as micotoxinas estejam datadas desde 1962, a agricultura ainda enfrenta problemas com a desinfecção de fungos que produzem micotoxinas. Como por exemplo, no caso em que cerca de 140 toneladas de uvas passas contaminadas por ocratoxina A foram interceptadas no estado de São Paulo, pela Vigilância Agropecuária Internacional, em 2020 (NIEDERAUER, 2020). Frente a isto, existem os métodos de controle físico, químico e biológico de micotoxinas para prevenir a contaminação e detoxificar os fungos.

Com a modernização da agricultura, o método de controle biológico tem conquistado gradativamente mais espaço, porque se apresenta como método alternativo com novas tecnologias e pode garantir uma maior segurança à saúde dos consumidores, produtores e trabalhadores. No caso das uvas, o controle biológico é aplicado para conter a contaminação de ocratoxina A que ocorre principalmente nas bagas (ABREU, 2013). Uma vez contaminada, no processamento da uva para produção de sucos e vinhos a OTA é propagada durante todo o processo. Estudos comprovam que durante o processo de vinificação a concentração de ocratoxina A é reduzida em durante as etapas, em diferentes níveis, e algumas leveduras do vinho tem um potencial absorvivo da micotoxina (ANDRADE. 2016).

Neste contexto, outra problemática é otimizar a conservação dos alimentos através de aditivos químicos, como por exemplo na indústria vinícola com a ampla utilização dos sulfitos. Desta forma, os aditivos químicos são incorporados nos alimentos com o objetivo de aumentar o tempo de conservação dos alimentos. No processo vinícola o conservante os sulfitos são utilizados para causar inativação celular de microrganismos contaminantes no processo. Por isso, o efeito das interações do dióxido de enxofre no vinho vem sendo extensivamente estudado, devido a diferentes interações dos componentes químicos da molécula com o vinho e para investigar a tolerância de diferentes espécies de leveduras à sulfitos (BASSI *et al.*, 2014).

Em razão ao aumento do número de espécies fúngicas que apresentam resistência a fungicidas químicos, torna-se necessário trazer novas formas de conter a contaminação fúngica em produtos agrícolas. Diante disso, este trabalho avaliou a capacidade das leveduras isoladas do vinho e uva de remover a ocratoxina A. Somado à isto, foi testado a tolerância ao metabissulfito de sódio nas leveduras que obtiram melhores resultados no teste anterior.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de remoção de ocratoxina A por meio das leveduras isoladas do vinho e uva.

2.1.1 Objetivos específicos

- Padronizar testes de biodegradação de ocratoxina A por leveduras;
- Avaliar a remoção da ocratoxina A por leveduras isoladas do vinho e uva;
- Avaliar a tolerância de leveduras ao metabissulfito de sódio;
- Eleger as leveduras que obtiveram melhor desempenho;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Ocratoxina A

As micotoxinas são metabólitos secundários, produzidos por fungos filamentosos, responsáveis por causar efeitos tóxicos em animais e humanos. Há muito tempo se tem conhecimento sobre essas toxinas, contudo os estudos se intensificaram depois do acidente ocorrido em 1960, na Inglaterra, quando 100.000 aves morreram com ração contaminada por aflatoxina de *Aspergillus flavus* (DUARTE, 2010).

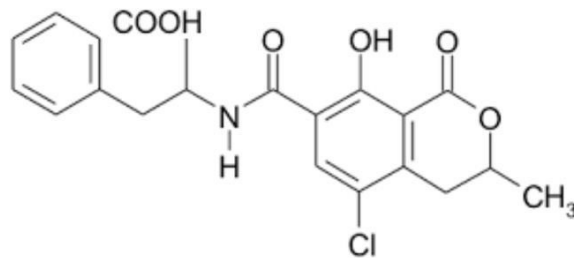
Em alimentos são detectadas uma grande variedade de micotoxinas, uma delas é ocratoxina A (OTA). Segundo Lopes (2013), a ocratoxina A, foi detectada em vinhos e sucos de uva em 1996, na continuidade das pesquisas também foi identificada em cereais. Atualmente encontra-se a OTA nos seguintes alimentos: produtos vegetais, como cereais, café, cacau, especiarias, frutos secos, amendoim e uva. Em 1999 a 2000, foi realizado um estudo na União Européia para verificar as principais fontes de exposição a OTA, verificou-se que os cereais são a maior fonte de contaminação, em segundo lugar está a contaminação por ingestão de vinho (ANDRADE; LANÇAS, 2015).

Os gêneros de fungos responsáveis pela produção de OTA em alimentos são *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. De modo geral, os fatores que interferem no crescimento dos fungos e produção de micotoxinas são: umidade relativa do ar, temperatura, composição do substrato, atividade da água, pH e linhagem do fungo contaminante (DACHERY, 2015). Os fungos do gênero *Penicillium* spp. apresentam crescimento em temperatura menor que 30 °C, atividade da água de até 0,8 e o pH entre 6,0-7,0. Em contrapartida *A. ochraceus* crescem em uma faixa de temperatura entre 8-37 °C, *A. carbonarius* entre 32-35 °C com a atividade da água de até 0,82 e *A. niger* dentro de 8-47°C com a atividade da água de até 0,72. Destaca-se ainda que em regiões de clima tropical e subtropical existe uma predominância do gênero *Aspergillus* spp (ANDRADE; LANÇAS, 2015).

A OTA é um policetídeo derivado de dihidro-isocumarina unida pelo carbono 7 carboxílico a uma L - b - fenilalanina, através de uma ligação amídica. Sua fórmula química é $C_{20}H_{18}O_6NCl$, como mostra na figura 1 (DACHERY, 2015). Além disso,

também apresenta termo-resistência, fluorescência verde quando exposta à luz ultravioleta (LOPES, 2013).

Figura 1 - Estrutura química da ocratoxina A



Fonte: DACHERY (2015)

3.2 Toxicidade

A OTA é classificada no grupo 2B da Agência Internacional de Pesquisa sobre o câncer, sendo um composto carcinogênico para humanos. Destaca-se ainda o potencial nefrotóxico, carcinogênico, imunossupressora, teratogênica e carcinogênica (DACHERY, 2015).

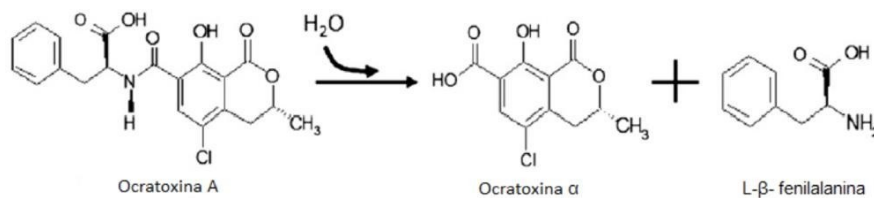
A principal via de exposição à OTA é através da ingestão de alimentos e bebidas contaminados. Devido a suas características ácidas, na maioria das espécies a absorção ocorre primeiramente no estômago e posteriormente no intestino. A nível sanguíneo, a toxina encontra-se fortemente ligada às proteínas plasmáticas, sendo um fator determinante para a persistência da micotoxina no sangue. A ocratoxina A é liberada para os tecidos durante um longo período de tempo. A eliminação é retardada pelo organismo devido à alta afinidade com as proteínas séricas (KUPSKI, 2015).

Devido ao risco que as micotoxinas apresentam para a saúde humana e dos animais, em 2011, o Ministério da Saúde estabeleceu a Resolução nº 7 que determina limites máximos toleráveis (LMT) em alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias-primas. O LMT de ocratoxina A em sucos de uva, polpa de uva, vinho e derivado é 2,0 µg/ kg de produto (BRASIL, 2011). A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESAs), apresentou em 2006 uma dose semanal admissível de OTA (DSA) correspondente a 120 ng/kg de peso corporal (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉRIAS, 2006). Em contrapartida, os Estados Unidos ainda não estabeleceram limites máximos de ocratoxina A nos alimentos (FDA, 2015).

3.3 Biodegradação/remoção de ocratoxina A

A principal forma em que os microrganismos encontram para descontaminar OTA é através da hidrólise da ligação amida que une à molécula de fenilalanina. Proteases intra ou extracelulares fazem a mediação desta reação que são produzidas por diferentes microrganismos e apresentam diferentes atividades de enzimas hidrolíticas de OTA (KUPSKI, 2015)

Figura 2 - Via enzimática de descontaminação da ocratoxina A



Fonte: KUPSKI (2015)

A ocratoxina α (OT α) considerada não tóxica e tem uma meia-vida de eliminação 10 vezes menor que a da OTA. Em animais e humanos, a conversão de OTA em OT α via hidrólise da ligação amida constitui a via de desintoxicação predominante da OTA. Várias enzimas proteolíticas, microrganismos e células vegetais mostraram hidrolisar esta amida ligada a desintoxicar OTA (ABRUNHOSA *et al.*, 2014).

3.4 Controle químico

O controle de doenças causadas por fungos, bactérias e algas por meio de compostos químicos é denominado controle químico. Alguns produtos não apresentam efeito biocida sobre os fungos, apenas atuam na inibição temporária da germinação dos esporos, além disso também são capazes de prevenir infecções. Contudo, a descontaminação por agentes químicos é considerada um processo de alto custo (EMBRAPA, 1999).

A degradação ou inativação de ocratoxina A por métodos químicos ocorre por meio de modificações químicas irreversíveis na molécula, com o uso de ácidos, bases, aldeídos, agentes oxidantes e gases (CARÃO *et al.*, 2014). Os principais compostos químicos utilizados para inativação, remoção e degradação de micotoxinas estão compostos como peróxido de hidrogênio, hidróxido de sódio, amônia e de cálcio, acetato

de etila, diclorometano, ácidos fórmico e clorídrico, cloro, bissulfito e carbonato de sódio, formaldeído e ozônio (KUPSKI, 2015).

Dentro dos métodos de controle químicos, se encontram diferentes tecnologias, como a utilização de gás ozônio para controle de fungos em grãos armazenados que é uma proposta mais segura e potente (EMBRAPA, 2006). Outra alternativa, é a esterilização de alimentos por plasma a frio, este gás apresenta tratamento uniforme que podem executar a atividade a baixa temperatura e sem alteração do alimento (sabor, odor e estrutura) (SILVA, 2019).

O uso de fungicidas é considerado o método tradicional de controle de fungos. Este apresenta desvantagens, como: a contaminação do solo e recursos hídricos, alto custo e a eficiência com o uso frequente é reduzida devido a ocorrência de populações resistentes aos princípios ativos dos fungicidas (SILVA, 2021).

Além disso, segundo o trabalho *Pesticide Atlas* apresentado pela Fundação Heinrich Böll, é relatado sobre o uso de agrotóxicos e suas consequências. Um dos pontos abordados foi o uso de agrotóxicos em países em desenvolvimento, como o Brasil (FUNDAÇÃO HEINRICH BÖLL, 2022). O país está em terceiro lugar no mundo em utilização de defensivos agrícolas, como os pesticidas (RUETER; DAMASCENO, 2022). Somado a isto, o país fomenta políticas públicas de incentivo ao uso de produtos químicos, uma vez que, em 2021 o Brasil encerra com 562 agrotóxicos liberados, sendo 33 inéditos (SCHMIDT, 2022).

3.5 Controle físico

Métodos não convencionais vem sendo descritos para controle de toxinas, muitos desses métodos não envolvem processamento térmico, preservando as propriedades nutricionais dos alimentos, no entanto apresentam um custo de implantação/adaptação nas indústrias e ainda são pouco utilizados. O aquecimento ôhmico apresenta uma maior vantagem para produtos que contém compostos que são mais sensíveis à temperatura, porém o método possui um aquecimento desproporcional e alta dependência do processo com a composição do produto (SILVA, 2021). O tratamento térmico promove reduções significativas de micotoxinas em diversos alimentos, contudo é um processo muito dependente do nível de contaminação inicial, temperatura de aquecimento, tempo de exposição ao calor, umidade, tipo do alimento e da micotoxina contaminante. A extrusão e aquecimento por micro-ondas são formas de tratamento térmico (CARÃO *et al.*, 2014).

A adsorção também se encontra incluída nos métodos de controle físico. O processo de adsorção possui vários fatores que influenciam, como: pH do meio, área superficial, as propriedades do adsorvente e do adsorvato e temperatura do sistema (NASCIMENTO *et al.*, 2014). Os adsorventes são utilizados para eliminar substâncias tóxicas do sistema gastrointestinal, e por consequência eliminar os efeitos tóxicos no organismo (CARÃO *et al.*, 2014).

A radiação UV-C atua diretamente na remoção de microrganismos em alimentos. Além disso, estudos comprovam que de forma indireta interfere na fisiologia no alimento, retarda processos bioquímicos de amadurecimento, reduz a taxa respiratória e a transpiração. A desvantagem é o baixo poder de penetração da luz UV-C, portanto o processo não é eficaz em superfícies porosas, com sombras ou orifícios (EMBRAPA, 2019).

3.6 Controle biológico

Biocontrole é um método de controle de espécies que se baseia no estudo das inter-relações entre os seres vivos. Podendo ser aplicado em diferentes etapas do processo agrícola para o controle e prevenção do crescimento fúngico, redução da produção da toxina ou na pós colheita para remoção/degradação da toxina. Neste trabalho, o controle biológico é descrito como uma técnica de redução ou eliminação de micotoxinas, como a ocratoxina A. O controle de pragas-alvo pode ser feito com predadores e parasitóides ou microrganismos, a depender da aplicação e do microrganismo que se pretende eliminar (EMBRAPA, 2006).

Este método dispõe da interdisciplinaridade para desenvolvimento de novas tecnologias para otimizar sua aplicabilidade. Como o uso de ferramentas moleculares, edição de genomas de agentes de biocontrole, silenciamento de genes e nanotecnologia aplicado aos biopesticidas. Dentro deste contexto, tem-se o nanoencapsulamento de fungos como *Trichoderma harzianum* Rifai, utilização de nanogel para liberação de feromônio contra moscas-das-frutas e entre outros casos (FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020).

O mecanismo de ação para controle acontece por meio das interações ecológicas, como a competição, antibiose, parasitismo e indução de resistência (LUCON *et al.*, 2014). No biocontrole com microrganismos, o principal mecanismo de ação entre os organismos é o antagonismo. Este método está se apresentando cada vez mais viável na utilização no campo para combater a infestação fúngica, principalmente por não deixarem resíduos químicos nos alimentos (NICOLAU, 2014).

Dentro muito exemplos, destaca-se o controle de uma planta na África do Sul que foi introduzida a partir da Austrália, a área de origem da planta invasora – a *Acacia saligna* (Labill.). O fungo *Uromycladium tepperianum* Sacc. aplicado no campo causou a quebra dos ramos e conseqüentemente a morte da planta. O resultado foi a redução de 90% a 95% na densidade da espécie-alvo (MORRIS *et al.*, 1999).

No Brasil tem se o exemplo do controle da lagarta-da-soja com o vírus *Baculovirus anticarsia*. O método consiste em utilizar lagartas infectadas pelo vírus, recomendando-se de 50 a 70 lagartas grandes maceradas com um pouco de água por hectare. A suspensão com os poliedros do vírus passa por uma peneira, sendo em seguida colocada em um pulverizador com 100 a 200 litros de água, visando dar uma cobertura uniforme à área tratada. No que tange a bactérias, a *B. Thuringiensis* é a mais utilizada no controle biológico de pragas agrícolas e insetos, uma vez que apresenta toxicidade para diferentes insetos das ordens Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, bem como a nematoides (FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020).

O uso do controle biológico frente a eliminação de microrganismos é uma alternativa mais sustentável se comparar com o controle químico, uma vez que o uso de agentes químicos pode causar ao meio ambiente a contaminação de alimentos, água, animais e solo, redução da biodiversidade, resistência de pragas e fungos (CORRÊA, 2019).

O controle biológico tem sido muito incentivado, por apresentar condições mais brandas de tratamento e também pela especificidade com o uso de enzima e/ou microrganismos na degradação de OTA. O processo fermentativo recebe destaque entre o método de biocontrole, já que meio fermentativo possui microrganismos não toxigênicos para a descontaminação.

3.7 Aspectos relacionados à contaminação de ocratoxina A em vinhos

A contaminação de ocratoxina A em vinho ocorre quando as uvas atribuídas para o processamento são infectadas por fungos. Desde que foi detectada pela primeira vez em vinhos na Suíça, em 1996, a investigação sobre a biodegradação e biocontrole de OTA na produção vinícola tem se intensificado com o passar do tempo (ABREU, 2013).

A maior concentração de OTA é encontrada na casca da uva, por isso, os vinhos tintos se comparar com os outros tipos de vinho apresentam uma maior incidência de micotoxinas, devido as características intrínsecas no processo (ABREU, 2013). Isto ocorre devido a remoção das cascas logo no início do processamento da uva na

produção de vinhos brancos, diminuindo assim a quantidade de OTA residual (ANDRADE, 2016).

Estudos relatam que a redução da concentração de OTA ocorre em todas as etapas do processo vitícola, contudo, a etapa que possui maior influência é a fermentação. Nas fases iniciais de vinificação, a degradação está associada ao efeito da remoção dos sólidos por precipitação (ABREU, 2013). Somado a isto, muitos estudos relatam sobre a diminuição da concentração de contaminantes na fermentação alcoólica (COSTA, 2019).

3.8 Fermentação de vinhos por leveduras

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, define o vinho uma bebida obtida a partir da fermentação alcoólica de mosto simples de uva sã, fresca e madura (BRASIL, 2014). O vinho é classificado de acordo com: quanto à classe – vinho leve, vinho de mesa, espumante, vinho licoroso e vinho composto; quanto à cor – tinto, rosado e branco e quanto ao teor de açúcar (BEZERRA, 2012).

A qualidade do vinho está diretamente relacionada com a cepa de levedura escolhida, uma vez que as leveduras são responsáveis pela fermentação alcoólica do mosto. Durante a fermentação, o vinho apresenta uma grande diversidade de gêneros e espécies de leveduras, a *Saccharomyces cerevisiae* é a mais conhecida. No entanto, nas etapas iniciais da fermentação do vinho, há um crescimento significativo de espécies de leveduras não – *Saccharomyces* procedentes da própria

Os microrganismos presentes naturalmente nas uvas interferem tanto na fermentação alcoólica quanto na fermentação malolática, pois produzem compostos que promovem características específicas ao vinho (SILVA, 2019). Desta forma, o estudo da diversidade microbiológica da uva e caracterização das leveduras que compõem o processo fermentativo do mosto é importante visto que, as características do produto são determinadas por enzimas e leveduras presentes na uva (BEZERRA, 2012).

3.9 Aditivos químicos: Metabissulfito de sódio

Alimentos produzidos em escala industrial podem sofrer deterioração através de contaminação fúngica. Entre as estratégias para tentar inibir essas alterações, encontram-se o tratamento térmico e aditivos químicos, com diferentes aplicabilidades. Os aditivos químicos são métodos alternativos, uma vez que no tratamento térmico os fungos desenvolvem resistência térmica e potencialmente também sintetizam metabólitos secundários tóxicos que se acumulam na matéria-prima (LÓPEZ; LIMA-COELHO; FERREIRA, 2009). Dentre os aditivos químicos estão: ácido benzóico,

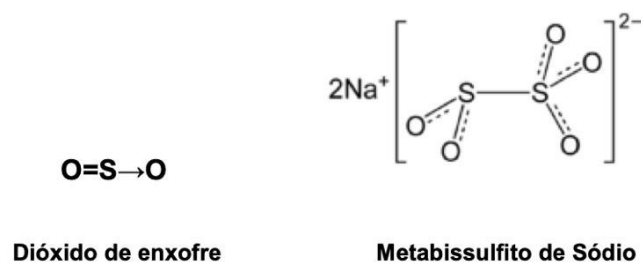
benzoato de sódio, dióxido de enxofre, sulfitos, ácido sórbico, sorbato de potássio e metabissulfito de sódio (COELHO, 2008).

O Ministério da Saúde define aditivo alimentar como qualquer ingrediente inserido intencionalmente aos alimentos, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento (BRASIL, 1997). A legislação brasileira regulamenta os aditivos permitidos e seus limites máximos para categoria de bebidas alcoólicas. Para vinhos em que o aditivo tem a função antioxidante e melhorar a conservação do produto, é estabelecido para sulfitos 0,03 g/100 mL (BRASIL, 2016). A Food and Drugs Administration (FDA) proibiu o uso de metabissulfitos em carnes e alimentos reconhecidos como fonte de vitamina B1 (FDA, 2022).

Dentre os aditivos químicos, tem-se o dióxido de sulfeto e os metabissulfitos. Ambos apresentam atividade antimicrobiana, ação antioxidante e solubilizante (RIZZON; DALL'AGNOL, 2007). Os aditivos mais frequentemente utilizados são: metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), metabissulfito de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_3$), metabissulfito de cálcio ($\text{Ca}_2\text{S}_2\text{O}_3$), sulfito de sódio (Na_2SO_3), sulfito de cálcio (Ca_2SO_3), sulfito de potássio (K_2SO_3), bissulfito de cálcio (CaHSO_3), bissulfito de sódio (NaHSO_3), bissulfito de potássio (KHSO_3); adicionados aos mais diversos alimentos (COELHO, 2008). Na produção de vinho, os aditivos se destacam devido a propriedades como (RIZZON; DALL'AGNOL, 2007):

- Ação antimicrobiana: o dióxido de enxofre atua selecionando os microrganismos presentes no mosto, de forma que inibe a reprodução dos microrganismos indesejados e estimula a ação das leveduras.

Figura 3 - Estrutura química do dióxido de enxofre e metabissulfito de sódio



Fonte: RIZZON; DALL'AGNOL (2007)

- Ação antioxidante: age de forma protetora sobre os compostos orgânicos que atribuem a coloração do vinho e são facilmente oxidáveis. Isto é, previne a

alteração da cor nos vinhos;

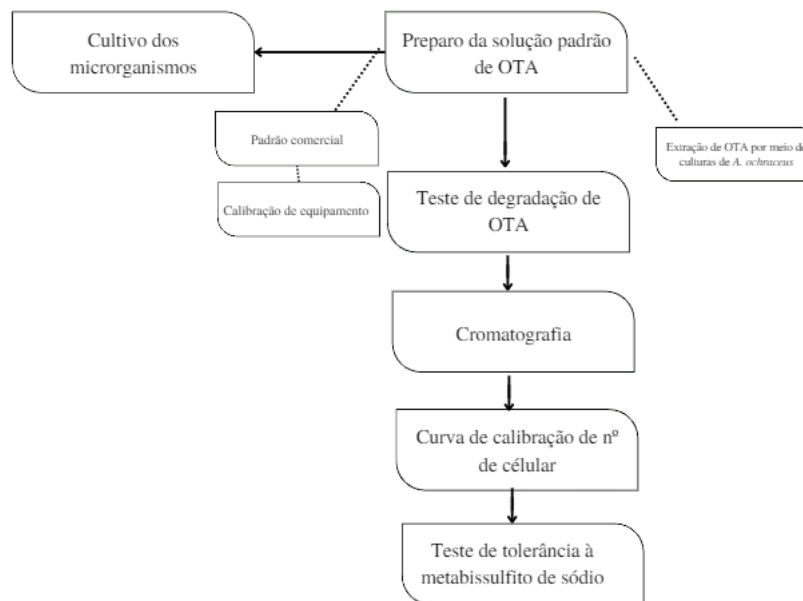
- Ação antioxidística: inibe a ação de enzimas que provocam a turvação e enegrecimento do vinho produzido;

O metabolismo de ação do dióxido de enxofre (SO_2 , SO_3 , HSO_3 e S_2O_5) e seus derivados (sais de sódio, potássio ou cálcio) ocorre através da liberação de sulfitos que reagem com ligações dissulfetos e tiosulfonatos. Este mecanismo induz a inativação de enzimas e, conseqüentemente, a ativação das atividades antioxidantes, antimicrobianas e antioxidísticas (LÓPEZ; LIMA-COELHO; FERREIRA, 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Bioquímica e Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, localizado em Ponta Grossa - PR. O fluxograma 1 apresenta o fluxo geral dos materiais e métodos desenvolvidos.

Fluxograma 1 - Visão geral do fluxo de materiais e métodos



Fonte: Autoria própria (2022).

Em que, o cultivo dos microrganismos sucedeu ao longo de todas as etapas. A seguir, o preparo da solução de ocratoxina A foi iniciado com uma solução pura obtido pela empresa Sigma e ao longo do desenvolvimento houve a alteração na estratégia, uma vez que o padrão puro possui um alto custo e difícil acesso à compra. Com a obtenção da solução de OTA foi iniciado o teste de degradação e leitura das amostras em cromatografia de camada delgada para averiguar o desenvolvimento da reação. Os microrganismos que obtiveram um melhor desempenho foram submetidos ao teste de tolerância ao metabissulfito de sódio.

4.1 Culturas

As leveduras utilizadas para avaliar a remoção de ocratoxina A foram isoladas de uvas e vinhos produzidos no Rio Grande do Sul, coletadas em 2022. As leveduras utilizadas para os testes foram cedidas pela coleção de microrganismos do laboratório de microbiologia da UTFPR-PG. Em que, as leveduras do vinho são MW01, MW06 e

MW09 e da uva PL3 e PL8. E, também foram utilizadas as leveduras nomeadas como 1,2,3 e 4 isoladas de uva americana Tercy.

O *A. ochraceus* foi mantido em meio BDA, com repiques mensais para manutenção da cepa. A esterilização dos meios foi realizada por autoclavagem a 121°C por 15 minutos. A linhagem referência de *A. ochraceus* produtora de ocratoxina A foi cedida pela coleção de microrganismos do laboratório de microbiologia da UTFPR-PG.

4.2 Solução de ocratoxina A

Neste trabalho foi utilizado soluções padrão de ocratoxina A adquirida pela empresa Sigma. A solução padrão estoque de ocratoxina A foi armazenada à 5 °C. Além do padrão, foi utilizado também extrato de *A. ochraceus* produtor de OTA.

4.2.1 Obtenção do extrato de OTA por meio de culturas de *A. ochraceus*

Todas as vidrarias utilizadas foram previamente higienizadas com água sanitária e posteriormente lavadas com detergente e enxaguadas com água da torneira e depois água destilada. A cepa do fungo *A. ochraceus* foi mantida em meio de cultura BDA a 7 °C. Foram utilizados meio ágar e caldo YES já que, este meio é geralmente considerado muito favorável para a biossíntese de ocratoxina A (SOUZA, 2014).

As colônias foram inoculadas em 10 placas meio ágar YES (Yeast Extract Sucrose) e para 4 erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de caldo YES. Os meios ficaram em BDO à 25°C por 7 e 14 dias. Este procedimento sucedeu duas vezes porque com o tempo de 7 dias não foi obtido o extrato de ocratoxina A, por isso houve a repetibilidade com o tempo de 14 dias.

Para extração de ocratoxina A no meio sólido, foi necessário fazer a trituração do ágar a fim de aumentar a superfície de contato entre o solvente e a toxina. Posteriormente, a extração a partir do meio sólido líquido seguiram as seguintes etapas descritas.

Em 50 gramas de amostra foi adicionado 10 mL de KCl 4% e 90 mL de metanol. Em seguida o conteúdo foi transferido para 4 erlemeyers para que ficassem em agitação (150 rpm) durante 15 minutos para garantir a completa homogeneização. Após, realizou-se a filtração com papel filtro 125 mm.

Em 50 mL do filtrado foram adicionados 50 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 30% e 7 gramas de terra diatomácea. Sucedeu uma segunda filtração direto para o funil de separação. Ao funil de separação, foi adicionado 50 mL do filtrado, 50 mL de água destilada e 10 mL de clorofórmio e agitou-se suavemente por 3 minutos e foi aguardada a separação das fases. Posteriormente, foi recolhido 5 mL do filtrado e adicionado no funil de separação 10 mL de clorofórmio, agitou-se suavemente por 3 minutos e foi aguardada a separação das fases. Este procedimento sucedeu por mais uma vez (ONO *et al.*, 2007).

4.2.2 Calibração do equipamento

Para garantir a confiabilidade dos dados e a concentração específica de micotoxina presente é necessário realizar a calibração do equipamento. A calibração ocorreu de forma a obter o fator de correção e posteriormente a concentração de micotoxina. Para calibração do equipamento, primeiramente foi preparado as seguintes soluções: (INSTITUTO ADOLFO LUTZ; ZENEBO; PASCUET, 2008):

- Solução de H_2SO_4 0,018 N: adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico concentrado em um balão de 2000 mL, foi completado com água destilada.
- Solução A: dicromato de potássio 0,25 mM – contém aproximadamente 78 mg de dicromato de potássio previamente dessecado e foi dissolvido em 1000 mL de ácido sulfúrico.
- Solução B: composta por 25 mL da solução A que foi transferido para um balão de 50 mL e completou o volume com solução de ácido sulfúrico.
- Solução C: foi adicionado 25 mL da solução B e transferido para balão de 50 mL, por fim completou-se o volume com solução de ácido sulfúrico.

Para leitura em espectrofotômetro foi A lido como branco a solução de ácido sulfúrico 0,018 N e posteriormente as soluções A, B e C foram lidas a 350 nm. Com base nos valores de leitura, foi calculado a absorvidade molar de cada uma das soluções e o fator de correção do espectrofotômetro com as seguintes equações.

$$\varepsilon = \frac{A \times 1000}{\text{conc.}(mM)} \quad (1)$$

De acordo com os valores de absorvidade molar, foi calculado a absorvidade molar média (ε):

$$E = \frac{\varepsilon a + \varepsilon b + \varepsilon c}{3} \quad (2)$$

Com a absorvidade molar média é calculado o fator de correção do aparelho (FC), onde:

$$FC = \frac{\text{valor de } \varepsilon \text{ para H}_2\text{SO}_4}{E} \quad (3)$$

O fator de correção deve estar na faixa entre 0,95 e 1,05, caso o valor esteja fora desta faixa seria necessário repetir o procedimento de forma a verificar se houve erro no aparelho ou na técnica. Posteriormente, para calibrar o padrão de OTA, foi feita a dissolução do padrão da micotoxina em benzeno-ácido acético, para realizar a leitura em 350 nm.

A absorvidade molar da ocratoxina A com o comprimento de onda de 350 nm e em benzeno – ácido acético é 5.500.

4.2.3 Padrão de ocratoxina A

O padrão foi preparado a partir da solução obtida pela empresa Sigma com concentração de 75 $\mu\text{g/mL}$. Esta solução foi completamente evaporada em banho maria a 60°C. Após, foi dissolvida com 2 mL de benzeno. Em um novo recipiente, foi adicionado 500 μL da solução de OTA com benzeno e adicionou-se 1,5 mL de benzeno. Foi realizada a leitura em espectrofotômetro à 350 nm. A concentração da solução foi obtida através da equação 4.

$$\frac{\mu\text{g de micotoxina}}{\text{mL}} = \frac{A \times FC \times MM \times 1000}{E} \quad (4)$$

4.3 Padronização da contagem celular de leveduras

A levedura 4 em meio caldo Sabouraud foi inoculada e mantida por 24 horas a 25°C. Após, foram suspensos em NaCl 0,85% com auxílio de uma alça de platina previamente flambada em bico de Bunsen. A partir de uma cepa foram padronizados tubos com suspensão de células, e foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 600 nm, a fim de se obter uma absorbância de 0,100 e 0,150 nm.

O procedimento sucedeu em triplicata. Uma vez obtida a absorbância esperada, foram realizadas as respectivas contagens de células na câmara de Neubauer. O número de células foi encontrado através da seguinte equação:

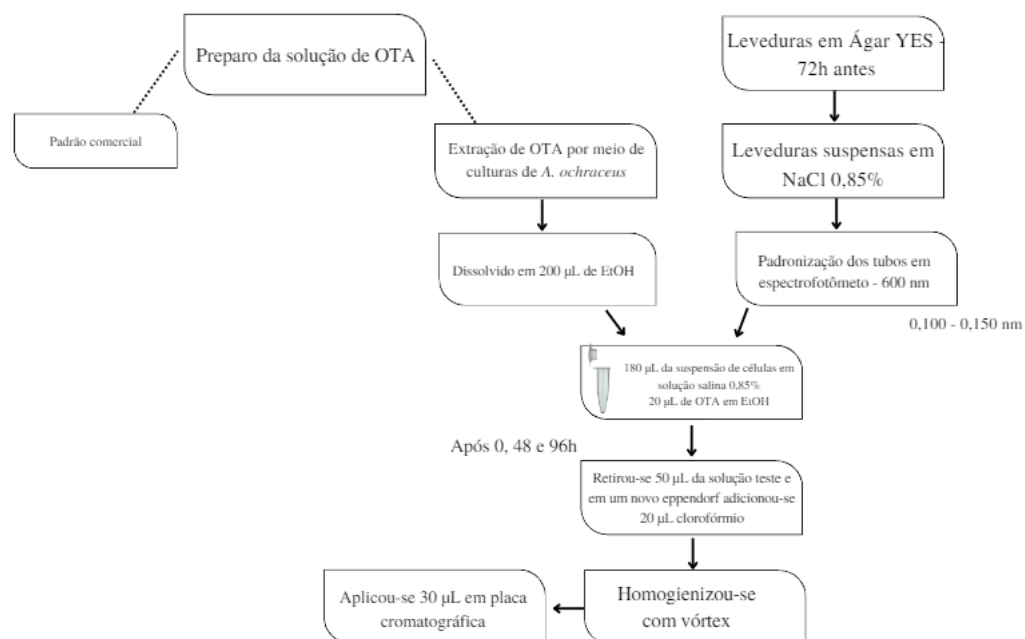
$$n^{\circ} \text{ de células} = \frac{n^{\circ} \text{ total de células}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes contatos}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000 \quad (5)$$

Sendo, o número total de células um valor obtido por meio da contagem direta em câmara de Neubauer, o n° de quadrantes contados é igual a 25 e 10.000 é equivalente ao volume da câmara (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2013).

4.4 Teste de degradação de ocratoxina A

Foi realizado dois testes de degradação, em que o primeiro foi prosseguido com o padrão comercial puro e o segundo com o extrato de OTA obtido em laboratório. No teste 2 todas as leveduras (MW01, MW06, MW09, PL3, PL8, L1, L2, L3 e L4) foram submetidas. O fluxograma abaixo apresenta o resumo do desenvolvimento do teste.

Fluxograma 2 - Etapas para o teste de degradação de OTA



Fonte: Autoria própria (2022).

A partir de uma cultura recente de células (72 horas) em ágar YES, as leveduras foram suspensas em NaCl 0,85% com auxílio de uma alça de platina previamente flambada em bico de Bunsen. O inóculo foi padronizado através da leitura em

espectrofotômetro a 600 nm, a fim de se obter uma absorbância entre 0,100 a 0,150 nm. Uma vez que, a absorbância de 0,100 nm corresponde aproximadamente à $1,00 \times 10^{+06}$ células. Com o extrato obtido por meio de culturas de *A. Ochraceus* foi preparado a solução de OTA ressuspendendo em 200 μ L de etanol.

Os testes de degradação sucederam em tubos de eppendorfs, sendo subdivididos em: positivo e negativo. Os tubos positivos eram compostos por 180 μ L da suspensão de células padronizadas em NaCl 0,85% e 20 μ L da solução de ocratoxina A. E, os tubos negativos eram compostos por 180 μ L da suspensão de células em NaCl 0,85% e 20 μ L de etanol (JIN *et al.*, 2018).

Os tubos foram acondicionados sob agitação (115 rpm) a 25 °C durante 5 dias. Os experimentos ocorreram de duas formas: o primeiro teste com coletas de 20 μ L de amostras nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas e o segundo com coletas de 50 μ L nos tempos 0, 48 e 96 horas.

Para coleta de amostra, foi retirado 50 μ L e acondicionado em um novo eppendorf. Em que foi adicionado 20 μ L de clorofórmio homogeneizado com vórtex e então analisado em cromatografia de camada delgada (JIN *et al.*, 2018).

4.5 Cromatografia de camada delgada

A placa cromatográfica foi ativada colocando-a em estufa a 100 °C por 30 minutos. Aplicou-se a 3 cm da base os pontos da amostra com distanciamento de 1 cm. As amostras foram aplicadas alternadamente com testes positivos e negativos, para obter uma leitura mais clara. A placa foi colocada em cuba cromatográfica contendo como fase móvel tolueno:acetato de etila:clorofórmio:ácido fórmico (70:50:50:20) (ONO *et al.*, 2007).

Fotografia 1 - Cromatografia de camada delgada



Fonte: Autoria própria (2022).

Após atingir 10 cm de corrida a placa foi removida e seca. A visualização foi realizada sob luz UV a 366 nm (ONO *et al.*, 2007). O parâmetro de monitoramento de reação utilizando CCD é o fator de retenção, que pode ser definido como a razão entre a distância percorrida pela mancha do componente e a distância percorrida pela fase móvel (BRONDANI, 2019).

$$rf = \frac{dc}{ds} \quad (6)$$

Sendo, dc a distância percorrida pelos componentes da mistura e ds distância percorrida pela fase móvel.

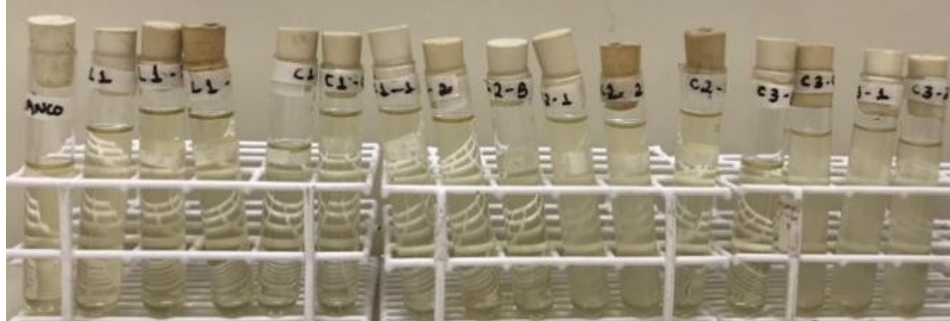
4.6 Teste de tolerância a metabissulfito de sódio

Para este teste foi utilizado o caldo Sabouraud, acidificado em ácido cítrico, pH 3,0. Onde foi acrescentado de acordo com a legislação brasileira, as concentrações de metabissulfito de sódio: 0,0225 g/mL, 0,030 g/mL e 0,0375 g/mL (BRASIL, 2016). Para verificar o desenvolvimento microbiano foi empregado como controle o mesmo meio de cultura, porém sem a adição de conservantes. Além disso, foram esterilizados separadamente, por autoclavagem, o metabissulfito de sódio e ácido cítrico, para se evitar, a hidrólise do ágar durante o aquecimento, com a perda do poder de gelificação e ainda no que se refere ao metabissulfito de sódio eventuais perdas por hidrólise ou evaporação (FAZIO, 2006).

A partir de uma cultura de leveduras cultivada 72 horas antes em caldo Sabouraud, foi preparado o padrão de inóculo para o teste. O inóculo foi padronizado

através da leitura em espectrofotômetro a 600 nm, a fim de se obter uma absorbância de aproximadamente 0,150.

Fotografia 2 - Ensaio do teste de resistência à metabissulfito de sódio



Fonte: Autoria própria (2022).

Em tubos de ensaios foram adicionados 4 mL de caldo Sabouraud e 1 mL do inóculo de células padronizado. O teste sucedeu em triplicada sob armazenamento à 25 °C durante 7 dias.

Ao fim, para averiguar a capacidade de crescimento depois da exposição ao metabissulfito de sódio, as leveduras foram semeadas em placas de Petri. As leveduras de cada tubo foram transferidas para respectivas placas com meio Sabouraud Dextrose Ágar sem adição de metabissulfito de sódio, acidificado com ácido cítrico, pH 3,5 à 25°C por 8 dias. Em que, a cada 24 horas, durante 5 dias foi averiguada a absorbância em espectrofotômetro a 600 nm das amostras.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Calibração do espectrofotômetro

Como apresenta a tabela 1, para assegurar a correta leitura da concentração da micotoxina é necessário realizar a calibração do equipamento.

Tabela 1 - Fator de correção espectrofotômetro

Solução	Absorbância (nm)	Absortividade molar $L. mol^{-1}. cm^{-1}$	Absortividade molar média $L. mol^{-1}. cm^{-1}$	Fator de correção
Ác. Sulfúrico	0	3.160		
A	0,147	2.352	3.291	0,960
B	0,467	3.736		
C	0,946	3.784		

Fonte: Autoria própria (2022).

O valor de FC deve estar entre 0,95 e 1,05, portanto o valor está adequado de acordo com a metodologia. A concentração dos padrões de ocratoxina A aplicada nos testes foram calculadas de acordo com os dados da tabela 1. Na totalidade foram preparados três padrões para suceder os testes, como podemos observar na seguinte tabela:

Tabela 2 - Soluções padrão de ocratoxina A

Solução	Absorbância (nm)	Concentração final ($\mu g/mL$)
1	0,192	17,8
2	0,284	35,3

Fonte: Autoria própria (2022).

O padrão 1 foi empregado nos testes com as leveduras MW01, MW06, MW09, PL3 e PL9. Contudo, não foi finalizado porque logo na primeira análise cromatográfica (CCD) a OTA não foi revelada. Nos testes com as leveduras 1, 2, 3 e 4 foi aplicado o padrão 2, sendo denominado teste 1. E, por fim, no segundo teste todas as leveduras foram submetidas com o extrato obtido através da metodologia 3.2.1.

5.2 Extração de OTA por meio de culturas de *A. Ochraceus*

O cultivo de *A. ochraceus* foi realizada em um tempo de 7 e 14 dias. Em que, alcançou-se um resultado positivo na cepa com o tempo de cultivo de 14 dias em meio sólido, como apresenta a fotografia a seguir:

Fotografia 3 - Leitura de amostras por CCD



Fonte: Autoria própria (2022).

Para conseguir avaliar a presença da OTA no extrato foi necessário fazer a leitura em placa cromatográfica comparando com o padrão puro. Na imagem, a OTA padrão é a solução adquirida pela empresa Sigma e ao lado o extrato de OTA com o tempo de cultivo de 14 dias em meio sólido. Este extrato foi utilizado para realizar os testes posteriores.

A ocratoxina A pode não ter sido expressa no período de 7 dias, porque metabólitos secundários normalmente são produzidos apenas no fim da fase de crescimento (USP, 2018), possivelmente para obter extratos mais concentrados de OTA, seria necessário prolongar o período de crescimento do microrganismo. Segundo Pardo *et al.* (2007), uma revisão que compilou o tempo de crescimento do

A. ochraceus em diferentes condições de cultivos, o tempo médio para o fungo produzir OTA são 18 dias.

A produção de OTA e crescimento do fungo pode ser afetada por fatores abióticos, como temperatura e atividade de água. Uma vez que os microrganismos possuem temperaturas ótimas de crescimento que pode ser diferente da temperatura para a produção da toxina (ABREU E NERY, 2015).

5.3 Teste de degradação de ocratoxina A

A cromatografia de camada delgada é uma metodologia adaptável para diferentes níveis de precisão e proporciona avaliar diversas toxinas em diferentes amostras simultaneamente (LEITE *et al.*, 2012). Por isso, esta técnica vem sendo recomendada para estudos devido a facilidade de aplicação e foi escolhida para investigar o comportamento da reação de degradação de OTA.

A capacidade das leveduras de remover OTA foi avaliada através de CCD, em que foi comparado os valores de r_f do controle positivo com as amostras testadas. Desta forma, na mesma placa foi aplicado o controle positivo (apenas a solução de ocratoxina A) e as amostras para fins de comparação. O objetivo era perceber a alteração dos fatores de retenção e desaparecimento do ponto de fluorescência que indica a presença da toxina.

Foram finalizados dois testes de degradação, o primeiro com as leveduras 1, 2, 3 e 4 e o segundo com as leveduras MW01, MW06, MW09, PL3, PL8, L1, L2, L3 e L4. Os valores de r_f (fator de retenção) das amostras avaliadas em CCD estão descritos na tabela 4. O r_f pode variar de acordo com a fase móvel, tempo de retenção e concentração da amostra. Na literatura, foram encontrados valores de r_f para ocratoxina A próximo de 0,660 (LEITE *et al.*, 2012). A seguir os fatores de retenção encontrados em cada teste:

Tabela 3 - Fator de retenção do experimento com ocratoxina A padrão

Tempo (h)	RF				
	L1	L2	L3	L4	C
0	0,690	0,690	0,690	0,690	0,690
24	0,550	0,560	0,575	0,575	0,550
48	0,640	0,625	0,610	0,600	0,620
72	0,660	0,630	0,630	0,640	0,630

Fonte: Aatoria própria (2022).

Os resultados na tabela 4 foram obtidos a partir do padrão 2 (tabela 2). Para conseguir avaliar a remoção da toxina a única fonte de carbono da levedura foi a OTA. Na tabela 4, o controle positivo (C) é utilizado como parâmetro para conseguir perceber o desenvolvimento da reação. Os fatores de retenção na tabela 4, no tempo de 96 horas, para L2 e L3 apresentam uma diferença entre 0 a 1,56% se comparar com o rf do controle. Portanto, estima-se que não houve remoção de OTA. Uma vez que o comportamento do rf não altera com a presença na levedura.

O comportamento do rf para L4 na tabela 4 é atípico se comparar com o controle. Contudo, não se pode afirmar que L4 removeu OTA observando apenas este teste, porque nas leituras das amostras não foram observados rastros de OTA. Além disso, como a amostra foi aplicada na lateral da placa pode correr de forma diferente devido às imperfeições na placa cromatográfica. No entanto, devido a variação do rf na levedura 4 é possível afirmar que houve uma atividade metabólica.

No segundo teste houve uma diferença entre os fatores de retenção se comparado com o primeiro teste, devido a interferência de outros solventes para obtenção do extrato. Uma vez que na solução pura não apresenta outros compostos (AMORIM, 2019). A tabela a seguir apresenta os dados adquiridos de todos os microrganismos testados:

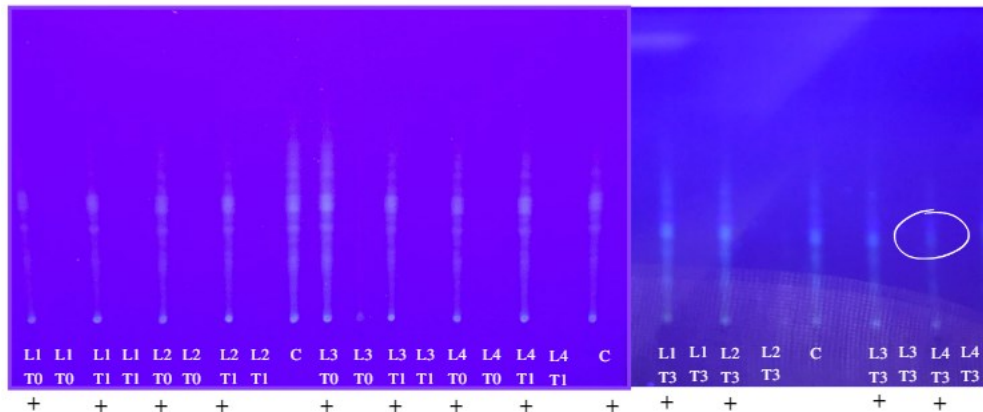
Tabela 4 - Fator de reatção do experimento com extrato de *A. ochraceus*.

Tempo	RF									
	MW01	MW06	MW09	PL3	PL8	L1	L2	L3	L4	C
0	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
48	0,38	0,40	0,38	0,37	0,40	0,40	0,40	0,36	0,34	0,40
96	0,38	0,40	0,36	0,36	0,40	0,40	0,40	0,34	-	0,40

Fonte: Aatoria própria (2022).

De acordo com a tabela 5, observa-se que as leveduras MW01, MW06, PL8, L1 e L2 apresentaram uma diferença média, no tempo de 96 horas, entre 0 a 1,50% se comparar com o rf do controle positivo. Desta forma, conclui-se que não houve nenhuma atividade de remoção da OTA. A imagem a seguir apresenta a leitura das amostras no tempo inicial (T0), em 48 horas (T1) e 96 horas (T3).

Fotografia 4 - Leitura das amostras das leveduras L1, L2, L3 e L4 por CCD



Fonte: Autoria própria (2022).

No tempo de 96 horas não foi detectado presença de OTA na amostra da L4. A remoção de OTA pode ter sido através da adsorção da micotoxina pela parede celular da levedura (compostas por manoproteínas e β -glucanas) (SÁNCHEZ, 2021). Para conseguir confirmar esta metabolização, em estudos posteriores deverá ser aplicado uma avaliação em espectrômetro de massa.

5.4 Curva de calibração de nº de células

A curva padrão de células foi necessária para realizar a padronização do inóculo de células nos experimentos a partir da leitura de absorbância em espectrofotômetro. Para cada absorbância realizou-se a contagem de células em câmara de Neubauer em triplicata. Os seguintes dados foram obtidos:

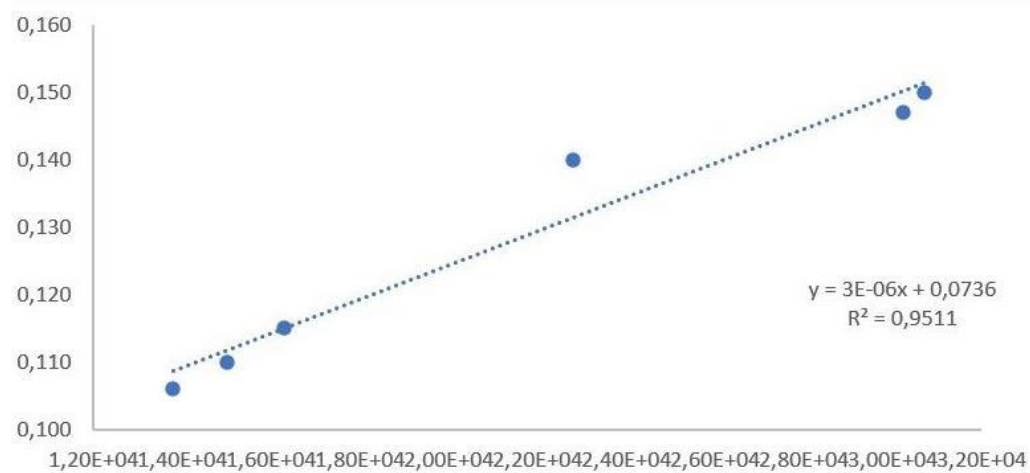
Tabela 5 - Relação entre absorbância e contagem de células

Absorbância esperada	Amostra	Absorbância	Contagem	Número de células
	Padrão	1.027	388	$1,55 \times 10^{+05}$
0,100	1	0,106	138	$1,38 \times 10^{+04}$
	2	0,110	150	$1,50 \times 10^{+04}$
	3	0,111	163	$1,50 \times 10^{+04}$
0,150	1	0,140	190	$2,28 \times 10^{+04}$
	2	0,150	256	$3,07 \times 10^{+04}$
	3	0,147	252	$3,02 \times 10^{+04}$

Fonte: Autoria própria (2022).

Com base nos dados adquiridos foi possível traçar uma relação entre as duas variáveis (absorbância e número de células por mililitro). Os resultados estão demonstrados no gráfico a seguir:

Gráfico 1 - Curva de calibração de nº de células



Fonte: Autoria própria (2022).

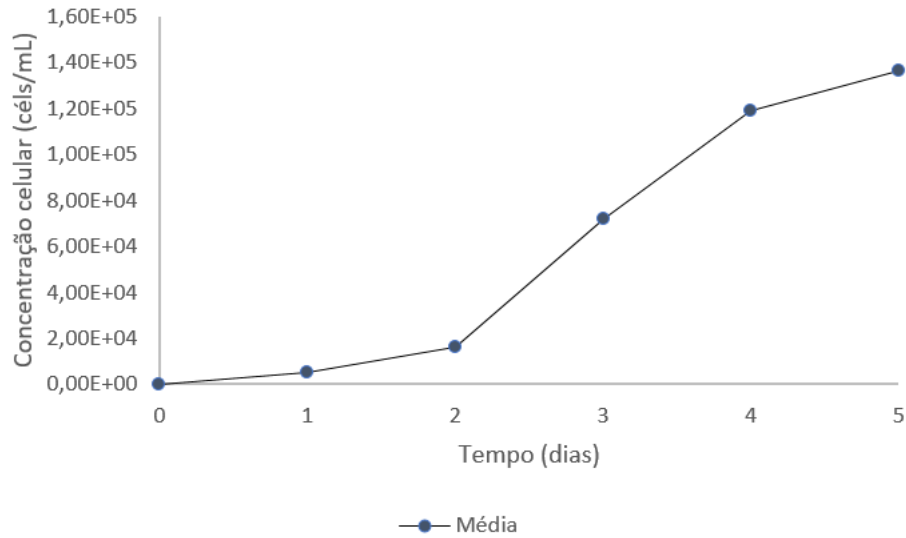
Portanto, como pode-se observar, a equação da reta para esta relação é:

$$y = 3 \times 10^{-06}x + 0,0736 \quad (7)$$

De acordo com a função matemática encontrada, este trabalho estimou os valores de contração celular (nº cél/mL), com base nos valores de absorbância obtidas de cada amostra (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE, 2012).

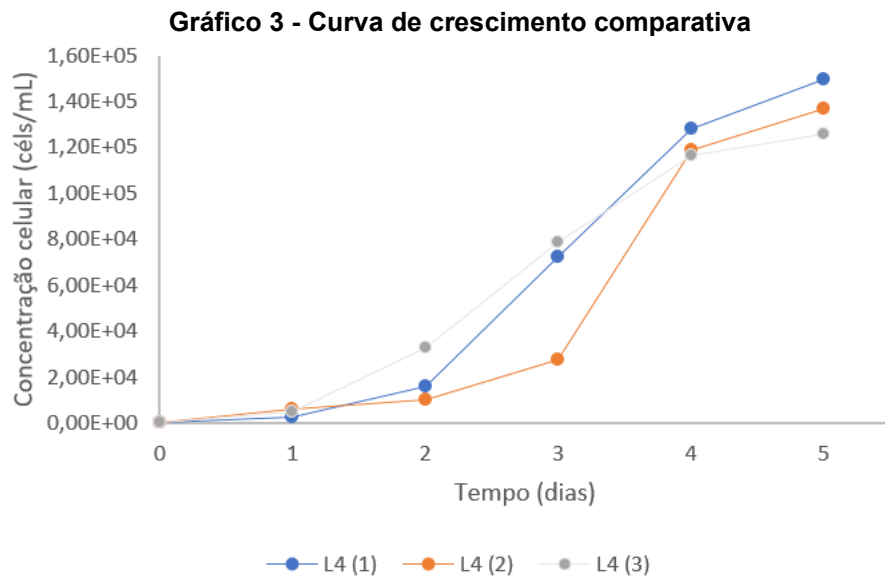
5.5 Teste de tolerância a metabissulfito de sódio

Para suceder este teste, a levedura 4 foi eleita uma vez que obteve o melhor desempenho no teste anterior. A capacidade do microrganismo tolerar a presença de um aditivo químico foi avaliada através de uma curva de crescimento celular. O comportamento celular foi delineado a partir dos resultados obtidos através da leitura diária das amostras em triplicata.

Gráfico 2 - Curva de crescimento sem adição de metabissulfito de sódio

Fonte: Autoria própria (2022).

A curva de crescimento da levedura 4 no gráfico 2 refere-se ao método experimental descrito no item 3.7. Esta curva foi traçada sem adição de metabissulfito em triplicata para validação da metodologia. O gráfico a seguir trata-se da curva de crescimento celular comparando as diferentes condições de crescimento celular.



Fonte: Autoria própria, (2022).

No gráfico 6 L4(1) refere-se a curva sucedeu com adição de 0,0225 g/mL, L4 (2) com adição de 0,030 g/mL e L4 (3) na condição de 0,0375 g/mL. Pode-se observar que, na curva L4 (1) houve uma redução da concentração de células final de 22,3% em relação a curva padrão (sem adição de metabissulfito de sódio). Além disso, há uma diferença no comportamento de crescimento celular da curva.

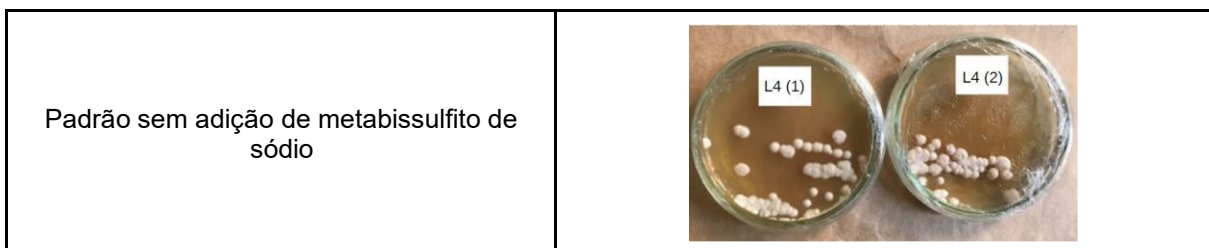
A curva de crescimento com adição de 0,030 g/mL de metabissulfito de sódio apresentou uma diferença da concentração final de células de 4,3% se comparado com a curva padrão. Por fim, a curva com adição de 0,0375 g/mL expôs um decréscimo de 15,8%. Desta forma, conclui-se que, na concentração de 0,030 g/mL de metabissulfito de sódio, o impacto no crescimento celular foi menor se comparado às outras concentrações.

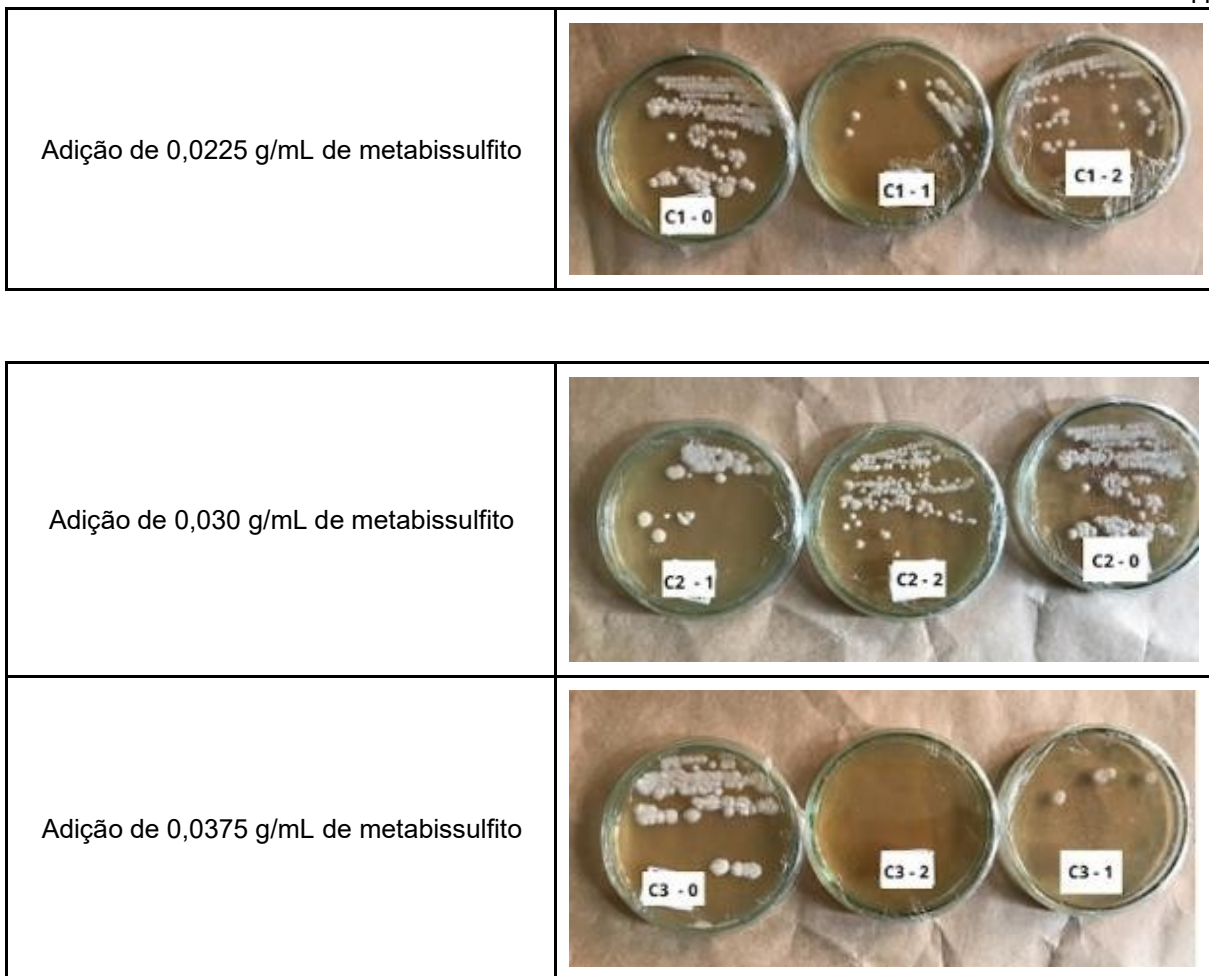
O metabissulfito de sódio se dissocia em três espécies moleculares quando adicionado em solução aquosa: SO_2 molecular, a espécie antimicrobiana mais ativa; bissulfito (HSO_3^-); e sulfito (SO_3^{2-}). O fator predominante para o equilíbrio químico entre as espécies é o pH da solução, o SO_2 molecular é predominante de pH 0 a 2, bissulfito de pH 2 a 7 e sulfito de pH 7 a 10. O SO_2 pode inibir o crescimento microbiano porque interfere nos metabólitos da glicólise e se liga à glicose, diidroxiacetona fosfato, piruvato, acetaldeído, ácido oxaloacético e ácido alfa-cetoglutárico, impedindo que sejam utilizados como substratos para vias metabólicas. A tolerância ao SO_2 varia de acordo com cada espécie de levedura (BASSI *et al.*, 2014).

Para explicar a tolerância desta levedura ao metabissulfito de sódio, seria necessário fazer outros testes e avaliar a interação em uma fermentação alcoólica com a *S. cerevisiae*.

A adição de metabissulfito de sódio na concentração mandatória das leis brasileiras (BRASIL, 2016), não causou impacto no crescimento da levedura. No entanto, o SO_2 poderia impedir a capacidade do microrganismo de continuar crescimento sob condições normais (sem adição de metabissulfito de sódio). Desta forma, em condições assépticas para cada teste foi feito o estriamento em placas de Petri, o crescimento após está ilustrado no quadro 1:

Quadro 1 - Crescimento da levedura 4





Fonte: Autoria própria (2022).

Todas as placas de Petri apresentaram um crescimento positivo padrão, desta forma pode-se afirmar que a levedura é capaz de manter o crescimento celular depois de ser submetida ao aditivo químico em questão. No entanto, as placas de Petri das leveduras que estiveram na concentração de 0,0375 g/mL de metabissulfito de sódio, não apresentaram um crescimento padrão em comparação com as três placas de Petri. Portanto, o resultado para esta condição de crescimento microbiano é inconclusivo.

O objetivo do teste de resistência ao metabissulfito de sódio foi concluído apesar de ter variações dos resultados entre as diferentes condições, uma vez que o aditivo químico não impacta de forma significativa a concentração celular final. De forma geral, em todos os testes a levedura 4 obteve o maior destaque, sendo potencialmente capaz em metabolizar a ocratoxina A e removê-la.

6 CONSIDERAÇÃO FINAIS

Com base na execução da metodologia prática foi possível atingir o objetivo geral e os específicos. Foi realizada a padronização dos testes de biodegradação de OTA por leveduras. Em futuros estudos, as condições de análises podem ser aprimoradas com a adição de micronutrientes a fim de reduzir a condição de estresse do microrganismo.

Na metodologia proposta foi elencada a levedura 4 com um determinado potencial remoção de ocratoxina A. O desempenho desta levedura poderá ser validado com a repetibilidade dos testes. Além disso, é factível afirmar que a concentração permitida de metabissulfito de sódio na legislação vigente não impacta de forma o crescimento celular. Esta afirmação é importante, uma vez confirmada a capacidade de degradação de OTA por meio da levedura 4, o microrganismo poderia ser um potencial agente de biocontrole de micotoxinas para indústria vinícola.

De forma geral, o presente trabalho contribui para evidenciar uma metodologia alternativa no controle de micotoxinas. Embora a degradação de OTA por microrganismos não tenha sido confirmada, foi possível compreender as condições de produção da toxina, condições de crescimento celular com diferentes concentrações de aditivo químico e melhorias para futuros trabalhos.

REFERÊNCIAS

ABREU E NERY, Abiah Narumy Ido de. **Efeito de óleos essenciais sobre o desenvolvimento de *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius* e na síntese de ocratoxina A**. 2015. Tese (Doutora em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, [S. l.], 2015. Disponível em: http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/10691/2/TESE_Efeito%20de%20óleos%20e%20essenciais%20sobre%20o%20desenvolvimento%20de%20Aspergillus%20ochraceus%20e%20Aspergillus%20carbonarius%20e%20na%20s%20s%20ADntese%20de%20ocratoxina%20A.pdf. Acesso em: 18 set. 2022.

ANDRADE, Mariane Aisse. **Determinação de ocratoxina A em vinho utilizando microextração em fase sólida no tubo e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas sequencial**. 2016. 82 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75135/tde-26042016-140737/publico/MarianeAissaAndraderevisada.pdf>. Acesso em: 30 mar. 2022.

ANDRADE, Mariane A.; LANÇAS, Fernando M. Estado-da-arte na análise cromatográfica de Ocratoxina A em amostras de alimentos. **Scientia Chromatographica**, [S. l.], p. 31-52, 25 jun. 2015. Disponível em: <https://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v7n1a02.pdf>. Acesso em: 18 abr. 2022.

AMORIM, Antuônia Fádía Valentim de. **Métodos cromatográficos**. 1. ed. Fortaleza: UECE, 2019. 84 p. Disponível em: <https://educapes.capes.gov.br/bitstream/capes/559763/2/Livro%20M%C3%A9todos%20Cromatogr%C3%A1ficos.pdf>. Acesso em: 3 dez. 2022.

ABREU, Priscila Silva de. **Incidência de ocratoxina A em vinhos e avaliação da exposição dos consumidores**. 2013. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013. Disponível em: http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/681/3/DISSERTACAO_Incidência%20de%20Ocratoxina%20A%20em%20vinhos%20e%20avaliação%20da%20exposição%20dos%20consumidores.pdf. Acesso em: 28 mar. 2022.

ABRUNHOSA, Luís; INÊS, António; RODRIGUES, Ana; GUIMARÃES, Ana; PEREIRA, Vânia L.; PARPOT, Pier; MENDES-FAIA, Arlete; VENÂNCIO, Armando. Biodegradation of ochratoxin A by *Pediococcus parvulus* isolated from Douro wines: International Journal of Food Microbiology. **Elsevier**, [s. l.], p. 45-52, 23 jul. 2014. Disponível em: https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/32514/1/document_17889_1.pdf. Acesso em: 31 mar. 2022.

BASSI, A.P.G.; PARALUPPI, A.L.; REIS, V.R.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Potassium metabisulphite as a potential biocide against *Dekkera bruxellensis* in fuelethanol fermentations. **Applied Microbiology**, [s. l.], 25 nov. 2014. DOI <https://doi.org/10.1111/lam.12363>. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/lam.12363>. Acesso em: 18 set. 2022.

BEZERRA, Carolina dos Santos. **Seleção de leveduras isoladas de uvas e mostos com atividades enzimáticas para melhoramento de vinhos**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista, [S. l.], 2012. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/99045/bezerra_cs_me_sjrp.pdf;jsessionid=303FDF7C6E4E87CC660D1FD89810E54A?sequence=1. Acesso em: 2 jun. 2022

BRASIL, Ministério da Saúde. Decreto nº N°7, de 18 de fevereiro de 2011. **Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**. [S. l.], 18 fev. 2011. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html. Acesso em: 20 mar. 2022

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto-Lei nº Lei nº 7.678, Decreto nº 8.198, de 20 de fevereiro de 2014. Aplica-se ao vinho e derivados da uva e do vinho comercializados em todo o território nacional, produzidos no Brasil e importados. **Vinho e derivados da uva e do vinho**, [S. l.], 20 fev. 2014. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/instrucao-normativa-no-14-de-8-de-fevereiro-de-2018.pdf>. Acesso em: 2 jun. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. Aditivos alimentares. **Aditivos alimentares: Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego**, Brasília, 27 out. 1997. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/1/1997/prt0540_27_10_1997.html. Acesso em: 28 ago. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº RDC nº 123, de 4 de outubro de 2016. Aditivos alimentares para uso em vinhos. **Aditivos alimentares e os coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em vinho**., Brasília, 4 out. 2016. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2016/rdc0123_04_11_2016.pdf. Acesso em: 28 ago. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto nº N°7, de 18 de fevereiro de 2011. **Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**. [S. l.], 18 fev. 2011. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html. Acesso em: 23 mar. 2022. (PARÁGRAFO 5)

BRONDANI, Patrícia Bulegon. Cromatografia de camada delgada. *In*: BRONDANI, Patrícia Bulegon. **Cromatografia de camada delgada**. [S. l.]: Universidade Federal de Santa Catarina, 19 jun. 2019. Disponível em: <https://patyqmc.paginas.ufsc.br/files/2019/07/Cromatografia-de-Camada-Delgada.pdf>. Acesso em: 17 set. 2022

CARÃO, Ágatha Cristina de Pinho; BURBARELLII, Maria Fernanda de Castro; POLYCARPO, Gustavo do Valle; SANTOS, Amanda Ramos dos; ALBUQUERQUE, Ricardo de; OLIVEIRA, Carlos Augusto Fernandes de. **Métodos físicos e químicos de detoxificação de aflatoxinas e redução da contaminação fúngica na cadeia produtiva avícola**. Ciência Rural, Santa Maria, v. 44, p. 699-705, 1 abr. 2014. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/cr/a/D8cKtVncKwPLw9yLSJSzmjD/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 31 mar. 2022.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. **Regulamento (CE) nº 1881/2006 nº 1881**, de 19 de dezembro de 2006. Nº 3 do artigo 2. Fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, [S. l.], p. 1-39, 19 dez. 2006. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1881-20160401&from=CS>. Acesso em: 19 abr. 2022.

CORRÊA, Isabela Pauluk. **Avaliação de leveduras no controle pós-colheita *Aspergillus sp.* em grão de café**. Orientador: Ida Chapaval Pimentel. 2019. 66 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/62257/R%20-%20T%20-%20ISABELA%20PAULUK%20CORREA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 22 mar. 2022.

COSTA, Carmen Luiza de Azevedo. **Impacto do uso de fungicidas na produção de Ocratoxina A por *Aspergillus carbonarius* e na fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae***. 2019. 98 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade do Rio Grande, Rio Grande, 2019. Disponível em: https://ppgqta.furg.br/images/2020/Carmen_Luiza_de_Azevedo_Costa.pdf. Acesso em: 31 mar. 2022.

DACHERY, Bruna. **Efeito das etapas de elaboração do vinho Carbernet Sauvignon sobre**. 2015. 56 p. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/129780/000973776.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 26 mar. 2022.

DUARTE, Thamara de Lemos. **Ocratoxina A em alimentos e bebidas: uma revisão bibliográfica**. 2010. 34 p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [S. l.], 2010. Disponível em: [000770272.pdf \(ufrgs.br\)](#). Acesso em: 22 mar. 2022.

EMBRAPA (Brasília). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2006. **Controle Biológico**, Brasília, p. 1, 9 mar. 2006. Disponível em: https://www.embrapa.br/documents/1355163/1994475/fold06-08_controleBiologico.pdf/71cf43ce-0f8e-46da-ac5a-4c76688170e5. Acesso em: 8 mar. 2022.

EMBRAPA (Brasília). Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Fungicidas I: utilização no controle químico de doenças e sua ação contra os fitopatógeno**. Controle químico, [s. l.], ano 1999, p. 5-24, 10 dez. 1999. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/704072>. Acesso em: 19 abr. 2022.

EMBRAPA (Brasília). Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Ozônio: tecnologia para controle de pragas em grãos armazenados**. Controle químico, [S. l.], p. 3-6, 17 out. 2006. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/18005306/ozonio-tecnologia-para-controle-de-pragas-em-graos-armazenados>. Acesso em: 19 abr. 2022.

EMBRAPA (São Paulo). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Aplicação da radiação ultravioleta-C para controle da podridão peduncular do mamão**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, [s. l.], ed. 1º, p. 1-20, 1 out. 2019. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1111457/1/RadiacaoUltravioletaMamaoTerao2019.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2022.

FAZIO, Maria Luiza Silva. **Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em polpas congeladas de frutas**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista, [S. l.], 2006. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/88391/fazio_mls_me_sjrp.pdf;jsessionid=8BBA18282989B9BA4758AF3E07925691?sequence=1. Acesso em: 11 set. 2022.

FONTES, Eliana Maria Gouveia; VALADARES-INGLIS, Maria Cleria. **Controle biológico de pragas da agricultura**. 1º. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2020. ISBN 978-65-86056-01-3. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/212490/1/CBdocument.pdf>. Acesso em: 4 dez. 2022.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (United States). FDA. **CVM Annual Report on Mycotoxins in Animal Food Report for Fiscal Year. Division of Animal Feeds**, [s. l.], ano 2016, p. 1-11, 1 out. 2015. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/130526/download>. Acesso em: 19 abr. 2022.

FUNDAÇÃO HEINRICH BÖLL (Alemanha). **Pestizidatlas. Fatos e números sobre toxinas na agricultura**, Alemanha, 2022. Disponível em: https://www.boell.de/sites/default/files/2022-01/Pestizidatlas2022_Web_20220108.pdf. Acesso em: 23 mar. 2022.

GUIMARÃES, Thais Martins. **Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, [S. l.], 2005. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/1919/R%20-%20D%20-%20THAIS%20MARTINS%20GUIMARAES.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 2 jun. 2022.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). Instituto Adolfo Lutz; ZENEON, Odair; PASCUET, Neus Sadocco. **Métodos físico-químicos para análise em alimentos**. 5ª edição. ed. [S. l.: s. n.], 2008. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/nutricaoobromatologia/files/2013/07/NormasADOLFOLUTZ.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2022.

JIN, Haiyan; HIRAOKA, Yoshiko; OKUMA, Yurie; HASHIMOTO, Elisabete Hiromi; KURITA, Miki; ANAS, Andrea Roxanne; UEMURA, Hitoshi; TSUJI, Kiyomi; HARADA,

Ken-Ichi. Microbial Degradation of Amino Acid-Containing Compounds Using the Microcystin-Degrading Bacterial Strain B-9. **Marine drugs**, [s. l.], 6 fev. 2018. DOI 10.3390/md16020050. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-3397/16/2/50>. Acesso em: 12 jun. 2022.

JÚNIOR, Silas Dimas da Silva. Produção de etanol e comparação de rendimento a partir de subespécies de cana-de-açúcar. *In*: JÚNIOR, Silas Dimas da Silva. **Produção de etanol e comparação de rendimento a partir de subespécies de cana-de-açúcar**. 2019. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Farmácia) - Universidade de Uberaba, [S. l.], 2019. Disponível em: <https://repositorio.uniube.br/bitstream/123456789/1615/1/SILAS%20DIMAS%20DA%20SILVA%20JÚNIOR.pdf>. Acesso em: 13 jun. 2022.

KUPSKI, Larine. **Degradação de Ocratoxina A: Estudo de processo e toxicidade**. 2015. 129 p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015. Disponível em: <http://repositorio.furg.br/bitstream/handle/1/6366/tese%20larine%20%2018.12.pdf?sequence=1>. Acesso em: 30 mar. 2022

LEITE, Clarice Caldeira; GARDA-BUFFON*, Jaqueline; FAGUNDES, Carlos Alberto; BADIALE-FURLONG, Eliana. Análises quali e quantitativas de micotoxinas em águas da cadeia produtiva do arroz por CCD e CCDAE. *Micotoxinas*, **Química nova**, v. 35, 17 jul. 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jqn/a/bxjHKWm4fXnRpK8gCcJFkgz/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 17 set. 2022.

LÓPEZ, Ana Maria Queijeiro; LIMA-COELHO, Sheyla Ferreira; FERREIRA, Luis Fernando Romanholo. Efeito in vitro de concentrações de metabisulfito de sódio, benzoato de sódio e sorbato de potássio sobre fungos termorresistentes. *Aditivos químicos*, **Rev Inst Adolfo Lutz**, p. 215-223, 11 ago. 2009. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/ses-sp/2009/ses-16214/ses-16214-1345.pdf>. Acesso em: 28 ago. 2022.

LOPES, Noelly Alves. **Atividade ocratoxigênica de Aspergillus carbonarius e Aspergillus niger na presença de dois isolados bacterianos**. 2013. 52 p. Tese (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013. Disponível em: http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/1161/2/DISSERTAÇÃO_Utilização%20de%20aditivos%20bacterianos%20no%20processo%20de%20compostagem%20e%20análise%20de%20sucessão%20microbiana%20por%20HRM.pdf. Acesso em: 27 mar. 2022.

LUCON, Cleusa Maria Montanello *et al.* Trichoderma. **Controle biológico**. Trichoderma: o que é, para que serve e como usar corretamente na lavoura., São Paulo, ano 2014, ed. 1º, p. 28, 1 jun. 2014. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/files/pdf/cartilhas/trichoderma.pdf>. Acesso em: 22 mar. 2022.

MILLER, Gail Lorenz. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical chemistry**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 426-428, 28 mar. 1959. DOI <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>. Disponível em: [https://www.scirp.org/\(S\(i43dyn45teexjx455qlt3d2q\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1408039](https://www.scirp.org/(S(i43dyn45teexjx455qlt3d2q))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1408039). Acesso em: 10 jun. 2022.

MORRIS, M. J.; WOOD, A. R.; BREEÿEN, A. den. Plant pathogens and biological control of weeds in South Africa: a review of projects and progress during the last decade. **African Entomology Memoir**, v. 1, p. 129-137, 1999

NASCIMENTO, Ronaldo Ferreira do; LIMA, Ari Clecius Alves de; VIDAL, Carla Bastos; MELO, Diego de Quadros; RAULINO, Giselle Santiago Cabral. **Adsorção: Aspectos teóricos e aplicações ambientais**. [S. l.]: UFC, [2014]. 13-221 p. Disponível em: https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/10267/1/2014_liv_rfdnascimento.pdf. Acesso em: 20 abr. 2022.

NICOLAU, Mariana Carla. **Biocontrole de Fusarium verticillioides em milho e trigo**. Orientador: Margarida Masami Yamaguchi. 2014. 37 p. Trabalho de conclusão de curso (Tecnólogo em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2014. Disponível em: https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/12442/3/LD_COALM_2013_2_011.pdf. Acesso em: 24 mar. 2022.

NIEDERAUER, Mariana. 140 toneladas de uvas passas contaminadas são interceptadas pela Vigilância Agropecuária. **Correio Brasiliense**, Brasília, 11 dez. 2020. Segurança alimentar, p. 1-2. Disponível em: <https://www.correiobrasiliense.com.br/brasil/2020/12/4894317-140-toneladas-de-uvas-passas-contaminadas-sao-interceptadas-pela-vigilancia-agropecuaria.html>. Acesso em: 23 abr. 2022.

OLIVEIRA, Maria Carolina dos Santos. **Avaliação do processo de fermentação alcoólica de suco de maçã obtido por liquefação enzimática**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006. Disponível em: <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp091758.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2022.
ONO, Elisabete Yurie Sataque; BERND, Luciana Pereira; FUJII, Simone; RIBEIRO, Ricardo Marcelo Reche; HASHIMOTO, Elisabete Hiromi; HIROOKA, Elisa Yoko. **Princípios básicos para análise de micotoxinas**. Londrina: [s. n.], 2007. p. 1-55. ISBN 978-85-98196-62-6.

PARDO, E.; MARÍN, S.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Ecophysiology of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* isolates. Predictive models for fungal spoilage prevention - a review. **Food Additives and Contaminants**, Spain, p. 398-410, 20 fev. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16546886/>. Acesso em: 11 set. 2022.

PICANÇO, Marcelo Coutinho. **Manejo integrado de pragas**. Controle de pragas, Viçosa, p. 166-189, 7 jun. 2010. Disponível em: https://www.ica.ufmg.br/wp-content/uploads/2017/06/apostila_entomologia_2010.pdf. Acesso em: 20 abr. 2022.

REVISTA FOOD INGREDIENTS BRAZIL (Brazil). **Micotoxinas**, [S. l.], n. nº 7, p. 32-40, 2009. Disponível em: https://revista-fi.com.br/upload_arquivos/201606/2016060379366001465583508.pdf. Acesso em: 23 abr. 2022.

RUETER, Gero; DAMASCENO, Marcio. Relatório destaca uso no Brasil de pesticidas vetados na União Europeia. *In*: RUETER, Gero; DAMASCENO, Marcio. Relatório destaca uso no Brasil de pesticidas vetados na União Europeia. [S. l.]: **Made for Minds**, 13 jan. 2022. Disponível em: <https://www.dw.com/pt-br/relatório-destaca-uso-no-brasil-de-pesticidas-proibidos-pela-ue/a-60404475>. Acesso em: 24 mar. 2022.

SÁNCHEZ, Verónica Carrasco. Ochratoxins in Wines. *In*: SÁNCHEZ, Verónica Carrasco. **Ochratoxins in Wines**. Schoraly Community Encyclopedia, 13 jul. 2021. Disponível em: <https://encyclopedia.pub/entry/11991>. Acesso em: 18 set. 2022.

DOS SANTOS, Custódio Donizete; DE ABREU, Angelita Duarte; PAIVA, Luciano Vilela. **Bioquímica Experimental**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2005. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/41375/1/TA%2054%20-%20Bioqu%C3%ADmica%20experimental.pdf>. Acesso em: 18 set. 2022.

SCHMIDT, Flavio Ervino. Brasil encerra 2021 com 562 agrotóxicos liberados, sendo 33 inéditos. [S. l.]: **Editora O Presente**, 20 jan. 2022. Disponível em: <https://opresenterural.com.br/brasil-encerra-2021-com-562-agrotoxicos-liberados-sendo-33-ineditos/>. Acesso em: 22 mar. 2022.

SILVA, Caroline Schultz. **Métodos de prevenção e controle do fungo *Aspergillus* em alimentos: Revisão bibliométrica**. 2021. 37 p. Tese (Bacharelado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual do Rio Grande, Caxias do Sul, 2021. Disponível em: https://repositorio.uergs.edu.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/1905/_maetodos_de_prevenacao_e_controle_do_fungo_aspergillus_em.pdf?sequence=-1&isAllowed=y. Acesso em: 30 mar. 2022.

SILVA, Juliana Regina da. Fungos: **Estratégias de descontaminação por plasma a frio e ozônio gasoso na segurança de alimentos extrusados**. 2019. Tese (Doutora em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, [S. l.], 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/211546/PCAL0459-T.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>. Acesso em: 19 abr. 2022.

SOUZA, Sirlei Cristina De. **Crescimento de *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* e produção de ocratoxina A** em meio de cultura sintético e a base de produtos agrícolas. 2014. Dissertação (Mestrado em microbiologia agrícola) - Universidade Federal de Lavras, [S. l.], 2014. Disponível em: http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/2648/2/DISSERTACAO_Crescimento%20de%20Aspergillus%20carbonarius%20e%20Aspergillus%20ochraceus%20e%20produção%20de%20ocratoxina%20A%20em%20meio%20de%20cultura%20sintético%20e%20a%20base%20de%20produtos%20agr%C3%ADcolas.pdf. Acesso em: 11 set. 2022.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (Rio Grande do Sul). Departamento de microbiologia. **Culturas celulares e suas aplicações em Microbiologia**. In: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (Rio Grande do Sul). Rio Grande do Sul, 18 jun. 2013. Disponível em: https://www.ufrgs.br/labvir/material/contagem_celulas.pdf. Acesso em: 17 set. 2022.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE (Sergipe). Estatística. **Correlação linear**: Regressão linear pelo estudo da correlação e utilização dos mínimos quadrados. [S. l.], 10 jul. 2012. Disponível em: https://cesad.ufs.br/ORBI/public/uploadCatalogo/09222427022012Bioestatistica_Aula_10.pdf. Acesso em: 17 set. 2022.

USP (São Paulo). Departamento de Bioquímica. **Metabolismo de microrganismos: Fungos e bactérias**. In: USP (São Paulo). [S. l.], 15 ago. 2018. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/1134575/mod_resource/content/0/Teorica%2007%20-%20Metabolismo%20fungos%20e%20bactérias%202016%20a.pdf. Acesso em: 11 set. 2022.

WELKE, Juliane E.; HOELTZ, Michele; DOTTORI, Horacio A.; NOLL, Isa B. Determination of ochratoxin a in wine by high-performance thin-layer chromatography using charged coupled device. **Scielo Brasil**, [s. l.], 3 dez. 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbchs/a/vx6xzZGy9HzpD8LPbFmrRQf/?lang=en>. Acesso em: 17 set. 2022.

ZENEBON, Odair; PASCUET, Neus Sadocco; TIGELA, Paulo. Métodos Físicos-Químicos para análise de Alimentos. In: ZENEBON, Odair; PASCUET, Neus Sadocco; TIGELA, Paulo. **Métodos Físicos-Químicos para análise de Alimentos**. 4^o. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. cap. XXIV, p. 755-797. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/nutricaoobromatologia/files/2013/07/NormasADOLFOLUTZ.pdf>. Acesso em: 24 maio 2022.

APÊNDICE A – Meios de cultura

Apêndice 01. Meio YES

Reagente	<i>g. l⁻¹</i>
Sacarose	150,0
Extrato de levedura	20,0
Ágar	15,0

Apêndice 02. Meio Batata Dextrose Ágar

Reagente	<i>g. l⁻¹</i>
Extrato de batata	4,0
Dextrose	20,0
Ágar	15,0

Apêndice 03. Caldo Sabouraud

Reagente	<i>g. l⁻¹</i>
Caldo Sabouraud	39,0

Apêndice 04. Sabouraud Dextrose Ágar

Reagente	<i>g. l⁻¹</i>
Sabouraud Dextrose Ágar	69,0

ANEXO A - Lei n. 9.610, de 19 de fevereiro de 1998



**Presidência da República
Casa Civil
Subchefia para Assuntos Jurídicos**

LEI Nº 9.610, DE 19 DE FEVEREIRO DE 1998¹.

Altera, atualiza e consolida a legislação sobre direitos autorais e dá outras providências.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA Faço saber que o Congresso Nacional decreta e eu sanciono a seguinte Lei:

Título I - Disposições Preliminares

Art. 1º Esta Lei regula os direitos autorais, entendendo-se sob esta denominação os direitos de autor e os que lhes são conexos.

Art. 2º Os estrangeiros domiciliados no exterior gozarão da proteção assegurada nos acordos, convenções e tratados em vigor no Brasil.

Parágrafo único. Aplica-se o disposto nesta Lei aos nacionais ou pessoas domiciliadas em país que assegure aos brasileiros ou pessoas domiciliadas no Brasil a reciprocidade na proteção aos direitos autorais ou equivalentes.

Art. 3º Os direitos autorais reputam-se, para os efeitos legais, bens móveis.

Art. 4º Interpretam-se restritivamente os negócios jurídicos sobre os direitos autorais.

Art. 5º Para os efeitos desta Lei, considera-se:

I - publicação - o oferecimento de obra literária, artística ou científica ao conhecimento do público, com o consentimento do autor, ou de qualquer outro titular de direito de autor, por qualquer forma ou processo;

II - transmissão ou emissão - a difusão de sons ou de sons e imagens, por meio de ondas radioelétricas; sinais de satélite; fio, cabo ou outro condutor; meios óticos ou qualquer outro processo eletromagnético;

III - retransmissão - a emissão simultânea da transmissão de uma empresa por outra;

IV - distribuição - a colocação à disposição do público do original ou cópia de obras literárias, artísticas ou científicas, interpretações ou execuções fixadas e fonogramas, mediante a venda, locação ou qualquer outra forma de transferência de propriedade ou posse;

V - comunicação ao público - ato mediante o qual a obra é colocada ao alcance do público, por qualquer meio ou procedimento e que não consista na distribuição de exemplares;

VI - reprodução - a cópia de um ou vários exemplares de uma obra literária, artística ou científica ou de um fonograma, de qualquer forma tangível, incluindo qualquer armazenamento permanente ou temporário por meios eletrônicos ou qualquer outro meio de fixação que venha a ser desenvolvido;

VII - contrafação - a reprodução não autorizada;

VIII - obra:

a) em co-autoria - quando é criada em comum, por dois ou mais autores;

b) anônima - quando não se indica o nome do autor, por sua vontade ou por ser desconhecido;

c) pseudônima - quando o autor se oculta sob nome suposto;

d) inédita - a que não haja sido objeto de publicação;

e) póstuma - a que se publique após a morte do autor;

f) originária - a criação primígena;

g) derivada - a que, constituindo criação intelectual nova, resulta da transformação de obra originária;

h) coletiva - a criada por iniciativa, organização e responsabilidade de uma pessoa física ou jurídica, que a publica sob seu nome ou marca e que é constituída pela participação de diferentes autores, cujas contribuições se fundem numa criação autônoma;

i) audiovisual - a que resulta da fixação de imagens com ou sem som, que tenha a finalidade de criar, por meio de sua reprodução, a impressão de movimento, independentemente dos processos de sua captação, do suporte usado inicial ou posteriormente para fixá-lo, bem como dos meios utilizados para sua veiculação;

IX - fonograma - toda fixação de sons de uma execução ou interpretação ou de outros sons, ou de uma representação de sons que não seja uma fixação incluída em uma obra audiovisual;

X - editor - a pessoa física ou jurídica à qual se atribui o direito exclusivo de reprodução da obra e o dever de divulgá-la, nos limites previstos no contrato de edição;

XI - produtor - a pessoa física ou jurídica que toma a iniciativa e tem a responsabilidade econômica da primeira fixação do fonograma ou da obra audiovisual, qualquer que seja a natureza do suporte utilizado;

XII - radiodifusão - a transmissão sem fio, inclusive por satélites, de sons ou imagens e sons ou das representações desses, para recepção ao público e a transmissão de sinais codificados, quando os meios de decodificação sejam oferecidos ao público pelo organismo de radiodifusão ou com seu consentimento;

XIII - artistas intérpretes ou executantes - todos os atores, cantores, músicos, bailarinos ou outras pessoas que representem um papel, cantem, recitem, declamem, interpretem ou executem em qualquer forma obras literárias ou artísticas ou expressões do folclore.

Art. 6º Não serão de domínio da União, dos Estados, do Distrito Federal ou dos Municípios as obras por eles simplesmente subvencionadas.

¹ Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19610.htm.