



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Luís João Abrunhosa Pereira

ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLO DE OCRATOXINA A EM ALIMENTOS



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Luís João Abrunhosa Pereira

ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLO DE OCRATOXINA A EM ALIMENTOS

Doutoramento em Engenharia Química e Biológica

Trabalho efectuado sob a orientação do
Doutor Armando Albino Dias Venâncio
Professor Auxiliar do Departamento de Engenharia
Biológica da Universidade do Minho

e sob co-orientação da
Doutora Lúcia Maria da Silveira Santos
Professora Auxiliar do Departamento de Engenharia
Química da Faculdade de Engenharia da Universidade
do Porto

Janeiro 2008

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE
APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE
DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO QUE A TAL SE COMPROMETE

De acordo com o disposto no nº2 do artigo 8º do Decreto-Lei nº 388/70, utilizaram-se neste trabalho resultados das seguintes publicações:

Abrunhosa, L., Serra, R. & Venâncio, A. (2002). **Biodegradation of Ochratoxin A by fungi isolated from grapes**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50 (25); 7493-7496.

Abrunhosa, L., Santos, L. & Venâncio, A. (2006). **Degradation of Ochratoxin A by Proteases and by a Crude Enzyme of *Aspergillus niger***. Food Biotechnology. 20 (3); 231-242.

Abrunhosa, L. & Venâncio, A. (2007). **Isolation and purification of an ochratoxin A hydrolytic enzyme from *Aspergillus niger***. Biotechnology Letters. 29 (12); 1909-1914.

Abrunhosa, L., Costa, M., Areias F., Venâncio, A. & Proença, F. (2007). **Antifungal activity of a novel chromene dimmer**. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 34 (12); 787-792.

Abrunhosa, L. & Venâncio, A. (2008). ***In vitro* antifungal effect of EDTA disodium salt in black aspergilli**. Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences. 3 (3); 176-181.

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através da concessão de uma bolsa de doutoramento POCI 2010 SFRH/BD/11228/2002.

Para a minha esposa e filha

there are no easy answers to the mycotoxin dilemma ...

BIOMIN

Agradecimentos

Quero, em primeiro lugar, agradecer ao Doutor Armando Venâncio a disponibilidade mostrada ao longo destes 4 anos para orientar esta dissertação. Quero agradecer o acompanhamento prestado durante a realização dos trabalhos laboratoriais, a sua abertura para o diálogo e a troca ideias, os incentivos e aconselhamentos quando tudo parecia correr mal. De igual forma, quero agradecer à Doutora Lúcia Santos que se disponibilizou para co-orientar esta dissertação e que apoiou desde o início a sua realização com a cedência de recursos materiais e aconselhamento na sua área de especialização.

Devo, ainda, agradecer:

À Escola de Engenharia e, em especial, ao Departamento de Engenharia Biológica e ao Centro de Engenharia Biológica pela disponibilização das instalações e dos meios necessários à realização deste trabalho;

À Fundação para a Ciência e Tecnologia, o apoio financeiro concedido através da bolsa de doutoramento SFRH/BD/11228/2002;

À Professora Doutora Fernanda Proença e ao seu grupo de investigação, o fornecimento dos compostos testados no capítulo 4, o apoio na realização desse trabalho e a simpatia;

À Micoteca da Universidade do Minho, a possibilidade de utilizar alguns recursos materiais da mesma, essencialmente, a câmara de fluxo laminar que em muitos dos trabalhos realizados foi fundamental para garantir boas condições de assepsia;

À Sara Silva pela ajuda prestada na realização de alguns dos ensaios apresentados no capítulo 3;

Aos colegas e amigos com os quais partilhei o laboratório e outros espaços do DEB pela camaradagem, a troca de ideias, a partilha de *know how* e acima de tudo a amizade;

Aos meus pais e irmã o apoio e incentivos dedicados ao longo destes 4 anos;

Aos meus sogros por cuidarem da Sarinha enquanto redigia esta dissertação e pelo seu acolhimento;

À Isabel e à Sarinha, pelo amor e carinho e o incentivo constantes.

Por último, a todas as pessoas que estiveram de algum modo envolvidas durante a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

Prefácio

As micotoxinas são metabolitos secundários produzidos por diversos fungos filamentosos que ocorrem naturalmente em vários produtos agrícolas e que acabam por ser detectadas em produtos alimentares processados. Estas provocam, quando ingeridas por seres humanos e animais, efeitos tóxicos mais ou menos agudos dependendo das quantidades envolvidas. A sua ingestão regular em pequenas quantidades, por períodos de tempo prolongados, pode levar à formação de tumores e ao aparecimento de doenças crónicas em órgãos vitais. Adicionalmente, são responsáveis por perdas económicas elevadas. De entre todas as micotoxinas conhecidas, apenas vinte delas são consideradas relevantes do ponto de vista de segurança alimentar, sendo a ocratoxina A uma dessas.

A ocratoxina A (OTA) é produzida por diversas espécies pertencentes ao género *Aspergillus*, pelo *Penicillium nordicum* e pelo *P. verrucosum*. Quimicamente, é constituída por uma isocumarina apelidada de ocratoxina α (OT α) e por uma molécula de L- β -fenilalanina, encontrando-se estas ligadas por uma ligação amida em tudo idêntica às ligações existentes entre os aminoácidos das proteínas. Esta micotoxina é detectada em produtos agro-pecuários como cereais, grãos de café verde, grãos de cacau, uvas, passas de uvas, figos secos, carnes ou especiarias e em produtos alimentares processados derivados destes. A OTA é sobretudo conhecida pela sua nefrotoxicidade, apesar de possuir outras propriedades tóxicas, e está classificada como um possível carcinogénico humano. É, ademais, considerada um composto tóxico cumulativo dado ser facilmente absorvida através do aparelho digestivo mas dificilmente excretada através da via biliar e urinária. Por isso, como medida de precaução é geralmente recomendado, como para outras micotoxinas, que a sua incidência em produtos alimentares seja minimizada tanto quanto é, tecnologicamente, possível. Para tal, são passíveis de ser implementadas um conjunto de medidas que visam, por um lado, prevenir a sua formação e respectiva contaminação dos produtos agrícolas ou, por outro, reduzir a sua presença e efeitos tóxicos através da sua destruição ou inactivação. As estratégias de prevenção podem consistir na simples aplicação de boas práticas agrícolas e de armazenagem ou na elaboração de sistemas de HACCP específicos onde são definidos pontos críticos de controlo e as respectivas medidas a implementar. No entanto, apesar destas

medidas, sempre que os produtos alimentares ficam contaminados é necessária a aplicação de estratégias de remediação que são, normalmente, catalogadas em métodos físicos, químicos ou biológicos. Os métodos biológicos são considerados por muitos autores os mais apropriados para descontaminar os alimentos uma vez que garantem as suas propriedades nutritivas, dado serem muito específicos, pois são mediados por reacções enzimáticas. Diversos microrganismos ou os enzimas que degradam certas micotoxinas e reduzem a sua toxicidade têm vindo a ser estudados e utilizados.

Dentro deste contexto, procurou-se com esta dissertação desenvolver estratégias de prevenção e de remediação que pudessem contribuir para diminuir a presença de OTA em certo produtos alimentares e, por conseguinte, o impacto que esta tem a nível de segurança alimentar. Concretamente, numa perspectiva de remediação biológica procurou-se: seleccionar diversos fungos filamentosos e leveduras com capacidade para degradar a OTA; isolar, purificar e caracterizar, a partir de uma das estirpes de *Aspergillus niger* testadas, o enzima envolvido nessa degradação; avaliar *in vitro* a actividade hidrolítica sobre a OTA de alguns enzimas e preparados enzimáticos comerciais; e verificar se alguns destes poderiam ser úteis na descontaminação de mostos, de forma a poderem vir a ser usados durante o processo de vinificação. Adicionalmente, numa perspectiva de prevenção, procurou-se verificar o potencial antifúngico de diversos compostos e o efeito destes sobre a produção de OTA, utilizando algumas estirpes ocratoxigénicas.

Sumário

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina encontrada em diversos produtos agro-pecuários que levanta problemas do ponto de vista da segurança alimentar. Por isso, no âmbito desta dissertação procurou-se desenvolver estratégias que contribuíssem para eliminar ou reduzir a sua presença em alimentos.

Para tal, numa perspectiva de remediação biológica, testaram-se 76 estirpes de fungos filamentosos e 9 leveduras de forma a avaliar a sua capacidade para degradar esta micotoxina. Desta avaliação verificou-se que 52 estirpes degradaram a OTA em mais de 80%, tendo 7 estirpes de *Aspergillus niger* apresentado a taxa de degradação mais elevada (99,9%). Verificou-se, também, que as leveduras apresentaram taxas de degradação entre os 12,0 e os 18,7%. Foi ainda possível observar que os aspergilli negros degradaram a OTA através da hidrólise da ligação amida existente entre a ocratoxina α e a L- β -fenilalanina, sugerindo o envolvimento de uma carboxipeptidase. Por outro lado, avaliou-se, *in vitro*, a capacidade de diversos enzimas para degradar a OTA, tendo-se verificado actividade com os preparados proteolíticos Protease A, Prolyve PAC, Pancreatin e com a carboxipeptidase Y. A 37 °C, a Protease A apresentou uma actividade específica máxima de 0,157 U/mg (pH 7,5), a Prolyve PAC de 0,005 U/mg (pH 3,0), a Pancreatin de 0,031 U/mg (pH 7,5) e a carboxipeptidase Y de 1,67 U/mg (pH 5,6). Conseguiu-se, também, utilizando a estirpe *A. niger* MUM 03.58, produzir, isolar e purificar um enzima capaz de hidrolisar a OTA. Para tal, cresceu-se a estirpe nos meios de cultura GT, GT-OTA e GT-niger, tendo-se preparado posteriormente, a partir dos fermentados, extractos enzimáticos que apresentaram uma actividade hidrolítica sobre a OTA de 3, 163 e 185 U/mL, respectivamente. Uma purificação adicional do extracto de GT-OTA foi feita utilizando cromatografia de troca aniónica, tendo-se obtido uma purificação final de 2,5 vezes com uma recuperação de 67,9%. O enzima purificado apresentou uma actividade específica de 35,8 U/mg, um V_{max} de 0,440 μ M/min e um K_m de 476,3 μ M segundo a cinética de Michaelis-Menten, quando a reacção foi realizada a pH 7,5 e 37 °C. Verificou-se também que este enzima é uma metalocarboxipeptidase, uma vez que a sua actividade foi inibida pelo inibidor específico EDTA mas não pelo PMSF. Foi também avaliada a degradação da OTA por alguns preparados enzimáticos comerciais e pelo extracto isolado a

partir de *A. niger* MUM 03.58 em mostos contaminados com esta micotoxina, mas não se observaram reduções de OTA em nenhuma das situações.

Procurou-se ainda, numa perspectiva de prevenção, avaliar a capacidade antifúngica de diversos compostos novos, sintetizados no Departamento de Química da Universidade do Minho, e do composto quelante Na₂EDTA, bem como, determinar se inibiam a produção de OTA. Verificou-se que o composto 2-amino-4[(3-ciano-2*H*-cromeno-2-ilidene)amino]-2*H*-cromeno-3-carbonitrilo (**4a**) foi o mais activo, tendo este apresentado um EC₅₀ de 89,1 µM para *A. alliaceus*, de 416,4 µM para *A. carbonarius*, de 136,5 µM para *A. niger* e de 559,1 µM para *A. ochraceus*. A inibição total da germinação dos esporos destas estirpes foi obtida com 2 mM de **4a**. Verificou-se ainda, que na presença de 50, 100 e 200 µM deste composto a estirpe de *A. alliaceus* produziu, em média e respectivamente, menos 27, 55 e 94% de OTA que os controlos. Os EC₅₀ obtidos com Na₂EDTA foram de 2,1 mM para *A. carbonarius*, de 0,9 mM para *A. ibericus*, de 2,0 mM para a estirpe de *A. niger* ocratoxigénica e de 4,1 mM para a estirpe de *A. niger* não ocratoxigénica. Quando foram utilizados 10 mM de Na₂EDTA, a estirpe de *A. carbonarius* e de *A. niger* ocratoxigénica produziram ao fim de 8 dias de incubação, respectivamente, menos 98 e 99,9% de OTA que os respectivos controlos.

Em conclusão, contribuiu-se, desta forma para o desenvolvimento de novas estratégias para prevenir e remediar a presença de OTA em alimentos.

Abstract

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin found in several agricultural commodities which may pose food safety problems. For this reason, in this work, we aimed to develop strategies that could contribute to eliminate or to reduce OTA presence in food.

From a biological remediation point of view, we tested 76 strains of filamentous fungi and 9 yeasts to assess their capacity to degrade this mycotoxin. It was observed that 52 strains were able to degrade OTA in more than 80% and that 7 strains of *Aspergillus niger* showed the highest degradation rate (99.9%). It was also observed that yeasts presented degradation rates between 12.0 and 18.7%. Furthermore, it was observed that the black aspergilli degraded OTA by hydrolysing the amide bound that connects ochratoxin α to L- β -phenylalanine, suggesting that a carboxypeptidase is involved. The *in vitro* OTA degradation capacity of several enzymes was also assessed, and activity was found for the proteolytic extracts Protease A, Prolyve PAC and Pancreatin, and for the enzyme carboxypeptidase Y. At 37 °C, Protease A showed a maximum specific activity of 0.157 U/mg (pH 7.5), Prolyve PAC of 0.005 U/mg (pH 3.0), Pancreatin of 0.031 U/mg (pH 7.5) and carboxypeptidase Y of 1.67 U/mg (pH 5.6). We also produced, isolated and purified, from *A. niger* MUM 03.58, an enzyme that was able to hydrolyse OTA. For this effect, the strain was grown in the culture media GT, GT-OTA and GT-niger with subsequent preparation of the enzymatic extracts that showed an OTA hydrolytic activity of 3, 163 and 185 U/mL, respectively. A further purification of the extract from GT-OTA was done by anion exchange chromatography, resulting in an overall purification of 2.5-fold with a recovery of 67.9%. The purified enzyme showed a specific activity of 35.8 U/mg, a V_{max} of 0.440 μ M/min and a K_m of 476.3 μ M according Michaelis-Menten kinetic model, when the reaction was carried out at pH 7.5 and 37 °C. It was also concluded that it was a metalocarboxypeptidase, because its activity was inhibited by the specific inhibitor EDTA but not by PMSF. We also assessed the OTA degradation by some commercial enzymatic extracts and by the extract isolated from *A. niger* MUM 03.58 on grape musts contaminated with this mycotoxin but no decrease of OTA contents was observed.

It was also aimed, from a prevention point of view, to assess the antifungal capacity of several new compounds, synthesized at the Chemistry Department of University of Minho, and of the chelating compound Na₂EDTA, in the same manner, to test if they could inhibit the production of OTA. It was observed that the compound 2-amino-4[(3-cyano-2*H*-chromen-2-ylidene)amino]-2*H*-chromene-3-carbonitrile (**4a**) was the most active, showing an EC₅₀ of 89.1 μM for *A. alliaceus*, of 416.4 μM for *A. carbonarius*, of 136.5 μM for *A. niger* and of 559.1 μM for *A. ochraceus*. For these strains, the total inhibition of spores germination was achieved with 2 mM of **4a**. It was also observed, that in the presence of 50, 100 and 200 μM of this compound, *A. alliaceus* produced, on average and respectively, less 27, 55 and 94% of OTA than the controls. The EC₅₀ obtained with Na₂EDTA were of 2.1 mM for *A. carbonarius*, 0.9 mM for *A. ibericus*, 2.0 mM for the ochratoxigenic *A. niger* and 4.1 mM for the non-ochratoxigenic *A. niger*. When 10 mM of Na₂EDTA was used, *A. carbonarius* and the ochratoxigenic *A. niger*, produced, after eight days of incubation, respectively less 98 and 99.9% of OTA than the corresponding controls.

In conclusion, we contributed in this way to the development of new strategies to prevent and to remediate the presence of OTA in food.

Lista de abreviaturas

a_w	Actividade da água
BEN	Nefrotoxicidade endémica em humanos dos países dos Balcãs
CIN	Nefropatia intersticial crónica
CPA	Carboxipeptidase A
CPP	Carboxipeptidase P
CPY	Carboxipeptidase Y
CYA	<i>Czapek yeast autolysate</i>
CYA+1mM	<i>Czapek yeast autolysate</i> suplementado com 1 mM de Na ₂ EDTA
CYA+10mM	<i>Czapek yeast autolysate</i> suplementado com 10 mM de Na ₂ EDTA
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC ₅₀	Concentração de composto activo para a qual existe uma sobrevivência de 50%
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
GC	Cromatografia gasosa
GC/MS	Cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa
HACCP	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo
H ₂ O _d	Água destilada
H ₂ O _{dd}	Água destilada e desionizada
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
HSCAS	Aluminossilicatos hidratados de sódio e cálcio
IAC	Coluna de imunoafinidade
MEA	<i>Malt extract agar</i>
Na ₂ EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético dissódico

OTA	Ocratoxina A
OTB	Ocratoxina B
OTC	Ocratoxina C
OT α	Ocratoxina α
OT β	Ocratoxina β
4R-OH OTA	(4- <i>R</i>)-4-hidroxi-ocratoxina A
4S-OH OTA	(4- <i>S</i>)-4-hidroxi-ocratoxina A
4-OH OTB	4-hidroxi-ocratoxina B
10-OH OTA	10-hidroxi-ocratoxina A
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
Rf	Índice de retenção
RNA	Ácido ribonucleico
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida com desnaturação com dodecilsulfato de sódio
SNM	<i>Synthetic nutrient medium</i>
SPE	Extracção em fase sólida
SPME	micro-extracção em fase sólida
TLC	Cromatografia analítica de camada fina
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
Triton X-100	<i>t</i> -Octilfenoxipolietoxietanol
UT	Tumores uroteliais
YES	<i>Yeast extract sucrose</i>
YES+OTA	<i>Yeast extract sucrose</i> suplementado com 1 $\mu\text{g/mL}$ de OTA
YPD	<i>Yeast peptone dextrose</i>
YPD+OTA	<i>Yeast peptone dextrose</i> suplementado com 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de OTA

Condições de segurança

A ocratoxina A é um composto tóxico e carcinogénico que necessita de ser manipulado com cuidado, tendo sido utilizadas, durante a realização dos trabalhos laboratoriais, medidas de segurança individuais apropriadas. A descontaminação dos resíduos produzidos e do material laboratorial contaminados com esta micotoxina foi feita seguindo os procedimentos recomendados pela Agência Internacional para a Investigação em Cancro (Castegnaro *et al.*, 1991).

Os solventes orgânicos foram manipulados em hotes de forma a evitar a exposição aos seus vapores. Os resíduos de solventes orgânicos produzidos durante a realização dos trabalhos laboratoriais foram selectivamente acondicionados em frascos devidamente rotulados de forma a serem recolhidos e processados por uma empresa acreditada.

Os resíduos biológicos produzidos foram autoclavados a 121 °C durante 15 min antes de serem encaminhados para a recolha de resíduos orgânicos.

Lista de Tabelas

Tabela 1.1.1	Micotoxinas mais relevantes para a segurança alimentar produzidas por diferentes géneros de fungos filamentosos	2
Tabela 1.1.2	Algumas micotoxinas encontradas em certos produtos agro-alimentares.....	4
Tabela 1.1.3	Algumas medidas preventivas para o controlo de micotoxinas	7
Tabela 1.1.4	Algumas medidas correctivas para o controlo de micotoxinas	8
Tabela 1.2.1	Fungos produtores de ocratoxina A	11
Tabela 1.2.2	Principais espécies ocratoxigénicas isoladas a partir de produtos agro-alimentares.....	12
Tabela 1.2.3	Ocratoxina A detectada nalguns produtos agro-pecuários.....	14
Tabela 1.2.4	Ocratoxina A detectada nalguns produtos alimentares processados.....	15
Tabela 1.2.5	Valores médios de OTA detectados nalguns produtos agro-alimentares na Comunidade Europeia.....	15
Tabela 1.2.6	OTA detectada nalguns produtos destinados à alimentação animal	16
Tabela 1.2.7	Alguns valores de LD ₅₀ e de tempos médios de vida ($t_{1/2}$) da OTA em algumas espécies.....	18
Tabela 1.2.8	Níveis máximos de ocratoxina A permitidos em certos alimentos na Comunidade Europeia.....	21
Tabela 1.2.9	Métodos validados para a detecção de OTA em alguns produtos alimentares	24
Tabela 1.4.1	Alguns microrganismos capazes de degradar a ocratoxina A.....	41
Tabela 2.2.1	Códigos de isolamento e códigos MUM dos fungos filamentosos testados	45
Tabela 2.3.1	OTA detectada nos meios de cultura utilizados para o cálculo das taxas de recuperação	50
Tabela 2.3.2	OTA detectada nos meios de cultura e respectivas taxas de degradação dos aspergilli negros testados	51
Tabela 2.3.3	OTA detectada nos meios de cultura e respectivas taxas de degradação dos outros aspergilli testados	57
Tabela 2.3.4	OTA detectada nos meios de cultura e respectivas taxas de degradação dos outros géneros testados	64
Tabela 2.3.5	OTA detectada nos meios de cultura utilizados para o cálculo das taxas de recuperação	70
Tabela 3.2.1	Principais características dos preparados enzimáticos e das carboxipeptidases testadas	83
Tabela 3.2.2	Quantidade de enzima utilizado na preparação dos ensaios de degradação com mosto	91
Tabela 3.3.1	Actividades registadas para Protease A, Prolyve PAC, Pancreatin, Carboxipeptidase Y e Carboxipeptidase A aos pH testados e a 37 °C	96
Tabela 3.3.2	Efeito dos inibidores EDTA e PMSF na actividade hidrolítica de Protease A, Prolyve PAC, Pancreatin e CPA a pH 7,5 e 37 °C.....	96
Tabela 3.3.3	Actividade específica registada para Protease A, Prolyve PAC, Pancreatin e Carboxipeptidase A a 50 °C.....	98
Tabela 3.3.4	Proteína detectada nos extractos enzimáticos produzidos a partir de GT, GT-OTA e GT-niger... 98	
Tabela 3.3.5	Actividade registada para os extractos enzimáticos produzidos a partir dos meios de cultura GT, GT-OTA e GT-niger a 37 °C.....	99

Tabela 3.3.6	Resumo dos passos realizados para purificar o enzima hidrolítico de <i>A. niger</i>	102
Tabela 3.3.7	Efeito dos inibidores EDTA e PMSF na actividade hidrolítica do extracto de GT-OTA e da CPA a pH 7,5 e 37 °C	103
Tabela 3.3.8	Parâmetros cinéticos do extracto enzimático de GT-OTA e da CPA determinados por regressão não linear, representação de Lineweaver-Burk e representação de Hanes-Woolf.	106
Tabela 4.2.1	Códigos, fórmula química e peso molecular dos compostos testados nos primeiros ensaios	117
Tabela 4.2.2	Códigos, fórmula química e peso molecular dos compostos testados nos ensaios subsequentes	118
Tabela 4.2.3	Propriedades físicas e análise elementar dos compostos 2 , 3 e 4	119
Tabela 4.3.1	Taxa de crescimento radial das estirpes em YES com 50 µM dos compostos testados.....	125
Tabela 4.3.2	Inibição da taxa de crescimento radial relativamente aos controlos	126
Tabela 4.3.3	Taxa de crescimento radial das estirpes testadas em YES suplementado com 50, 100 e 200 µM dos compostos 2a , 3a , 4a , 2b , 3b e 4b	127
Tabela 4.3.4	Inibição da taxa de crescimento radial relativamente aos controlos em YES.....	128
Tabela 4.3.5	EC ₅₀ do composto 4a para os diferentes <i>Aspergillus</i> spp. testados.....	130
Tabela 4.3.6	Taxa de crescimento radial das estirpes testadas em SNM suplementado com 50, 100 e 200 µM dos compostos 2a , 3a , 4a , 2b , 3b e 4b	131
Tabela 4.3.7	Inibição da taxa de crescimento radial relativamente aos controlos em SNM.....	131
Tabela 4.3.8	Produção de ocratoxina A por <i>A. carbonarius</i> , <i>A. alliaceus</i> e <i>A. ochraceus</i> quando crescidos em YES suplementado com 50, 100 ou 200 µM de 2a , 2b , 3a , 3b , 4a e 4b	134
Tabela 4.3.9	Inibição da produção de ocratoxina A no meio de cultura YES	135
Tabela 4.3.10	Produção de ocratoxina A por <i>A. carbonarius</i> , <i>A. alliaceus</i> e <i>A. ochraceus</i> quando crescidos em SNM suplementado com 50, 100 e 200 µM de 2a , 2b , 3a , 3b , 4a e 4b	135
Tabela 4.3.11	Inibição da produção de ocratoxina A no meio de cultura SNM.....	136
Tabela 4.3.12	Produção de ocratoxina A por <i>A. alliaceus</i> em YES líquido suplementado com 50, 100 ou 200 µM de 4a	136
Tabela 4.3.13	Produção de ocratoxina A por <i>A. alliaceus</i> em SNM líquido suplementado com 50, 100 ou 200 µM de 4a	137
Tabela 4.3.14	Taxa de crescimento radial dos <i>Aspergillus</i> spp. nos meios de cultura CYA, CYA+1mM e CYA+10mM.....	137
Tabela 4.3.15	EC ₅₀ do composto Na ₂ EDTA para os diferentes <i>Aspergillus</i> spp. testados	138
Tabela 4.3.16	Produção ao longo do tempo de ocratoxina A por <i>A. carbonarius</i> MUM 03.59 e por <i>A. niger</i> MUM 03.57 em CYA, CYA+1mM e CYA+10mM.....	139
Tabela A-2.1	OTA detectada nos meios de cultura com as leveduras testadas e respectivas taxas de degradação	167
Tabela A-3.1	Concentrações de OTA e de OTα detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados a pH 3,0 e incubados a 37 °C	169
Tabela A-3.2	Concentrações de OTA e de OTα detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados a pH 5,6 e incubados a 37 °C	170
Tabela A-3.3	Concentrações de OTA e de OTα detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados a pH 7,5 e incubados a 37 °C	171
Tabela A-3.4	Concentrações de OTA e de OTα detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados a pH 8,5 e incubados a 37 °C	172
Tabela A-3.5	Concentrações de OTA e de OTα detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados a pH 10,0 e incubados a 37 °C	173

Tabela A-3.6	Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados com CPY e CPP a pH 3,6 e incubados 37 °C	174
Tabela A-3.7	Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados com CPY e CPP a pH 4,6 e incubados 37 °C	174
Tabela A-3.8	Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados com CPY e CPP a pH 5,6 e incubados 37 °C	174
Tabela A-3.9	Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados com CPY e CPP a pH 6,6 e incubados 37 °C	174
Tabela A-3.10	Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados com Protease A, Prolyve PAC, Pancreatin e Carboxipeptidase A na presença de 10 mM de EDTA. Ensaios realizados a pH 7,5 e incubados a 37 °C com excepção do ensaio com Prolyve PAC que foi realizado a pH 3,0.....	180
Tabela A-3.11	Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados com Protease A, Prolyve PAC, Pancreatin e Carboxipeptidase A na presença de 1 mM de PMSF. Ensaios realizados a pH 7,5 e incubados a 37 °C com excepção do ensaio com Prolyve PAC que foi realizado a pH 3,0.....	180
Tabela A-3.12	Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados com Protease A, Prolyve PAC, Pancreatin e CPA a pH 7,5 e incubados a 50 °C com excepção do ensaio com Prolyve PAC que foi realizado a pH 3,0	185
Tabela A-3.13	Absorvências registadas para a quantificação da proteína nos extractos enzimáticos	187
Tabela A-3.14	Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados a pH 3,0 e 37 °C com os extractos enzimáticos obtidos.....	188
Tabela A-3.15	Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados a pH 5,6 e 37 °C com os extractos enzimáticos obtidos.....	188
Tabela A-3.16	Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados a pH 7,5 e 37 °C com os extractos enzimáticos obtidos.....	189
Tabela A-3.17	Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados a pH 8,5 e 37 °C com os extractos enzimáticos obtidos.....	189
Tabela A-3.18	Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados a pH 10,0 e 37 °C com os extractos enzimáticos obtidos.....	189
Tabela A-3.19	Dados referentes às fracções recolhidas após separação do extracto de GT-OTA por coluna de FPLC.....	194
Tabela A-3.20	Absorvências referentes aos padrões utilizados na elaboração da curva de calibração para a quantificar a proteína nas fracções recolhidas após separação do extracto de GT-OTA por FPLC.....	194
Tabela A-3.21	Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados com o extracto enzimático obtido a partir do GT-OTA na presença de 10 mM de EDTA e 1 mM de PMSF. Ensaios realizados a pH 7,5 e incubados a 37 °C.....	198
Tabela A-3.22	Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados com o extracto enzimático obtido a partir do GT-OTA para a determinação de V_0 ...	200
Tabela A-3.23	Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados com a CPA para a determinação de V_0	201
Tabela A-3.24	Dados utilizados na elaboração das representações de Michaelis-Menten, de Lineweaver-Burk e de Hanes-Woolf para calcular os parâmetros cinéticos do extracto enzimático de GT-OTA	201
Tabela A-3.25	Dados utilizados na elaboração das representações de Michaelis-Menten, de Lineweaver-Burk e de Hanes-Woolf para calcular os parâmetros cinéticos da CPA	201
Tabela A-3.26	Dados utilizados para determinar as concentrações de OTA e OT α nos mostos	202

Tabela A-3.27	Dados utilizados para determinar as concentrações de OTA e OT α nos mostos	202
Tabela A-3.28	Concentração de OTA ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) detectada nas diferentes fracções dos mostos após maceração com os enzimas	202
Tabela A-4.1	Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com DMSO a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	204
Tabela A-4.2	Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto 4a a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	204
Tabela A-4.3	Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto 5 a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	205
Tabela A-4.4	Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto 6 a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	205
Tabela A-4.5	Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto 7 a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	206
Tabela A-4.6	Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto 8 a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	206
Tabela A-4.7	Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto 9 a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	207
Tabela A-4.8	Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto 10 a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	207
Tabela A-4.9	Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto 11 a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	208
Tabela A-4.10	Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto 12 a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	208
Tabela A-4.11	Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto 13 a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	209
Tabela A-4.12	Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto 14 a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	209
Tabela A-4.13	Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto 15 a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	210
Tabela A-4.14	Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto 16 a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	210
Tabela A-4.15	Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto 17 a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	211
Tabela A-4.16	Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto 18 a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	211
Tabela A-4.17	Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto 19 a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	212
Tabela A-4.18	Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto 20 a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	212
Tabela A-4.19	Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto 21 a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	213
Tabela A-4.20	Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto 22 a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	213
Tabela A-4.21	Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto 23 a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	214
Tabela A-4.22	Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com DMSO a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	214

Tabela A-4.46 Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 50 µM de 2a a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	226
Tabela A-4.47 Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 50 µM de 4b a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	227
Tabela A-4.48 Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 50 µM de 3b a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	227
Tabela A-4.49 Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 50 µM de 2b a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	228
Tabela A-4.50 Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com DMSO a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	228
Tabela A-4.51 Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 100 µM de 4a a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	229
Tabela A-4.52 Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 100 µM de 3a a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	229
Tabela A-4.53 Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 100 µM de 2a a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	230
Tabela A-4.54 Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 100 µM de 4b a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	230
Tabela A-4.55 Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 100 µM de 3b a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	231
Tabela A-4.56 Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 100 µM de 2b a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	231
Tabela A-4.57 Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com DMSO a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	232
Tabela A-4.58 Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 200 µM de 4a a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	232
Tabela A-4.59 Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 200 µM de 3a a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	233
Tabela A-4.60 Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 200 µM de 2a a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	233
Tabela A-4.61 Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 200 µM de 4b a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	234
Tabela A-4.62 Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 200 µM de 3b a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	234
Tabela A-4.63 Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 200 µM de 2b a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	235
Tabela A-4.64 Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em CYA a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	235
Tabela A-4.65 Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em CYA+1mM a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	236
Tabela A-4.66 Diâmetro das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em CYA+10mM a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	236

Lista de Figuras

Figura 1.2.1	Estrutura química da di-hidroisocumarina.....	9
Figura 1.2.2	Estrutura química das ocratoxinas naturalmente produzidas por fungos filamentosos.....	10
Figura 1.2.3	Biossíntese da ocratoxina A	13
Figura 1.4.1	Hidrólise da ocratoxina A em ocratoxina α e L- β -fenilalanina	39
Figura 2.3.1	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>A. carbonarius</i> 01UAs198 (produtor de OTA) para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	52
Figura 2.3.2	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>A. ellipticus</i> 01UAs139 para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	53
Figura 2.3.3	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>A. foetidus</i> 01UAs162 para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	53
Figura 2.3.4	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>A. ibericus</i> 01UAs294 para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	54
Figura 2.3.5	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>A. japonicus</i> 01UAs128 para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	54
Figura 2.3.6	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>A. niger</i> 01UAs107 (não produtor de OTA) para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	55
Figura 2.3.7	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>A. niger</i> 01UAs273 (produtor de OTA) para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	55
Figura 2.3.8	Cromatograma de HPLC do padrão de OT α obtido por hidrólise ácida da OTA.....	56
Figura 2.3.9	Cromatograma de HPLC do padrão de OT α obtido por hidrólise enzimática da OTA com carboxypeptidase A.....	56
Figura 2.3.10	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>A. alliaceus</i> 01UAs62 (produtor de OTA) para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	58
Figura 2.3.11	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>A. clavatus</i> 01UAs11 para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	59
Figura 2.3.12	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>A. flavus</i> 01UAs1 para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	59
Figura 2.3.13	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>A. fumigatus</i> 01UAs23 para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	60
Figura 2.3.14	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>A. ochraceus</i> 01UAs8 (não produtor de OTA) para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	60
Figura 2.3.15	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>A. ochraceus</i> 01UAs65 (produtor de OTA) para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	61
Figura 2.3.16	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>A. terreus</i> 01UAs301 para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	61
Figura 2.3.17	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>A. ustus</i> 01UAs45 para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	62
Figura 2.3.18	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>A. versicolor</i> 01UAs69 para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	62
Figura 2.3.19	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>A. wentii</i> 01UAs63 para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	63

Figura 2.3.20	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>Alternaria</i> sp. 00UA15 para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	64
Figura 2.3.21	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>Aureobasidium pullulans</i> 00UAu1 para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	65
Figura 2.3.22	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>Botrytis</i> sp. 00UB1 para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	65
Figura 2.3.23	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>Cladosporium</i> sp. 00UC12 para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	66
Figura 2.3.24	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>Emericella nidulans</i> 00UAs17 para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	66
Figura 2.3.25	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>Mucor</i> sp. 00UZ2 para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	67
Figura 2.3.26	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>Penicillium aurantiogriseum</i> 01UP43 para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	67
Figura 2.3.27	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>Penicillium spinulosum</i> 01UP74 para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	68
Figura 2.3.28	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>Rhizopus</i> sp. 00MZ3 para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	68
Figura 2.3.29	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>Trichoderma</i> sp. 00UT4 para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	69
Figura 2.3.30	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>Trichothecium roseum</i> 00UTm1 para os meios de cultura: —, YES+OTA e - - -, YES.....	69
Figura 2.3.31	Taxas de degradação da ocratoxina A com as leveduras testadas. Cada valor representa a média de dois ensaios (5 para os controlos) e as barras o respectivo desvio padrão.....	71
Figura 2.3.32	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>Issatchenkia orientalis</i> PL34 quando crescida no meio de cultura YPD+OTA. a) 1ª réplica e b) 2ª réplica.....	71
Figura 2.3.33	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>Pichia membranifaciens</i> PL17 quando crescida no meio de cultura YPD+OTA. a) 1ª réplica e b) 2ª réplica.....	72
Figura 2.3.34	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>Rhodotorula glutinis</i> IGC4177T quando crescida no meio de cultura YPD+OTA. a) 1ª réplica e b) 2ª réplica.....	72
Figura 2.3.35	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>Rhodotorula minuta</i> IGC4689 quando crescida no meio de cultura YPD+OTA. a) 1ª réplica e b) 2ª réplica.....	73
Figura 2.3.36	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>Saccharomyces bayanus</i> IGC4456T quando crescida no meio de cultura YPD+OTA. a) 1ª réplica e b) 2ª réplica.....	73
Figura 2.3.37	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> D35 quando crescida no meio de cultura YPD+OTA. a) 1ª réplica e b) 2ª réplica.....	74
Figura 2.3.38	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> D305 quando crescida no meio de cultura YPD+OTA. a) 1ª réplica e b) 2ª réplica.....	74
Figura 2.3.39	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>Saccharomyces pasteurianus</i> IGC4601T quando crescida no meio de cultura YPD+OTA. a) 1ª réplica e b) 2ª réplica.....	75
Figura 2.3.40	Cromatogramas de HPLC obtidos com <i>Kluyveromyces marxianus</i> IGC3286 quando crescida no meio de cultura YPD+OTA. a) 1ª réplica e b) 2ª réplica.....	75
Figura 3.3.1	(a) Ocratoxina A e (b) ocratoxina α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de degradação realizados com CPA a: -♦-, pH 3,0; -▲-, pH 5,6; -▼-, pH 7,5; -●-, pH 8,5 e -×-, pH 10,0 (todos os ensaios foram realizados a 37 °C).....	93
Figura 3.3.2	(a) Ocratoxina A e (b) ocratoxina α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de degradação realizados com Protease A a: -♦-, pH 3,0; -▲-, pH 5,6; -▼-, pH 7,5; -●-, pH 8,5 e -×-, pH 10,0 (todos os ensaios foram realizados a 37 °C).....	94

Figura 3.3.3	(a) Ocratoxina A e (b) ocratoxina α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de degradação realizados com Prolyve PAC a: -♦-, pH 3,0; -▲-, pH 5,6; -▼-, pH 7,5; -●-, pH 8,5 e -x-, pH 10,0 (todos os ensaios foram realizados a 37 °C).....	94
Figura 3.3.4	(a) Ocratoxina A e (b) ocratoxina α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de degradação realizados com Pancreatin a: -♦-, pH 3,0; -▲-, pH 5,6; -▼-, pH 7,5; -●-, pH 8,5 e -x-, pH 10,0 (todos os ensaios foram realizados a 37 °C).....	95
Figura 3.3.5	(a) Ocratoxina A e (b) ocratoxina α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de degradação realizados com CPY a: -♦-, pH 3,6; -▲-, pH 4,6; -▼-, pH 5,6 e -●-, pH 6,6 (todos os ensaios foram realizados a 37 °C).....	95
Figura 3.3.6	(a) Ocratoxina A e (b) ocratoxina α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de degradação realizados a 50 °C com: -□-, Branco; -♦-, Protease A a pH 7,5; -▲-, Prolyve PAC a pH 3,0; -▼-, Pancreatin a pH 7,5 e -●-, CPA a pH 7,5.	97
Figura 3.3.7	(a) Ocratoxina A e (b) ocratoxina α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de degradação realizados a pH 7,5 e 37 °C com: -□-, Branco; -▲-, GT; -▼-, GT-OTA e -●-, GT-niger.....	100
Figura 3.3.8	(—) Cromatograma do extracto enzimático de GT-OTA obtido por registo da absorvência a 280 nm e (----) gradiente salino utilizado na eluição do extracto.	101
Figura 3.3.9	(o) Proteína quantificada pelo método de Bradford nas amostras recolhidas depois da cromatografia aniónica e (●) actividade hidrolítica detectada nas mesmas amostras a pH 7,5 e 37 °C.	101
Figura 3.3.10	Representação gráfica da concentração de OT α em função do tempo para o extracto enzimático de GT-OTA e obtenção de V_0 por regressão linear dos dados. Ensaio realizado com -♦-, 0,01; -■-, 0,1; -▲-, 0,3; -●-, 0,6 e -x-, 1,3 mg/mL de OTA a pH 7,5 e 37 °C.....	103
Figura 3.3.11	Representação gráfica da concentração de OT α em função do tempo para a CPA e obtenção de V_0 por regressão linear dos dados. Ensaio realizado com -♦-, 0,01; -■-, 0,1; -▲-, 0,3; -●-, 0,6 e -x-, 1,3 mg/mL de OTA a pH 7,5 e 37 °C.....	104
Figura 3.3.12	Representação hiperbólica da velocidade inicial (V_0) em função da concentração de substrato (OTA) e ajuste não linear dos dados ao modelo de Michaelis-Menten: a) para o extracto enzimático de GT-OTA e b) para a CPA. (●) dados experimentais, (—) curva ajustada pelo programa informático, (----) intervalo de confiança a 95%.	104
Figura 3.3.13	Representação linear de Lineweaver-Burk para o cálculo dos parâmetros cinéticos: a) do extracto enzimático de GT-OTA e b) da CPA.	105
Figura 3.3.14	Representação linear de Hanes-Woolf para o cálculo dos parâmetros cinéticos: a) do extracto enzimático de GT-OTA e b) da CPA.....	105
Figura 3.3.15	Concentração de OTA ($\mu\text{g/Kg}$) detectada: a) na fracção líquida e b) na fracção sólida dos mostos após tratamento com os preparados enzimáticos. Os valores são a média de duas réplicas e as barras representam o desvio padrão.....	106
Figura 3.3.16	Ocratoxina A ($\mu\text{g/Kg}$) total detectada nos mostos após tratamento com os preparados enzimáticos.	107
Figura 4.2.1	Vias de síntese dos compostos 2, 3 e 4.	118
Figura 4.3.1	Efeito de 50, 100 e 200 μM do composto 4a no crescimento radial dos fungos testados após 4 dias a 25 °C no escuro.....	129
Figura 4.3.2	Presença visível de micélio no ensaio realizado em microplaca com diferentes concentrações de 4a . a) <i>A. niger</i> , b) <i>A. carbonarius</i> , c) <i>A. alliaceus</i> e d) <i>A. ochraceus</i>	132
Figura 4.3.3	Ensaio em microplaca com o composto 4a após a) 4 dias e b) 5 dias a 25 °C no escuro.....	133
Figura 4.3.4	Crescimento radial do (a) <i>A. carbonarius</i> MUM 03.59, (b) <i>A. ibericus</i> MUM 03.49, (c) <i>A. niger</i> MUM 03.57 e (d) <i>A. niger</i> MUM 03.58 em: -x- CYA; -●- CYA+1mM e -○- CYA+10mM. Os valores apresentados são a média de três réplicas e as barras o respectivo desvio padrão.	138
Figura A-2.1	Exemplo de curva de calibração utilizada para a quantificação da OTA.....	167

Figura A-3.1	Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com Protease A a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.	175
Figura A-3.2	Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com Protease A a pH 8,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.	175
Figura A-3.3	Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com Prolyve PAC a pH 3,0 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.	176
Figura A-3.4	Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com Pancreatin a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.	176
Figura A-3.5	Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com Pancreatin a pH 8,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.	177
Figura A-3.6	Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com CPY a pH 4,6 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 15, c) 25, d) 48, e) 72, f) 96 e g) 120 horas.....	177
Figura A-3.7	Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com CPY a pH 5,6 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 15, c) 25, d) 48, e) 72, f) 96 e g) 120 horas.....	178
Figura A-3.8	Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com CPY a pH 6,6 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 15, c) 25, d) 48, e) 72, f) 96 e g) 120 horas.....	178
Figura A-3.9	Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com a CPA a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.	179
Figura A-3.10	Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com a CPA a pH 8,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.	179
Figura A-3.11	Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com Protease A e 10 mM de EDTA a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.....	181
Figura A-3.12	Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com Protease A e 1 mM de PMSF a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.	181
Figura A-3.13	Cromatogramas de HPLC obtidos no ensaio de degradação realizado com Prolyve PAC e 10 mM de EDTA a pH 3,0 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.	182
Figura A-3.14	Cromatogramas de HPLC obtidos no ensaio de degradação realizado com Prolyve PAC e 1 mM de PMSF a pH 3,0 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.	182
Figura A-3.15	Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com Pancreatin e 10 mM de EDTA a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.....	183
Figura A-3.16	Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com Pancreatin e 1 mM de PMSF a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.	183
Figura A-3.17	Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com CPA e 10 mM de EDTA a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.	184
Figura A-3.18	Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com CPA e 1 mM de PMSF a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.....	184
Figura A-3.19	Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com Protease A a pH 7,5 e 50 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9 e e) 15 horas.	185
Figura A-3.20	Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com Prolyve PAC a pH 3,0 e 50 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9 e e) 15 horas.	186
Figura A-3.21	Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com Pancreatin a pH 7,5 e 50 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9 e e) 15 horas.	186

Figura A-3.22 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com CPA a pH 7,5 e 50 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9 e e) 15 horas.	187
Figura A-3.23 Curva de calibração elaborada para quantificar o conteúdo em proteína dos extractos produzidos. Cada ponto representa a média de 4 réplicas e as barras o desvio padrão.....	188
Figura A-3.24 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com o extracto enzimático obtido a partir do meio de cultura GT a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.....	190
Figura A-3.25 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com o extracto enzimático obtido a partir do meio de cultura GT-OTA a pH 5,6 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.	190
Figura A-3.26 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com o extracto enzimático obtido a partir do meio de cultura GT-OTA a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.	191
Figura A-3.27 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com o extracto enzimático obtido a partir do meio de cultura GT-OTA a pH 8,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.	191
Figura A-3.28 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com o extracto enzimático obtido a partir do meio de cultura GT-niger a pH 5,6 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.	192
Figura A-3.29 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com o extracto enzimático obtido a partir do meio de cultura GT-niger a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.	192
Figura A-3.30 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com o extracto enzimático obtido a partir do meio de cultura GT-niger a pH 8,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.	193
Figura A-3.31 Curva de calibração elaborada para quantificar o conteúdo em proteína das fracções recolhidas após eluição na coluna de FPLC. Cada ponto representa a média de 4 réplicas e as barras o desvio padrão.	195
Figura A-3.32 Cromatograma de HPLC obtido no ensaio de degradação realizado com a fracção eluída t27,28 a pH 7,5 e 37 °C.....	195
Figura A-3.33 Cromatograma de HPLC obtido no ensaio de degradação realizado com a fracção eluída t29,30 a pH 7,5 e 37 °C.....	196
Figura A-3.34 Cromatograma de HPLC obtido no ensaio de degradação realizado com a fracção eluída t31,32 a pH 7,5 e 37 °C.....	196
Figura A-3.35 Cromatograma de HPLC obtido no ensaio de degradação realizado com a fracção eluída t33,34 a pH 7,5 e 37 °C.....	197
Figura A-3.36 Cromatograma de HPLC obtido no ensaio de degradação realizado com a fracção eluída t35,36 a pH 7,5 e 37 °C.....	197
Figura A-3.37 Cromatograma de HPLC obtido no ensaio de degradação realizado com a fracção eluída t37,38 a pH 7,5 e 37 °C.....	198
Figura A-3.38 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com extracto de GT-OTA a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.....	199
Figura A-3.39 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com extracto de GT-OTA e 10 mM de EDTA a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.	199
Figura A-3.40 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com o extracto de GT-OTA e 1 mM de PMSF a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.	200

Índice Geral

Capítulo I.....	1
Introdução geral	1
1.1 Micotoxinas.....	2
1.2 Ocratoxina A	9
1.2.1 Propriedades químicas e físicas	9
1.2.2 Fungos produtores de ocratoxina A	10
1.2.3 Biossíntese da ocratoxina A.....	12
1.2.4 Ocorrência natural da ocratoxina A	14
1.2.5 Toxicidade e relevância	17
1.2.6 Legislação e controlo	20
1.2.7 Amostragem e análise em produtos alimentares contaminados.....	21
1.3 Estratégias de prevenção para o controlo de micotoxinas em alimentos	25
1.3.1 Sistema de HACCP.....	25
1.3.1.1 Aplicação do HACCP ao controlo de micotoxinas – fase de pré-colheita.....	26
1.3.1.2 Aplicação do HACCP ao controlo de micotoxinas – fase de pós-colheita	27
1.3.2 Compostos antifúngicos.....	29
1.3.2.1 Derivados de cromeno.....	30
1.3.2.2 Na ₂ EDTA	31
1.3.3 Engenharia genética de plantas	32
1.4 Estratégias de remediação para o controlo de micotoxinas em alimentos	33
1.4.1 Métodos físicos	34
1.4.1.1 Segregação e fraccionamento por densidade	34
1.4.1.2 Lavagem.....	34
1.4.1.3 Descasque.....	34
1.4.1.4 Crivagem ou triagem.....	35
1.4.1.5 Processamento térmico.....	35
1.4.1.6 Moagem húmida	35
1.4.1.7 Moagem seca.....	35
1.4.1.8 Adsorção	36
1.4.2 Métodos químicos.....	37
1.4.2.1 Amoniação	37
1.4.2.2 Tratamento com bissulfito de sódio	38
1.4.2.3 Ozonação.....	38
1.4.3 Métodos biológicos.....	39
1.4.3.1 Degradação por microrganismos.....	39
1.4.3.2 Degradação enzimática	42
1.5 Objectivos e estrutura da dissertação	42
Capítulo II	43
Biodegradação da ocratoxina A por fungos	43
2.1 Introdução	44
2.2 Material e Métodos	45
2.2.1 Biodegradação da ocratoxina A por fungos filamentosos.....	45
2.2.1.1 Material biológico	45
2.2.1.2 Preparação do inóculo, dos meios de cultura e sua inoculação.....	46

2.2.1.3	Extracção da ocratoxina A	46
2.2.1.4	Quantificação da OTA por HPLC.....	47
2.2.1.5	Preparação da curva de calibração para a ocratoxina A.....	47
2.2.1.6	Preparação de padrões de ocratoxina α	48
2.2.2	Biodegradação da ocratoxina A por leveduras	48
2.2.2.1	Material biológico	48
2.2.2.2	Preparação do inóculo, dos meios de cultura e sua inoculação.....	48
2.2.2.3	Extracção da OTA.....	49
2.2.2.4	Quantificação da OTA por HPLC.....	49
2.3	Resultados	50
2.3.1	Biodegradação da ocratoxina A por fungos filamentosos.....	50
2.3.1.1	Taxa de recuperação do processo de extracção.....	50
2.3.1.2	Biodegradação da ocratoxina A pelos aspergilli negros	50
2.3.1.3	Biodegradação da ocratoxina A por outras espécies de aspergilli	57
2.3.1.4	Biodegradação da ocratoxina A por outros géneros.....	63
2.3.2	Biodegradação da ocratoxina A por leveduras	70
2.4	Discussão e Conclusão.....	76
Capítulo III	80
Degradação enzimática da ocratoxina A.....		80
3.1	Introdução	81
3.2	Material e Métodos	82
3.2.1	Degradação da ocratoxina A por acção de enzimas comerciais	82
3.2.1.1	Enzimas comerciais.....	82
3.2.1.2	Soluções tampão	82
3.2.1.3	Preparação de soluções tampão com OTA.....	84
3.2.1.4	Avaliação da actividade hidrolítica.....	84
3.2.1.5	Quantificação da OTA e OT α por HPLC	84
3.2.1.6	Determinação da actividade enzimática.....	85
3.2.1.7	Efeito de inibidores na actividade hidrolítica dos enzimas comerciais.....	85
3.2.1.8	Avaliação da actividade hidrolítica a 50 °C	85
3.2.2	Degradação da ocratoxina A por acção de um enzima isolado a partir de <i>Aspergillus niger</i> MUM 03.58	86
3.2.2.1	Material biológico	86
3.2.2.2	Soluções tampão	86
3.2.2.3	Preparação do inóculo	86
3.2.2.4	Preparação dos meios de cultura para a produção do enzima	86
3.2.2.5	Inoculação e condições de incubação para a produção do enzima.....	87
3.2.2.6	Preparação dos extractos enzimáticos de <i>A. niger</i>	87
3.2.2.7	Quantificação da proteína	88
3.2.2.8	Detecção da actividade hidrolítica sobre a OTA.....	88
3.2.2.9	Determinação da actividade enzimática.....	88
3.2.2.10	Purificação do extracto de GT-OTA por cromatografia de troca aniónica	89
3.2.2.11	Efeito de inibidores na actividade hidrolítica sobre a OTA	89
3.2.2.12	Determinação dos parâmetros cinéticos.....	89
3.2.3	Degradação da ocratoxina A em mostos.....	90
3.2.3.1	Material biológico	90
3.2.3.2	Enzimas	90
3.2.3.3	Preparação do inóculo e da solução de esporos	90
3.2.3.4	Preparação de mosto contaminado com ocratoxina A	90
3.2.3.5	Preparação dos ensaios de degradação.....	91
3.2.3.6	Quantificação da ocratoxina A nos mostos	91
3.3	Resultados	93

3.3.1	Degradação da ocratoxina A por acção de enzimas comerciais	93
3.3.1.1	Avaliação da actividade hidrolítica dos enzimas	93
3.3.1.2	Determinação da actividade enzimática	95
3.3.1.3	Efeito de inibidores na actividade hidrolítica dos enzimas comerciais	96
3.3.1.4	Avaliação da actividade hidrolítica a 50 °C	97
3.3.2	Degradação da ocratoxina A por acção de um enzima isolado a partir de <i>Aspergillus niger</i> MUM 03.58	98
3.3.2.1	Quantificação da proteína dos extractos enzimáticos	98
3.3.2.2	Detecção da actividade hidrolítica sobre a OTA	99
3.3.2.3	Purificação por cromatografia de troca aniónica do extracto GT-OTA	100
3.3.2.4	Efeito de inibidores na actividade hidrolítica sobre a OTA	102
3.3.2.5	Determinação dos parâmetros cinéticos	103
3.3.3	Degradação da ocratoxina A em mostos	106
3.4	Discussão e Conclusão	108
Capítulo IV		115
Actividade biológica de novos derivados de cromeno e de Na ₂ EDTA em <i>Aspergillus</i> spp.		115
4.1	Introdução	116
4.2	Material e Métodos	117
4.2.1	Actividade biológica de novos derivados de cromeno	117
4.2.1.1	Compostos químicos	117
4.2.1.2	Material biológico	119
4.2.1.3	Preparação do inóculo	119
4.2.1.4	Inibição do crescimento radial de <i>Aspergillus</i> spp. em placa de petri	120
4.2.1.5	Inibição do crescimento de <i>Aspergillus</i> spp. pelo composto 4a em microplaca	121
4.2.1.6	Inibição da produção de ocratoxina A em meio sólido	121
4.2.1.7	Inibição da produção de ocratoxina A em meio líquido	122
4.2.1.8	Análise estatística	122
4.2.2	Actividade biológica de Na ₂ EDTA	123
4.2.2.1	Composto químico	123
4.2.2.2	Material biológico	123
4.2.2.3	Preparação do inóculo	123
4.2.2.4	Inibição do crescimento de <i>Aspergillus</i> spp. pelo Na ₂ EDTA	123
4.2.2.5	Inibição da produção de ocratoxina A em meio sólido	124
4.2.2.6	Análise estatística	124
4.3	Resultados	125
4.3.1	Actividade biológica de novos derivados de cromeno	125
4.3.1.1	Inibição do crescimento radial de <i>Aspergillus</i> spp. em placa de petri	125
4.3.1.2	Inibição do crescimento de <i>Aspergillus</i> spp. pelo composto 4a em microplaca	132
4.3.1.3	Inibição da produção de ocratoxina A em meio sólido	134
4.3.1.4	Inibição da produção de ocratoxina A em meio líquido	136
4.3.2	Actividade biológica de Na ₂ EDTA	137
4.3.2.1	Inibição do crescimento de <i>Aspergillus</i> spp. pelo Na ₂ EDTA	137
4.3.2.2	Inibição da produção de ocratoxina A em meio sólido	139
4.4	Discussão e Conclusão	140
Considerações finais		145
Bibliografia		147
Anexos ao Capítulo II		166
Anexos ao Capítulo III		168
Anexos ao Capítulo IV		203

Capítulo I

Introdução geral

1.1 Micotoxinas

As micotoxinas são metabolitos secundários produzidos por fungos filamentosos (*i.e.*, metabolitos que não são essenciais para o seu normal crescimento, desenvolvimento e reprodução). São produzidas a partir das vias metabólicas dos policetídeos, dos terpenóides e de alguns processos que usam aminoácidos essenciais, possuem baixo peso molecular, estruturas químicas diversificadas e são tóxicos para animais, aves e peixes em pequenas concentrações (Steyn, 1995). Estas constituem um grave risco para a saúde pública porque são ubíquas numa grande variedade de produtos agro-alimentares. As micotoxinas são, normalmente, ingeridas de forma involuntária através do consumo de produtos de origem vegetal contaminados. No entanto, o consumo de produtos de origem animal pode também contribuir para a ingestão dos seus resíduos ou dos seus derivados, uma vez que se acumulam e são transformadas em certos tecidos e órgãos. Podem, ainda, provocar efeitos tóxicos quando inaladas ou por contacto directo com a pele.

O termo micotoxinas surgiu por volta de 1960, quando se relacionou a morte repentina de cem mil perus com a produção de aflatoxinas pelo *Aspergillus flavus* em bagaço de amendoim introduzido na sua alimentação. A partir daí, o interesse na descoberta de outros metabolitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos em produtos agrícolas aumentou consideravelmente (Bennett & Klich, 2003). Cerca de 300 micotoxinas foram já produzidas em condições laboratoriais a partir de culturas puras de fungos filamentosos. No entanto, apenas 20 delas são encontradas com frequência em quantidades suficientes para constituírem um verdadeiro risco para a segurança alimentar (Tabela 1.1.1). Estas são produzidas, essencialmente, pelos géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Claviceps*, *Penicillium* e *Fusarium*.

Tabela 1.1.1 Micotoxinas mais relevantes para a segurança alimentar produzidas por diferentes géneros de fungos filamentosos (elaborado segundo: Steyn, 1995)

Género	Micotoxinas
<i>Alternaria</i>	Ácido tenuazónico, alternariol e alternariol metil éter
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxina B ₁ , G ₁ e M ₁ , ocratoxina A, esterigmatocistina e ácido clicopiazónico
<i>Claviceps</i>	Ergo-alcalóides
<i>Fusarium</i>	Desoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, toxinaT-2, diacetoxiscirpenol, fumonisinas e moniliformina
<i>Penicillium</i>	Patulina, ocratoxina A, citrinina, penitrinina A e ácido clicopiazónico

As micotoxinas provocam efeitos tóxicos diversos no Homem e em animais, dependendo das quantidades ingeridas, do tempo de exposição, da espécie em causa, da sua idade, sexo e estado fisiológico ou, até mesmo, de eventuais sinergias entre diversas micotoxinas que possam estar presentes em simultâneo nos alimentos. Além do mais, as micotoxinas têm reconhecidos efeitos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, citotóxicos, neurotóxicos, nefrotóxicos e imunossupressores. Segundo Robinson *et al.* (2000), as micotoxinas podem provocar: toxicidade aguda que leva à morte dos indivíduos quando ingeridas em grandes quantidades (micotoxicoses); diminuição da produção de leite, ovos e diminuição de peso, quando expostos a níveis ligeiramente abaixo dos letais; interferência ou supressão das funções imunitárias e redução da resistência a infecções, quando expostos a pequenas concentrações; e formação de tumores e aparecimento de doenças crónicas em órgãos vitais, quando expostos a baixas concentrações mas por tempo prolongado. A capacidade de certas micotoxinas para debilitarem o sistema imunológico dos indivíduos e, por consequência, para reduzirem a sua resistência a doenças infecciosas é, presentemente, o efeito tóxico mais relevante e preocupante nos países desenvolvidos (FAO/IAEA, 2001).

As micotoxinas podem ser encontradas em diversos produtos agrícolas como, por exemplo, cereais, milho, frutos secos, frutas, sementes oleaginosas ou especiarias. No entanto, devido à sua acumulação ao longo da cadeia alimentar, podem, também, ser encontradas em produtos pecuários como o leite, os ovos ou a carne de animais (Tabela 1.1.2).

Na maioria dos casos, as micotoxinas são formadas no campo enquanto as colheitas agrícolas seguem o seu normal desenvolvimento. Nestas situações são produzidas por fungos que possuem, frequentemente, uma associação ecológica com a planta. É por isso comum a ligação entre certas espécies/micotoxinas e determinados produtos agrícolas (*ex A. flavus*/aflatoxinas em amendoins e *P. expansum*/patulina em maçãs). No entanto, as micotoxinas podem também ser formadas no período de pós colheita, durante o seu transporte e armazenagem, especialmente se for efectuado em deficientes condições.

O crescimento de fungos micotoxigénicos e a produção de micotoxinas nos produtos agrícolas depende de uma complexa relação entre fungo, hospedeiro e meio ambiente. No entanto, a disponibilidade de água e de temperaturas adequadas são factores essenciais para que os fungos colonizem esses produtos e possam produzir micotoxinas. Outros factores, como por exemplo a presença de danos físicos devido à acção de insectos ou de máquinas agrícolas, a composição atmosférica do local ou a presença de agentes conservantes podem, também, influenciar o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas (Pitt *et al.*, 2000).

Apesar das micotoxinas não poderem ser produzidas sem que haja crescimento fúngico, a ausência de fungos nem sempre garante que não estejam presentes micotoxinas, uma vez que estas são de difícil degradação e permanecem muito para além do fungo perder a sua viabilidade. Da mesma forma, a presença de fungos micotoxigénicos nem sempre implica a presença de micotoxinas, uma vez que podem não estar reunidas as condições ecofisiológicas necessárias para a produção da micotoxina.

Tabela 1.1.2 Algumas micotoxinas encontradas em certos produtos agro-alimentares (elaborado segundo: Dohlman, 2003; Varga & Kozakiewicz, 2006; Sweeney & Dobson, 1998; CAST, 2003)

Produto agrícola	Micotoxinas
Amendoins	Aflatoxinas, ácido clicopiazónico
Café	Ocratoxina A, esterigmatocistina
Carne e ovos	Patulina, citrinina, ocratoxina A, ácido clicopiazónico
Cereais	Desoxinivalenol, nivalenol, toxinaT-2, zearalenona, alternariol, alternariol metil éter, ácido tenuazónico, fumonisinas, ocratoxina A, citrinina, esterigmatocistina
Figos	Ocratoxina A
Frutos secos	Aflatoxinas, ocratoxina A
Maçãs	Patulina, citrinina
Milho	Aflatoxinas, desoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, fumonisinas, toxinaT-2, citrinina
Produtos lácteos	Aflatoxinas M ₁ e M ₂ , ácido clicopiazónico, ocratoxina A
Sementes oleaginosas	Aflatoxinas, ácido tenuazónico, alternariol,
Uvas	Ocratoxina A

O problema das micotoxinas é uma preocupação global, que provoca perdas económicas e humanas significativas. Cerca de 5 a 10% de toda a produção mundial de produtos alimentares parece estar irremediavelmente perdida devido a estas causas. Nos Estados Unidos da América, estima-se que a presença de micotoxinas em culturas como o milho, o trigo e os amendoins, possam provocar perdas directas de aproximadamente 932 milhões de Dólares anuais e indirectas (despesas com regulamentação e sua implementação, análises e aplicação de outras medidas de controlo) em mais 466 milhões (CAST, 2003). Em países subdesenvolvidos, extremamente dependentes de culturas locais (ex. milho em África), as micotoxinas provocam, para além de prejuízos económicos, morbidade elevada e mortes prematuras entre a população humana (FAO/IAEA, 2001). Alguns cientistas consideram que

a eliminação das micotoxinas seria a medida mais importante e benéfica para melhorar a dieta humana em todo o mundo, se fosse possível de ser implementada.

Para proteger a saúde dos consumidores, muitos países implementaram regulamentação que impõe limites à presença de certas micotoxinas em diversos produtos agro-alimentares. Esses limites variam de país para país devido a diferentes percepções quanto aos níveis considerados seguros para a saúde, ao seu grau de desenvolvimento ou mesmo devido aos interesses económicos locais relativamente a certas culturas (Dohlman, 2003). Por exemplo, dependendo do país em causa, o limite para a presença de aflatoxinas em alimentos varia entre 0 e 35 µg/Kg ou o limite para a presença de ocratoxina A em cereais varia entre 3 e 50 µg/Kg (FAO/IAEA, 2004).

A implementação desta legislação obriga os agentes económicos a controlar a presença de certas micotoxinas em alguns alimentos e impede a comercialização dos produtos contaminados com valores acima dos regulamentados. Uma correcta monitorização da presença de micotoxinas é, portanto, da maior importância, sendo para tal necessários métodos analíticos precisos e reprodutíveis. Métodos validados e adoptados pela AOAC Internacional (*Association of Analytical Communities International*), CEN (*Comité Européen de Normalisation*) ou ISO (*International Organization for Standardization*) são reconhecidos como métodos oficiais e podem ser utilizados no controlo de mercadorias a nível internacional (Gilbert & Anklam, 2002).

Os métodos analíticos variam significativamente consoante a micotoxina em causa, uma vez que existem micotoxinas com uma grande diversidade de propriedades físico-químicas e estruturais, mas variam, também, tendo em conta a matriz a analisar. No entanto, todos os métodos analíticos são compostos por 3 etapas fundamentais: a amostragem, a preparação da amostra e a análise. A amostragem é muito importante, sobretudo, quando se pretende analisar alimentos sólidos como, por exemplo, os cereais, pois esta constitui uma fonte de erros significativos que podem comprometer a validade do método utilizado (Whitaker, 2003). Neste tipo de produtos existe, normalmente, uma pequena percentagem de partículas que estão contaminadas com micotoxinas, podendo as partículas contaminadas conter elevadas quantidades de micotoxina (Schatzki & Pan, 1997). Nestas situações é recomendável que se recolha uma amostra que deve ser composta pela soma de pequenas amostragens feitas em diferentes pontos do lote a analisar. Por exemplo, para a análise de ocratoxina A, a directiva 2002/26/EC recomenda, para lotes entre 50 e 1500 toneladas, a recolha de uma amostra de 10 Kg composta por 100 amostras de 100 g (EC, 2002b). Para produtos líquidos

como o leite e seus derivados, sumos ou vinhos, a amostragem é menos exigente, uma vez que as micotoxinas se encontram distribuídas de forma homogénea na matriz a analisar. Por exemplo para sumos de uva ou vinhos vendidos a granel é recomendada a recolha de uma amostra de 1 Kg composta por 3 recolhas feitas em pontos diferentes do lote (EC, 2005). A amostra recolhida, quando sólida, é de seguida moída e homogeneizada, sendo uma ou várias sub-amostras submetidas a análise. Normalmente, quanto maior for a sub-amostra e quanto menor for o tamanho das partículas que resultam da moagem, menor será o erro associado ao método analítico. A sub-amostra é, usualmente, extraída com um solvente orgânico e o extracto resultante submetido a um ou vários passos de purificação utilizando, por exemplo, processos de partição líquido-líquido, colunas de imunoafinidade ou SPE. O extracto final é, então, analisado, recorrendo a técnicas como o TLC, o HPLC, o ELISA ou GC e GC/MS, estes dois últimos utilizados sobretudo na análise de tricotecenos (Gilbert & Anklam, 2002).

O controlo da presença de micotoxinas em alimentos passa, também, pela implementação de uma grande diversidade de medidas aquando da sua produção, armazenagem e processamento. Estas medidas podem dividir-se, genericamente, em medidas preventivas ou medidas correctivas.

As medidas preventivas podem ser aplicadas no campo (estratégias pré-colheita), ou depois de a colheita ter sido efectuada (estratégias pós-colheita). As medidas pré-colheita visam evitar a formação das micotoxinas através, por exemplo, da simples implementação de boas práticas agrícolas, da utilização de variedades resistentes a fungos micotoxigénicos ou de plantas geneticamente modificadas, enquanto que as medidas pós-colheita visam evitar a formação de micotoxinas através, essencialmente, da correcta armazenagem dos produtos agrícolas (Tabela 1.1.3).

Apesar das medidas preventivas serem, idealmente, adequadas para controlar a presença de micotoxinas em alimentos, na realidade, a existência de produtos agrícolas contaminados nos mercados internacionais é uma constante. Quando as micotoxinas estão presentes, certos processos de descontaminação ou de destoxificação podem ser aplicados de forma a remover ou reduzir os seus níveis para valores aceitáveis. Estas medidas, apelidadas de correctivas, são tecnologicamente muito variadas podendo ser subdivididas em métodos físicos, químicos ou biológicos (Tabela 1.1.4). As mais adequadas devem cumprir alguns requisitos, como destruir remover ou destoxificar efectivamente as micotoxinas, não dar origem a resíduos tóxicos que possam permanecer nos alimentos, não alterar as propriedades nutritivas dos alimentos e ser técnica e economicamente viáveis (Galvano *et al.*, 2001). Por exemplo, alguns

Tabela 1.1.3 Algumas medidas preventivas para o controlo de micotoxinas (elaborado segundo: Riley & Norred, 1999; Bennett & Klich, 2003)

Medidas preventivas

Estratégias pré-colheita

Redução das condições de *stress* para as plantas através de uma correcta irrigação, fornecimentos de nutrientes e protecção contra insectos

Eliminar os resíduos agrícolas e outras fontes de inóculo

Promover a rotação de culturas

Utilização de variedades resistentes a fungos micotoxigénicos

Aplicação de tratamentos com agentes químicos antifúngicos

Utilização de plantas transgénicas resistentes a fungos micotoxigénicos, insectos ou capazes de interferir com a produção de micotoxinas*

Utilização de sementes inoculadas com bactérias endófitas que excluam competitivamente fungos micotoxigénicos*

Exclusão competitiva de fungos micotoxigénicos através da introdução, nos campos, de estirpes fúngicas não micotoxigénicas*

Estratégias pós-colheita

Colheitas feitas com condições atmosféricas adequadas (tempo seco) de forma a evitar o desenvolvimento de fungos micotoxigénicos saprófitas

Remoção de grãos danificados e secagem antes da armazenagem para valores abaixo dos 10% de humidade

Manter as colheitas a temperatura baixas tanto quanto possível

Controlo do aparecimento de insectos ou de roedores e manutenção dos níveis de humidade e temperatura adequados durante a armazenagem

Limpeza frequente dos locais de armazenagem e das maquinarias utilizadas na manipulação dos produtos agrícolas

Utilização de agentes antifúngicos como o ácido propiónico ou acético

* algumas destas medidas encontram-se em desenvolvimento

métodos químicos de destoxificação (ex. tratamentos à base de amónia, bissulfitos e hidróxido de cálcio) são efectivos, no entanto, estes não garantem a segurança toxicológica dos produtos de reacção nem a integridade nutricional dos alimentos. É, ainda, importante salientar que a diluição de produtos contaminados com produtos não contaminados é uma prática proibida na União Europeia desde 1 de Janeiro de 1999 (Directiva da Comissão Europeia 1525/98), muito embora tenha sido uma prática comum no passado (Karlovsky, 1999). De igual forma, os tratamentos químicos não são permitidos na União Europeia em produtos destinados à alimentação humana. De entre as diversas tecnologias disponíveis, a descontaminação biológica pode vir a tornar-se a preferencial, na medida em que as reacções enzimáticas oferecem um processo de destoxificação específico, eficiente e amigo do ambiente. Contudo,

há ainda muita investigação a ser feita para que os sistemas de destoxificação biológica das micotoxinas se tornem práticos (Karlovsky, 1999).

As medidas preventivas e as medidas correctivas para controlar a presença de micotoxinas em alimentos são analisadas em mais detalhe nos pontos 1.3 e 1.4 do presente Capítulo.

Tabela 1.1.4 Algumas medidas correctivas para o controlo de micotoxinas (elaborado segundo: Riley & Norred, 1999; Galvano *et al.*, 2001; Dohlman, 2003)

Medidas correctivas

Métodos físicos

- Limpeza ou remoção de partículas finas reduz os níveis de micotoxinas
- Segregação ou separação de grãos contaminados ex., separação de grãos fluorescentes quando expostos a uma lâmpada ultra violeta ou com significativas alterações de cor
- Segregação por densidade e lavagem, aplicável na moagem húmida ou no processamento alcalino do milho
- Degradação térmica, no entanto, incompleta para a maioria das micotoxinas
- Microondas, são capazes de destruir níveis elevados de tricotecenos
- Degradação solar, aplicável para aflatoxinas
- Extrusão, aplicável para fumonisinas
- Moagem húmida, eliminação quase completa de zearalenona, fumonisinas e aflatoxinas
- Torrefacção de café ou de amendoins

Métodos químicos

- Hidrólise alcalina, aplicável para zearalenona e desoxinivalenol
- Bissulfito, destrói aflatoxina B₁ e reduz os níveis de desoxinivalenol no milho
- Amoniação, método aprovado para redução de aflatoxinas no México, África do Sul e alguns estados dos EUA
- Peróxido de hidrogénio/bicarbonato de sódio, destrói fumonisinas no milho
- Ozonação, degrada e destoxifica aflatoxinas

Métodos biológicos

- Fermentação, não elimina a aflatoxina B₁, a zearalenona ou a fumonisina B₁ (as borras podem conter elevados níveis de micotoxinas, sendo utilizadas nas rações animais)
- Probióticos, *Lactobacillus* e *Propionibacterium* podem reduzir a biodisponibilidade dietética da aflatoxina

Intervenção dietética

- Aditivos nutricionais como a colina, metionina, selénio, vitaminas, proteína, gorduras, antioxidantes e indutores de enzimas metabólicas podem ser adicionados às rações animais e prevenir toxicidade aguda
 - Adsorventes como aluminossilicato de sódio e cálcio hidratado, carvão activado, bentonites, zeólitos
-

1.2 Ocratoxina A

1.2.1 Propriedades químicas e físicas

A ocratoxina A (OTA) foi isolada e caracterizada, pela primeira vez, a partir do fungo *Aspergillus ochraceus* (van der Merwe *et al.*, 1965a) após ter sido verificado que milho infectado com algumas estirpes desta espécie causaram a morte de animais experimentais (van der Merwe *et al.*, 1965b). Esta micotoxina é uma di-hidroisocumarina (Figura 1.2.1), sendo constituída por uma molécula de 7-carboxi-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3-*R*-metilisocumarina (ocratoxina α) e por uma molécula de L- β -fenilalanina, que se encontram ligadas entre si por meio de uma ligação amida (Figura 1.2.2).

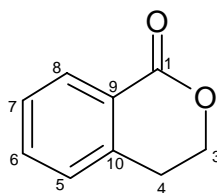
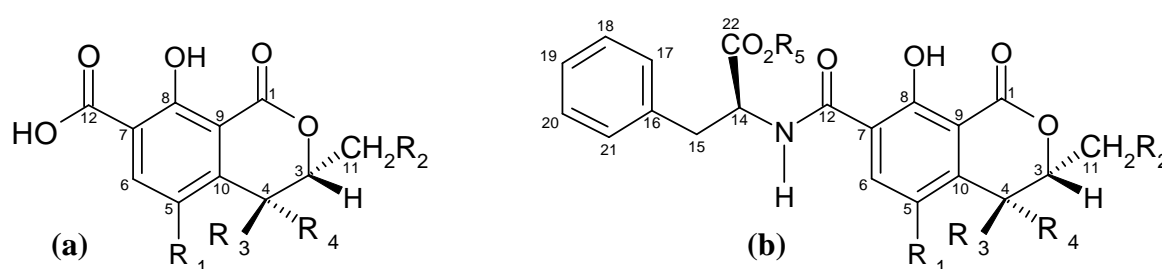


Figura 1.2.1 Estrutura química da di-hidroisocumarina.

A OTA pertence a um grupo de metabolitos secundários aos quais se dá o nome genérico de ocratoxinas e que possuem estruturas químicas muito semelhantes. São naturalmente produzidas, para além da OTA, a ocratoxina B (OTB), a ocratoxina C (OTC), a ocratoxina α (OT α), a ocratoxina β (OT β), as (4-*R*)- e (4-*S*)-hidroxi-ocratoxina A (4*R*-OH OTA e 4*S*-OH OTA), a 4-hidroxi-ocratoxina B (4-OH OTB) e a 10-hidroxi-ocratoxina A (10-OH OTA) (Figura 1.2.2).

O seu nome IUPAC é L-fenilalanina-*N*-[(5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1*H*-2-benzopirano-7-il)carbonil]-(*R*)-isocumarina e o seu número CAS (*chemical abstract specification*) é o 303-47-9 (Ringot *et al.*, 2006). A OTA é um cristal incolor de fórmula empírica C₂₀H₁₈O₆NCl, que possui um peso molecular de 403,822 Da (Cole *et al.*, 2003). É altamente solúvel em solventes orgânicos polares, solúvel em solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio e fracamente solúvel em água. O seu ponto de fusão é de 94-96 °C quando cristalizada a partir de benzeno e de 169 °C quando cristalizada a partir de xileno e o seu $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}/0,0005\text{MH}_2\text{SO}_4}$ é de 216, 330 nm com $\varepsilon = 37060$ e 6050, respectivamente

(Betina, 1989). A OTA emite uma fluorescência verde azulada, quando excitada com radiação ultravioleta de comprimento de onda igual a 366 nm que muda para uma fluorescência azul escura quando exposta a vapores de amónia (Betina, 1993). A sua fluorescência é usada com frequência para revelação em TLC e para a sua detecção em HPLC. A OTA possui, ainda, propriedades de ácido fraco com valores de pK_{a1} 4,2-4,4 e de pK_{a2} 7,0-7,3 devido ao grupo carboxílico do resíduo de fenilalanina e ao grupo fenólico da parte isocumárica, respectivamente (Chu, 1974b). A ocratoxina A pode ser armazenada em etanol ou tolueno/ácido acético (99:1, v/v) durante pelo menos um ano, desde que refrigerada e protegida da luz.



Estrutura	Composto	Identidade dos grupos R				
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
a	OT α	Cl	H	H	H	-
a	OT β	H	H	H	H	-
b	OTA	Cl	H	H	H	H
b	OTB	H	H	H	H	H
b	OTC	Cl	H	H	H	CH ₃ CH ₂
b	4 <i>R</i> -OH OTA	Cl	H	H	OH	H
b	4 <i>S</i> -OH OTA	Cl	H	OH	H	H
b	4-OH OTB	H	H	H	OH	H
b	10-OH OTA	Cl	OH	H	H	H

Figura 1.2.2 Estrutura química das ocratoxinas naturalmente produzidas por fungos filamentosos. (elaborado segundo: van der Merwe *et al.*, 1965a; Hutchison *et al.*, 1971; Xiao *et al.*, 1996b)

1.2.2 Fungos produtores de ocratoxina A

A ocratoxina A é produzida por diversas espécies pertencentes aos géneros *Penicillium* e *Aspergillus* (Tabela 1.2.1). Dentro do género *Penicillium* é, hoje em dia, aceite pela generalidade da comunidade científica que apenas o *P. verrucosum* e o *P. nordicum* são produtores de OTA. Os isolados de *P. viridicatum* que durante muito tempo foram referidos nalgumas publicações como produtores desta micotoxina foram reclassificados como *P. verrucosum* por Pitt (1987). Pelo contrário, dentro do género *Aspergillus* existe um maior número de espécies produtoras de OTA. Na tabela 1.2.1 podemos encontrar as que são aceites

como tal por Frisvad e co-autores (2006). Outras espécies têm sido, erradamente, dadas como produtoras de OTA devido a erros de identificação dos isolados em questão ou à utilização de culturas contaminadas com espécies produtoras desta micotoxina. Outras, ainda, foram reclassificadas por alguns investigadores possuindo, hoje em dia, um nome científico diferente. Por exemplo, o isolado original de *A. ochraceus* a partir do qual van der Merwe *et al.* (1965a) fizeram o primeiro isolamento de OTA foi recentemente reclassificado como *A. westerdijkiae* por Frisvad *et al.* (2004), e muitos outros *A. ochraceus* como *A. steynii*. A maioria das espécies apresentadas na Tabela 1.2.1 são raras e não levantam grande preocupação no que diz respeito à presença de OTA nos alimentos. As mais comuns e relevantes para tal, são o *A. alliaceus*, o *A. carbonarius*, o *A. niger*, o *A. ochraceus*, o *A. steynii*, o *A. westerdijkiae*, o *P. nordicum* e o *P. verrucosum* (Frisvad *et al.*, 2006). No entanto, é frequente encontrar estirpes destas espécies que não são produtoras de OTA.

Tabela 1.2.1 Fungos produtores de ocratoxina A

Fungos	Referências
<i>Aspergillus</i> secção <i>Circumdati</i>	
<i>A. cretensis</i>	(Frisvad <i>et al.</i> , 2004)
<i>A. flocculosus</i>	(Frisvad <i>et al.</i> , 2004)
<i>A. melleus</i>	(Hesseltine <i>et al.</i> , 1972)
<i>A. ochraceus</i>	(van der Merwe <i>et al.</i> , 1965b; Frisvad <i>et al.</i> , 2004)
<i>A. ostianus</i>	(Hesseltine <i>et al.</i> , 1972)
<i>A. persii</i>	(Ciegler, 1972)
<i>A. petrakii</i>	(Hesseltine <i>et al.</i> , 1972)
<i>A. pseudoelegans</i>	(Frisvad <i>et al.</i> , 2004)
<i>A. roseoglobulosus</i>	(Frisvad <i>et al.</i> , 2004)
<i>A. sclerotiorum</i>	(Hesseltine <i>et al.</i> , 1972; Varga <i>et al.</i> , 1996; Frisvad <i>et al.</i> , 2004)
<i>A. steynii</i>	(Frisvad <i>et al.</i> , 2004)
<i>A. sulphureus</i>	(Hesseltine <i>et al.</i> , 1972; Varga <i>et al.</i> , 1996; Frisvad <i>et al.</i> , 2004)
<i>A. westerdijkiae</i>	(Frisvad <i>et al.</i> , 2004)
<i>Aspergillus</i> secção <i>Flavi</i>	
<i>A. alliaceus</i> (<i>Petromyces alliaceus</i>)	(Varga <i>et al.</i> , 1996; Bayman <i>et al.</i> , 2002)
<i>Petromyces albertensis</i>	(Frisvad <i>et al.</i> , 2006)
<i>Aspergillus</i> secção <i>Nigri</i>	
<i>A. carbonarius</i>	(Horie, 1995; Téren <i>et al.</i> , 1996; Samson <i>et al.</i> , 2004)
<i>A. lacticoffeatus</i>	(Samson <i>et al.</i> , 2004)
<i>A. niger</i>	(Abarca <i>et al.</i> , 1994; Samson <i>et al.</i> , 2004)
<i>A. sclerotioniger</i>	(Samson <i>et al.</i> , 2004)
<i>Penicillium</i>	
<i>P. nordicum</i>	(Larsen <i>et al.</i> , 2001)
<i>P. verrucosum</i>	(van Walbeek <i>et al.</i> , 1969; Ciegler <i>et al.</i> , 1973; Pitt, 1987)

Estas espécies crescem em determinados produtos agro-alimentares, sendo responsáveis pela produção de OTA nos mesmos (Tabela 1.2.2). No entanto, existe quase sempre uma maior prevalência de uma delas. Por exemplo, o *A. alliaceus* é considerado o principal responsável pela contaminação de figos (Bayman *et al.*, 2002), o *A. carbonarius* pela contaminação de uvas (Cabañes *et al.*, 2002; Serra *et al.*, 2003), o *A. ochraceus* pela contaminação de grãos de café verde (Pitt *et al.*, 2001; Téren *et al.*, 1997), o *P. verrucosum* pela contaminação de cereais (Mills *et al.*, 1995; Lund & Frisvad, 2003) e o *P. nordicum* de produtos cárneos como salame ou fiambre e de queijos (Larsen *et al.*, 2001). O *A. niger* é também frequentemente isolado a partir de uvas e grãos de café, no entanto, este acaba por contribuir menos para a presença de OTA nestes produtos, uma vez que os isolados ocratoxigénicos são pouco frequentes (Serra *et al.*, 2006a; Pitt *et al.*, 2001) e uma vez que estes produzem, normalmente, pequenas quantidades de OTA (Esteban *et al.*, 2004).

Tabela 1.2.2 Principais espécies ocratoxigénicas isoladas a partir de produtos agro-alimentares

Produtos agro-alimentares	Espécie
Cereais	<i>P. verrucosum</i> , <i>A. ochraceus</i>
Figos	<i>A. alliaceus</i>
Grãos de café verde, especiarias	<i>A. carbonarius</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. niger</i>
Produtos cárneos, queijos	<i>P. nordicum</i>
Uvas, uvas passas	<i>A. carbonarius</i> , <i>A. niger</i>

1.2.3 Biossíntese da ocratoxina A

Como já foi referido, a ocratoxina A é constituída por uma di-hidroisocumarina (ocratoxina α) e por uma molécula de L- β -fenilalanina que se encontram ligadas entre si através de uma ligação amida. A via de biossíntese da OTA não está, ainda, completamente estabelecida, no entanto, sabe-se que a parte isocumárica é um pentacetídeo sintetizado através da via metabólica dos policetídeos e que a L- β -fenilalanina deriva da via metabólica do ácido xiquímico. Mais precisamente, estudos experimentais com precursores marcados radioativamente demonstraram que a parte isocumárica resulta da condensação de 5 unidades de acetato e da posterior adição em C7 de uma unidade de metionina que é subsequentemente oxidada para carboxilo (Ferreira & Pitout, 1969; Searcy *et al.*, 1969; Steyn *et al.*, 1970). Ao que tudo indica, a L- β -fenilalanina é incorporada intacta, ligando-se à isocumarina por via enzimática, uma vez que foi isolado um extracto enzimático a partir de *A. ochraceus* que

demonstrou ser capaz de ligar as duas fracções da molécula (Ferreira & Pitout, 1969). Por seu turno, o cloro é incorporado em C5 a partir de NaCl (muito embora não se saiba em que ponto exacto da biossíntese) e, provavelmente, através da acção de cloroperoxidasas (Wei *et al.*, 1971). Na Figura 1.2.2 pode-se observar, esquematicamente, a biossíntese da ocratoxina A.

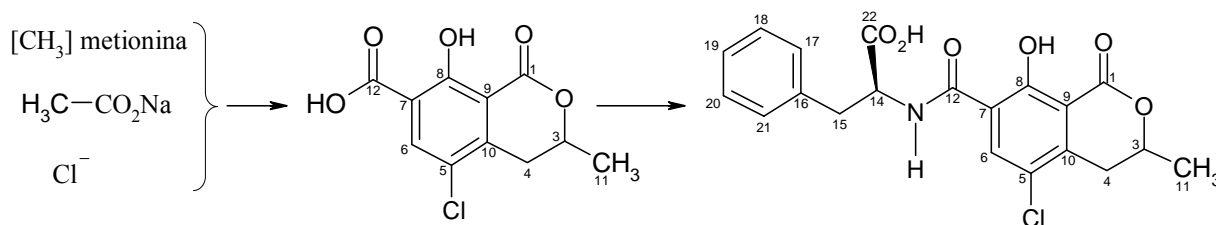


Figura 1.2.3 Biossíntese da ocratoxina A (Turner & Aldridge, 1983).

Não existe muita informação sobre os genes responsáveis por estes passos biossintéticos. Contudo, seriam, no mínimo, necessários genes que codifiquem para uma policetídeo sintetase, responsável pela síntese da isocumarina; para uma metilase, responsável pela formação do grupo carboxílico; para uma OTA sintetase, responsável por ligar a L-β-fenilalanina à isocumarina e para uma cloroperoxidase ou uma halogenase, responsável pela introdução do cloro (Färber & Geisen, 2004). Algumas publicações têm descrito a localização de fragmentos de DNA para algumas policetídeo sintetases relacionadas com a biossíntese da OTA em *P. nordicum* (Karolewicz & Geisen, 2005), *A. ochraceus* (O'Callaghan *et al.*, 2003) e *A. carbonarius* (Atoui *et al.*, 2006).

A produção de ocratoxina A depende de alguns factores tais como temperatura, actividade da água (a_w) do substrato, presença de micronutrientes, presença de cisteína e de outros compostos estruturalmente relacionados com esta, bem como de outros nutrientes (Betina, 1989). A temperatura e actividade da água mínima necessárias para a sua produção por *A. ochraceus* são de 12 °C e 0,83-0,87 a_w e por *P. verrucosum* de 4 °C e 0,95 a_w (Northolt *et al.*, 1979). As condições óptimas para a produção de OTA por *A. carbonarius* são de 15-20 °C e de 0,95-0,98 a_w (Mitchell *et al.*, 2004), para *A. ochraceus* de 25-30 °C e de 0,98 a_w (Ramos *et al.*, 1998) e para *P. verrucosum* de 24 °C e de 0,99 a_w (Krogh, 1979). Os meios de cultura mais utilizados para a sua biossíntese são o *Yeast extract sucrose* (YES) e o *Czapek yeast autolysate* (CYA) (Pitt & Hocking, 1997).

1.2.4 Ocorrência natural da ocratoxina A

A OTA tem sido detectada numa grande diversidade de produtos agro-pecuários como, por exemplo, cereais, grão de café verde, grãos de cacau, uvas, passas de uvas, figos secos, carne ou especiarias. Algumas publicações que deram conta de produtos contaminados com OTA e os respectivos níveis de contaminação encontrados estão listadas na Tabela 1.2.3.

Tabela 1.2.3 Ocratoxina A detectada nalguns produtos agro-pecuários

Produtos alimentares	Níveis de contaminação	Referência
Arroz	1,0-27,3 µg/Kg	(Gonzalez <i>et al.</i> , 2006)
Carne de porco	0-2,9 µg/Kg	(Jørgensen & Petersen, 2002)
Cevada e aveia	0,1-17,8 µg/Kg	(Scudamore <i>et al.</i> , 1999)
Especiarias	4,2-103,2 µg/Kg	(Thirumala-Devi <i>et al.</i> , 2001)
Feijão	0,25-0,92 µg/Kg	(Domijan <i>et al.</i> , 2005)
Figos secos	<0,1-35,1 µg/Kg	(Senyuva <i>et al.</i> , 2005)
Frutos secos	0,1-30 µg/Kg	(Iamanaka <i>et al.</i> , 2005)
Grãos de cacau	0,35-14,8 µg/Kg	(Amezqueta <i>et al.</i> , 2004)
Grãos de café verde	0-48 µg/Kg	(Romani <i>et al.</i> , 2000)
Leite	0,011-0,058 µg/L	(Skaug, 1999)
Milho	0,11-0,15 µg/Kg	(Shotwell <i>et al.</i> , 1969)
Passas de uva	0,2-53,6 µg/Kg	(MacDonald <i>et al.</i> , 1999)
Rins de porco	0-15 µg/Kg	(Jørgensen & Petersen, 2002)
Trigo, aveia e centeio	0,03-27 µg/Kg	(Scott <i>et al.</i> , 1972)
Uvas	0,008-1,6 µg/Kg	(Serra <i>et al.</i> , 2006b)

No entanto, a grande maioria destes produtos são processados de diversas formas antes de serem consumidos, podendo os níveis de OTA no produto final serem influenciados por alguns dos processos envolvidos, como acontece com a preparação do malte e fabricação de cerveja, com a moagem de trigo e panificação, com a torrefacção do café ou com a vinificação. Concretamente, estão descritas reduções na ordem dos 56% para a maltagem (Baxter *et al.*, 2001); dos 21% para a fermentação do malte (Scott *et al.*, 1995); dos 80% na produção de pão branco e 40% na produção de pão integral (Scudamore *et al.*, 2003); dos 35, 71 e 83% para a torrefacção, respectivamente, suave, media e forte do café (Suarez-Quiroz *et al.*, 2005) e dos 92% para a vinificação (Fernandes *et al.*, 2007). Apesar de tudo, a OTA é encontrada em vários produtos alimentares processados (Tabela 1.2.4) e persiste através da cadeia alimentar, uma vez que é detectada com frequência em sangue de humanos (Zimmerli & Dick, 1995; Ueno *et al.*, 1998; Sangare-Tigori *et al.*, 2006) e no leite materno (Skaug *et al.*, 2001; Turconi *et al.*, 2004; Micco *et al.*, 1995).

Tabela 1.2.4 Ocratoxina A detectada nalguns produtos alimentares processados

Produtos alimentares	Níveis de contaminação	Referência
Alimentos para crianças	0,06-2,4 µg/Kg	(Lombaert <i>et al.</i> , 2003)
Café torrado	3,2-17,0 µg/Kg	(Tsubouchi <i>et al.</i> , 1988)
Cereais de pequeno almoço	0,4-8,8 µg/Kg	(Molinié <i>et al.</i> , 2005)
Cerveja	<0,01-0,135 µg/L	(Visconti <i>et al.</i> , 2000)
Fiambre, presunto, etc	<0,03-10,0 µg/Kg	(Pietri <i>et al.</i> , 2006)
Vinho	<0,003-0,388 µg/L	(Zimmerli & Dick, 1996)
Produtos derivados de cacau	0,22-0,77 µg/Kg	(Tafari <i>et al.</i> , 2004)
Salami	<0,006-0,40 µg/Kg	(Monaci <i>et al.</i> , 2005)
Sumos de uva	<0,003-0,311 µg/L	(Zimmerli & Dick, 1996)

De forma a se perceber melhor os níveis médios de OTA passíveis de serem encontrados em cada um destes produtos, elaborou-se a Tabela 1.2.5, utilizando os dados compilados no relatório SCOOP Task 3.2.7 (EC, 2002a) que são relativos à OTA detectada em produtos agro-alimentares na Comunidade Europeia, compilados para avaliar a ingestão média diária de OTA na Europa.

Tabela 1.2.5 Valores médios de OTA detectados nalguns produtos agro-alimentares na Comunidade Europeia (EC, 2002a)

Produtos alimentares	Nº de amostras analisadas	Amostras positivas (%)	Concentração média de OTA
Alimentos para bebés	97	65	0,120 µg/Kg
Café			
Grãos de café verde	1704	36	1,620 µg/Kg
Café processado	1184	46	0,724 µg/Kg
Cereais			
Trigo	979	28	0,269 µg/Kg
Milho	167	13	0,165 µg/Kg
Aveia	164	30	0,192 µg/Kg
Sorgo	34	71	0,136 µg/Kg
Centeio	444	53	0,597 µg/Kg
Cevada	142	24	0,301 µg/Kg
Arroz	63	6	0,217 µg/Kg
Cerveja	496	39	0,028 µg/L
Especiarias	361	52	1,150 µg/Kg
Frutos secos	800	73	2,298 µg/Kg
Grãos de leguminosas	371	4	0,149 µg/Kg
Leite	565	9	0,010 µg/L
Produtos cárneos	1860	18	0,198 µg/Kg
Produtos derivados de cacau	547	81	0,236 µg/Kg
Sumos de fruta	353	42	0,190 µg/L
Vinho	1470	59	0,357 µg/L

Nesta tabela pode-se verificar, também, a intensidade com que têm sido analisados certos alimentos e a incidência das contaminações. Essencialmente, verifica-se que os cereais, os produtos cárneos, o café verde e o vinho estão entre os produtos mais controlados; que os frutos secos (2,298 µg/Kg), os grãos de café verde (1,620 µg/Kg) e as especiarias (1,150 µg/Kg) apresentam as concentrações de OTA mais elevadas e que as maiores incidências são encontradas nos produtos derivados de cacau, nos frutos secos e nos alimentos para bebés. Ainda, de acordo com o relatório anterior, o contributo de cada um destes alimentos para a ingestão total média de OTA pela população Europeia é de 50% para os cereais, de 13% para o vinho, de 10% para o café, de 8% para as especiarias, de 6% para outros produtos diversos, de 5% para a cerveja, de 4% para o cacau, de 3% para os frutos secos e, finalmente, de 1% para os produtos cárneos.

Para além de se encontrar em muitos produtos para consumo humano, a OTA tem sido, também, detectada em alimentos destinados à alimentação animal (Tabela 1.2.6).

Tabela 1.2.6 OTA detectada nalguns produtos destinados à alimentação animal

Produtos	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras positivas (%)	Concentração média de OTA (µg/Kg)	Referência
Alimento para aves	14	43	0,5	
Alimento para bovinos	11	9	0,55	
Milho	27	33	3,95	(Jaimez <i>et al.</i> , 2004)
Glúten de milho	13	15,4	1,95	
Sementes de algodão	7	29	6,19	
Miolo de palma	6	17	3,19	
Alimento para aves	8	38	27	
Alimento para suínos	8	13	34	(Dalcero <i>et al.</i> , 2002)
Alimento para coelhos	8	25	21,8	
Farelo de amendoim	27	4	50-100	
Painço de milho	8	25	>100	(Thirumala-Devi <i>et al.</i> , 2002)
Farelo de arroz	14	7	10-100	
Sorgo	29	31	10- >100	
Semente de girassol	10	1	30-49	

Neste domínio, os processos envolvidos na produção de rações animais e a transposição da OTA para produtos de carne têm sido alvo de diversos estudos. Foi, por exemplo, verificado que a extrusão pode contribuir para a redução dos níveis de OTA em 40% (Scudamore *et al.*, 2004) mas, também verificado, que esta micotoxina se acumula de forma significativa nos rins e no fígado de porcos e, em menor quantidade, nos tecidos musculares e na gordura

(Malagutti *et al.*, 2005). Adicionalmente, é frequente a utilização de sub-produtos que derivam do processamento de cereais como, por exemplo, resíduos de limpeza de cereais, grãos quebrados, farelo de trigo ou de milho, na alimentação directa de animais ou na produção de alimentos compostos para estes. No entanto, estes sub-produtos possuem, na sua grande maioria, níveis de OTA mais elevados do que o normal (Scudamore, 2005).

1.2.5 Toxicidade e relevância

De entre as várias ocratoxinas, a OTA é considerada a mais tóxica de todas, sendo a mais relevante do ponto de vista de segurança alimentar. No entanto, algumas publicações consideram que a OTC é tão ou mais tóxica que a OTA (Xiao *et al.*, 1996a; Muller *et al.*, 2003), uma vez que após a sua ingestão esta é rapidamente convertida em OTA, ficando disponível na corrente sanguínea nessa forma (Fuchs *et al.*, 1984; Li *et al.*, 1997).

A ocratoxina A é essencialmente conhecida pelas suas propriedades nefrotóxicas, estando implicada, nos países Escandinavos, no síndrome de nefrotoxicidade em suínos; nos países dos Balcãs, na nefrotoxicidade endémica em humanos (BEN) e nos tumores uroteliais (UT) e nos países do norte de África, na nefropatia intersticial crónica (CIN). Esta micotoxina revelou-se nefrotóxica para todos os animais testados com excepção de ruminantes adultos, sendo os suínos os mais sensíveis (Krogh, 1992). Contudo, o seu envolvimento na BEN e na UT não está totalmente esclarecido, sendo também apontadas outras causas como possíveis responsáveis. Apesar de tudo, o envolvimento da OTA e/ou de outras micotoxinas é considerado o factor preponderante por certos investigadores (Pfohl-Leskowicz *et al.*, 2002). O seu possível envolvimento na CIN tem sido descrito mais recentemente, existindo fortes evidências nesse sentido, sobretudo na Tunísia, onde os níveis de OTA no sangue de indivíduos doentes e nos alimentos têm vindo a ser controlados desde 1991 (Abid *et al.*, 2003).

Adicionalmente, outros efeitos tóxicos como, por exemplo, efeitos carcinogénicos (Huff, 1991), mutagénicos (de Groene *et al.*, 1996), teratogénicos (Mayura *et al.*, 1982), neurotóxicos (Sava *et al.*, 2006), hepatotóxicos (Schlosberg *et al.*, 1997) e imunotóxicos (Bondy & Pestka, 2000) têm sido descritos. A OTA é considerada, ainda, um composto possivelmente carcinogénico para os seres humanos, estando classificada no grupo 2B por existirem evidências comprovadas em animais de laboratório mas não em seres humanos (IARC, 1993).

Estudos de toxicidade aguda em animais têm demonstrado que alguns são mais susceptíveis a esta micotoxina do que outros, estando o porco entre os mais sensíveis, com um LD₅₀ entre 1,0 e 6,0 mg/Kg. Na Tabela 1.2.7 encontram-se valores de LD₅₀ publicados para outras espécies. Da mesma forma, a OTA apresenta tempos médios de vida que variam bastante de espécie para espécie, sendo o mais baixo de 40 horas para o rato e o mais elevado de 35,5 dias para o homem (Tabela 1.2.7). Além do mais, nalguns destes estudos a OTA provou ser capaz de provocar hemorragias em quase todos os órgãos vitais, necroses no fígado e em tecidos linfáticos, entre outros efeitos.

Tabela 1.2.7 Alguns valores de LD₅₀ e de tempos médios de vida ($t_{1/2}$) da OTA em algumas espécies (elaborado segundo o artigo de revisão: O'Brien & Dietrich, 2005)

Espécie	LD ₅₀ oral (mg/Kg p.c.)	$t_{1/2}$ (p.o.)
Homem	nd	35,5 dias
Macaco	nd	21 dias
Porco	1,0-6,0	72-120 horas
Ratazana	20-30	55-120 horas
Rato	48-58	40 horas

nd – não disponível; p.o. – administrada oralmente

Os elevados tempos médios de vida da OTA em diferentes animais devem-se ao facto de esta ser excretada com dificuldade através da urina devido à sua grande afinidade para algumas proteínas do plasma sanguíneo, essencialmente, para a albumina. Esta afinidade foi observada *in vitro* com albumina de soro bovino (Chu, 1974a) e de soro humano (Perry *et al.*, 2003), e a sua relação com a excreção da OTA comprovada por Kumagai (1985) ao verificar que ratos deficientes em albumina foram capazes de eliminar mais rapidamente esta micotoxina do que ratos normais. A OTA é, ainda, parcialmente excretada através da via biliar, sendo esta via de excreção a predominante nas espécies que apresentam tempos médios de vida mais baixos (ex. o rato), ao contrário do que acontece em humanos e macacos onde a via urinária é a preponderante (Dietrich *et al.*, 2005). No entanto, grande parte da OTA é metabolizada pelo organismo e excretada na forma de OT α , 4R-, 4S-OH OTA ou 10-OH OTA, uma vez que estes são de mais fácil eliminação através da urina e das fezes (Storen *et al.*, 1982). Genericamente a OTA é considerada um composto tóxico cumulativo de fácil absorção e de eliminação lenta.

Os mecanismos através dos quais a OTA produz os seus efeitos tóxicos são vários e no que diz respeito à sua carcinogenicidade, controversos. De uma forma geral é considerado que a sua toxicidade pode advir da sua capacidade para interagir e se ligar a certas macromoléculas, para formar espécies reactivas, para inibir a respiração mitocondrial e para formar aductos com DNA (Ringot *et al.*, 2006).

Concretamente, está comprovado que a OTA é capaz de inibir alguns enzimas que utilizam a fenilalanina como substrato, pelo facto de ser um análogo deste aminoácido. Entre outros, interfere com a síntese proteica uma vez que inibe a fenilalanina-tRNA sintetase (Creppy *et al.*, 1983a), inibe a fenilalanina-hidroxilase presente no fígado (Zanick-Grubisik *et al.*, 2000) e interfere com a gluconeogénese por reduzir os níveis de fosfoenolpiruvato carboxiquinase ao inibir a síntese do mRNA que codifica para este enzima (Dirheimer & Creppy, 1991). A OTA demonstrou, também, ser capaz de destabilizar a membrana celular, pois consegue associar-se a iões Fe^{3+} e produzir um complexo OTA- Fe^{2+} que, por sua vez, gera radicais hidroxilos reactivos que levam à peroxidação dos lípidos membranares e ao aumento da sua permeabilidade iónica (Ringot *et al.*, 2006). Adicionalmente, o aumento da permeabilidade membranares leva a uma acumulação excessiva de Ca^{2+} no interior celular, desencadeando-se a apoptose e necrose celular (Khan *et al.*, 1989). Por outro lado, a respiração mitocondrial é afectada pela OTA, pois esta inibe os transportadores membranares de fosfato levando à redução dos níveis de ATP produzidos (Ringot *et al.*, 2006). Finalmente, a OTA é genotóxica, tanto *in vitro* como *in vivo*, mas o mecanismo de genotoxicidade é ainda pouco claro. Por um lado, um grupo de investigadores defende que a OTA induz genotoxicidade depois de esta ser biotransformada em outros análogos que são capazes de formar aductos com o DNA (Pfohl-Leszkiwicz & Manderville, 2007). Por outro lado, outro grupo de investigação defende que não está comprovada a formação de aductos com DNA e que o mecanismo pode passar pela indução da formação de fusos mitóticos aberrantes (Mally & Dekant, 2005). No entanto, é aceite por ambos que a OTA é um potente carcinogénio renal em ratos.

A OT α não tem sido tão estudada do ponto de vista toxicológico quanto a OTA. Apesar disso, é apontada como não tóxica. A título de exemplo, Creppy e co-autores (1983b) não registaram efeitos imunossupressores quando esta foi testada em ratos, ao contrário do que verificaram com a OTA; Bruinink e co-autores (1998) consideraram que esta é 1000 vezes menos tóxica do que a OTA para culturas de células cerebrais e Li e co-autores (1997) verificaram, em ratos, que a OT α possui um tempo médio de vida (9,6 h) muito inferior ao da

OTA (103 h). Portanto, é geralmente considerado que processos que favoreçam a conversão de OTA em OT α contribuem para diminuir de forma substancial os seus efeitos tóxicos.

Na medida em que está demonstrada a exposição humana à OTA através da sua detecção em sangue e no leite materno, como exposto atrás, e face às suas anteriormente referidas propriedades tóxicas, a presença de OTA em produtos alimentares é de todo indesejável, sendo recomendado, tal como para outras micotoxinas, que os níveis presentes nos alimentos sejam reduzidos tanto quanto tecnologicamente é possível. Para além disso, é aconselhado pelo *European Union Scientific Committee for Food* que a OTA não seja ingerida em quantidades superiores a 5 ng/Kg de peso corporal/dia (Petzinger & Weidenbach, 2002).

1.2.6 Legislação e controlo

Dada a ocorrência de ocratoxina A numa gama alargada de produtos alimentares e estando comprovada a exposição humana a esta micotoxina, diversos países têm adoptado regulamentação adequada de forma a estabelecer barreiras à comercialização de produtos contaminados com OTA acima de certos valores. Estas medidas, em conjunto com a compreensão dos factores que conduzem à formação da OTA, de forma a desenvolver estratégias que limitem a sua formação, são elementos importantes para garantir que o consumidor é adequadamente protegido.

Os limites impostos são definidos tendo em conta estimativas da ingestão diária de OTA efectuada pelas populações, que variam entre os 0,7 e os 4,6 ng/Kg de peso corporal/dia quando baseadas nos níveis médio de OTA presentes nos alimentos, e entre os 0,2 e os 2,4 ng/Kg de peso corporal/dia, quando calculadas a partir do nível médio de OTA encontrado no sangue das populações (SCF, 1998). Na Europa, cerca de metade dessa ingestão diária pode ser atribuída a cereais ou produtos derivados dos cereais, como vimos atrás (EC, 2002a).

Um apanhado efectuado em 2004 sobre a regulamentação, a nível mundial, respeitante às micotoxinas (FAO/IAEA, 2004), mostrou que, dos 99 países que possuíam legislação para o controlo de pelo menos uma micotoxina num produto alimentar, apenas 37 disponham de regulamentação para a OTA. Além do mais, observou-se que os valores máximos impostos pelos diferentes países variam consideravelmente. Por exemplo, no caso dos cereais, os limites legislados podem variar entre os 3 e os 50 μ g/Kg, apesar de 29 dos países possuírem um limite máximo de 5 μ g/Kg.

A União Europeia, por seu lado, com o objectivo de controlar a exposição da sua população à ocratoxina A e com o intuito adicional de harmonizar os diferentes limites legais estabelecidos pelos seus países membros, que dificultam muitas vezes a rápida e normal realização de trocas comerciais, estabeleceu e reviu, recentemente, os limites oficiais máximos para a presença de ocratoxina A em diversos tipos de alimentos, como se indica na Tabela 1.2.7. Alguns produtos encontram-se, no entanto, ainda à espera da imposição de um limite legal.

Tabela 1.2.8 Níveis máximos de ocratoxina A permitidos em certos alimentos na Comunidade Europeia (EC, 2006)

Produtos	Limite legal ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
Cereais não processados	5,0
Cereais processados ou para consumo directo por humanos	3,0
Uvas passas	10,0
Grãos de café torrado ou café torrado moído	5,0
Café solúvel (instantâneo)	10,0
Vinho	2,0
Bebidas com vinho na sua composição	2,0
Sumo de uvas, concentrado de sumo de uvas, néctar de uvas, mosto de uvas e concentrado de mosto de uvas para consumo humano	2,0
Alimentos à base de cereais e outros alimentos destinados a bebés e crianças	0,50
Alimentos dietéticos para fins médicos específicos destinados a bebés	0,50
Grãos de café verde, frutos secos que não uvas passas, cerveja, cacau e seus derivados, vinhos licorosos, produtos cárneos, especiarias e licores	-

- sem limite legal estabelecido

1.2.7 Amostragem e análise em produtos alimentares contaminados

Métodos de análise específicos, sensíveis, precisos e reprodutíveis são necessários para controlar os níveis de ocratoxina A nos alimentos e assim fazer cumprir os limites legais, para avaliar a exposição humana a esta micotoxina e para a investigação laboratorial.

Nos métodos analíticos para a OTA, tal como acontece com as outras micotoxinas, é necessário proceder de forma sequencial a uma correcta amostragem, à preparação da amostra recolhida, à extracção da totalidade ou de parte da amostra preparada, à limpeza do extracto obtido e, finalmente, à quantificação e confirmação da OTA.

Como já foi referido anteriormente, uma correcta amostragem é essencial para garantir a validade do método pois esta constitui uma fonte de erros significativos, sobretudo, quando se

quer analisar matrizes sólidas (Whitaker, 2003). No que diz respeito à OTA e para efeitos de controlos oficiais, a directiva comunitária 2005/5/EC estabelece, para diversos produtos alimentares e relativamente à dimensão dos lotes, o número de amostras que é necessário recolher e a sua dimensão (EC, 2005).

Depois de recolhida, a amostra necessita de ser preparada antes de ser extraída. Esta preparação é feita, sobretudo, quando são analisados alimentos sólidos, sendo necessário proceder à sua trituração de forma a obter uma boa homogeneização e a reduzir o tamanho das partículas a analisar. Normalmente, quanto menor for o tamanho das partículas obtidas, menores serão os erros associados ao método analítico (Spanjer *et al.*, 2006).

A extracção das amostras, para o caso particular da OTA, é feita utilizando solventes orgânicos como o metanol, o acetonitrilo, o acetato de etilo ou o clorofórmio (normalmente acidificados), soluções aquosas de NaHCO_3 (entre 1 a 5%) ou misturas destes. Algumas misturas de solventes utilizadas são: metanol/ H_2O , acetonitrilo/ KCl , clorofórmio/metanol, misturas de solventes orgânicos com ácido fosfórico diluído ou misturas de metanol e NaHCO_3 em várias proporções (Betina, 1985). Mais recentemente, tem sido estudada a aplicação de técnicas como a extracção com recurso a microondas ou a extracção líquida pressurizada de forma a reduzir a quantidade de solventes utilizados e o tempo dispendido com este passo analítico, aumentando as taxas de recuperação da OTA (Liazid *et al.*, 2007).

Os processos de purificação das amostras incluem a partição com solventes e processos cromatográficos (Betina, 1993). No caso da OTA, devido aos grupos com carácter ácidos da sua molécula, é possível purificá-la com bastante eficiência depois de ter sido extraída com um solvente orgânico. É necessário, para tal, proceder à sua partição em solução aquosa de NaHCO_3 e re-extraír a micotoxina dessa solução com um solvente orgânico depois de a acidificar (Frisvad & Thrane, 1993). No entanto, hoje em dia, a utilização de colunas de imunoafinidade está muito generalizada na maior parte dos métodos descritos na literatura (Castegnaro *et al.*, 2006). Técnicas como a extracção em fase sólida (SPE) (Hernandez *et al.*, 2006) ou a micro-extracção em fase sólida (SPME) (Aresta *et al.*, 2006) têm vindo, também, a ser implementadas e utilizadas com maior frequência. Recentemente, polímeros molecularmente impressos começaram a ser desenvolvidos para a purificação e concentração de OTA, procurando substituir as colunas de imunoafinidade demasiado caras e passíveis de ser utilizadas apenas uma única vez (Baggiani *et al.*, 2001; Yu & Lai, 2006).

Finalmente, para a detecção e quantificação da OTA são sobretudo utilizados técnicas cromatográficas como o TLC e o HPLC. O TLC foi durante muitos anos a técnica mais

utilizada para esse fim, tendo vindo gradualmente a ser substituído pelo HPLC devido, essencialmente, à maior sensibilidade, precisão e reprodutibilidade desta última técnica mas, também, devido à possibilidade de automação. No entanto, o TLC continua a ser muito útil em determinadas situações, sendo considerado que pode continuar a desenvolver um papel importante nos países sub-desenvolvidos ou em vias de desenvolvimento, continuando a existir, por isso, para certas micotoxinas, programas de validação de métodos que utilizam esta técnica (Gilbert & Anklam, 2002). Para a determinação da OTA por TLC utilizam-se placas de sílica gel ou placas de sílica gel pré-tratadas com ácido oxálico e, como fase móvel, composições de solventes de várias naturezas, como sejam, a título de exemplo, o tolueno/acetato de etilo/ácido acético (6:3:1, v/v/v) e o benzeno/ácido acético (4:1, v/v). Outros ainda, podem ser encontrados no artigo de revisão de Betina (1985). Depois de efectuada a separação, a sua visualização é feita expondo as placas à luz ultravioleta (366 nm), uma vez que a OTA emite fluorescência azul esverdeada e a sua identificação é feita comparando os Rf obtidos com valores de referência ou com o Rf de um padrão aplicado na própria placa. Adicionalmente, a sua confirmação é feita expondo as placas de TLC a vapores de amónia ou pulverizando as mesmas com soluções aquosas de NaHCO₃ ou de NaOH de forma a alterar a sua fluorescência para azul escuro. Pode ser ainda confirmada por derivatização com trifluoreto de boro, comparando o Rf do derivado ester metílico com padrões (Betina, 1993).

Actualmente, os procedimentos de detecção de OTA que utilizam o HPLC são os mais frequentes. Alguns desses procedimentos utilizam detectores de ultravioletas; contudo, está, hoje em dia, mais generalizada a utilização de detectores de fluorescência, uma vez que são mais sensíveis e mais específicos. Detectores de espectro de massa têm também vindo, mais recentemente, a ser utilizados.

Colunas de fase reversa têm sido quase exclusivamente adoptadas para a separação cromatográfica da ocratoxina A, bem como a utilização de eluentes como acetonitrilo/H₂O, metanol/H₂O ou acetona/H₂O acidificados com ácidos como o ácido fosfórico, o ácido acético, o ácido fórmico ou o ácido trifluoracético (Frisvad & Thrane, 1993).

O ELISA tem, também, sido utilizado para a detecção e quantificação da OTA. Estes ensaios baseados em reacções antigénio-anticorpo possibilitam análises rápidas, específicas e sem a necessidade de utilizar grandes equipamentos. No entanto, e embora por vezes os limites de detecção sejam comparáveis com alguns métodos cromatográficos, existe a possibilidade de ocorrerem falsos positivos devido à reacção cruzada do anticorpo com outras ocratoxinas e de ocorrerem falsos negativos devido à falta de sensibilidade da técnica

(Visconti & de Girolamo, 2005). Outras técnicas mais recentes têm sido também desenvolvidas e implementadas. São elas, por exemplo, os aparelhos de fluxo lateral (constituídos por anticorpos imobilizados em membranas), as matrizes de biossensores, os imunoenaios de fluorescência polarizada e os imunoenaios de eléctrodos impressos (Visconti & de Girolamo, 2005).

Para alguns produtos alimentares, nomeadamente cevada, milho, trigo, rins, vinho e cerveja, estão desenvolvidos métodos oficiais para a análise e detecção de ocratoxina A, como se indica na Tabela 1.2.9.

Tabela 1.2.9 Métodos validados para a detecção de OTA em alguns produtos alimentares (elaborado segundo os artigos de revisão: Gilbert & Anklam, 2002; Monaci & Palmisano, 2004; Visconti & de Girolamo, 2005)

Matriz	Método oficial (referência)	Limpeza da amostra	Técnica cromatográfica
Cevada	AOAC 2000.03 CEN 14132	IAC	HPLC-FD
Grãos de café verde	AOAC 975.38	CC	TLC
Grãos de café verde	AOAC 2004.10	-	HPLC-FD
Café torrado	AOAC 2000.09 CEN 14132	SPE + IAC	HPLC-FD
Milho, cevada e rins	AOAC 991.44	CC	HPLC-FD
Cerveja, vinho branco e tinto	AOAC 2001.01 CEN 14133 OIV 16/2001	IAC	HPLC-FD
Cevada, milho e farelo de trigo	CEN 15141-2	CC	HPLC-FD
Cevada, farelo de trigo e centeio	NMLK 143	CC	HPLC-FD
Alimentos de bebés	em aprovação pela CEN (Burdaspal <i>et al.</i> , 2001)	IAC	HPLC-FD
Pó de cacau	em aprovação pela CEN (Brera <i>et al.</i> , 2005)	IAC	HPLC-FD
Frutos secos	em aprovação pela CEN (MacDonald <i>et al.</i> , 2003)	IAC	HPLC-FD

CC- coluna cromatográfica, HPLC-FD- cromatografia líquida de alta resolução com detecção por fluorescência, NMLK- *Nordic committee on food analysis*

1.3 Estratégias de prevenção para o controlo de micotoxinas em alimentos

A implementação de estratégias de prevenção é, sem dúvida, a via mais importante para controlar a presença de micotoxinas, nomeadamente da OTA, em produtos alimentares de forma a reduzir a sua persistência através da cadeia alimentar e assim evitar a sua ingestão pelo consumidor final. Os métodos de prevenção concentram presentemente um grande esforço de investigação, estando a ganhar particular relevância as abordagens do tipo HACCP, com alguns sistemas a serem desenvolvidas para vários produtos (FAO/IAEA, 2001).

1.3.1 Sistema de HACCP

O sistema de controlo HACCP corresponde a um conjunto de medidas de controlo concebido especificamente para prevenir a ocorrência de problemas de segurança em relação a um determinado produto, sendo normalmente aplicado a produtos alimentares. A concepção de um sistema HACCP envolve, pois, o estabelecimento de um sistema de gestão que identifica pontos críticos de controlo na produção, armazenagem e processamento de produtos alimentares. Ou seja, envolve a identificação de fases do processo nas quais é necessário introduzir medidas de controlo de forma a impedir problemas de segurança e consequentes riscos inaceitáveis para a saúde humana ou animal, podendo estes incidir sobre aspectos de natureza biológica, química ou física, como sejam, por exemplo e respectivamente, a presença de microrganismos patogénicos e/ou as suas toxinas, a presença de resíduos de pesticidas ou a presença de materiais estranhos como fragmentos de vidro ou metal. O método define, ainda, limites críticos em relação aos pontos críticos de controlo, que correspondem aos valores limites de grandezas mensuráveis, como por exemplo temperatura, tempo ou grau de humidade, a partir dos quais o produto se pode tornar inseguro para a saúde (FAO/IAEA, 2001).

O método HACCP adopta uma abordagem holística, cobrindo todas as fases de produção, que vão do cultivo e colheita à armazenagem, transporte e processamento. Os primeiros passos, na concepção de um programa HACCP, são a identificação clara e a descrição detalhada do produto sobre o qual vão incidir os mecanismos de controlo, incluindo as especificações de consumo e os consumidores alvo, bem como a identificação da equipa

responsável pelo programa, a qual é tipicamente multidisciplinar, envolvendo as áreas da gestão, tecnologia, ciência e produção. No caso de programas HACCP focalizados na contaminação por micotoxinas ao longo de todo o processo de produção, uma equipa poderá envolver técnicos de agronomia, microbiologia e micotoxicologia, e ainda especialistas em exploração agrícola, distribuição, engenharia de processos, etc. A missão da equipa HACCP é a de desenhar o programa, implementá-lo e verificá-lo, e de produzir e manter a correspondente documentação relevante (FAO/IAEA, 2001).

1.3.1.1 Aplicação do HACCP ao controlo de micotoxinas – fase de pré-colheita

A aplicação do HACCP ao controlo de micotoxinas é relativamente recente, mas apresenta vantagens óbvias, não só porque as micotoxinas, uma vez formadas, não são fáceis de remover, mas também, porque a obtenção de amostras significativas para a análise de micotoxinas em produtos armazenados a granel levanta alguns problemas. Além disso, porque a análise precisa dos níveis de contaminação é um processo demorado e caro. Um dos aspectos atractivos do método é, efectivamente, o facto de um programa HACCP bem conduzido poder evitar a necessidade de controlos analíticos em grande escala.

Um programa HACCP deve primeiramente incidir na fase de cultivo, antes da colheita, até porque é essencialmente nesta fase, no campo, que se formam as micotoxinas. É, portanto, necessário identificar medidas para o controlo de fungos em geral, uma vez que, para além de produzirem micotoxinas, estes provocam doenças e danificam fisicamente as colheitas, levando a perdas de produtividade, o que é muitas vezes a razão primária para o seu controlo. É, ainda, conveniente, que o controlo do tipo HACCP se articule com outros sistemas de qualidade que se encontrem estabelecidos para a fase de cultivo, como seja o caso do Código de Boas Práticas Agrícolas, que traduz um conjunto de práticas tendentes a garantir uma produção primária segura através de técnicas agrícolas que mantenham as culturas saudáveis, como por exemplo o uso de variedades resistentes a fungos e pragas, a preparação e uso adequado do terreno, o controlo de danos por insectos ou outras pragas, a prevenção do stress hídrico e da infestação por ervas daninhas, a colheita em estado adequado de maturidade e com um grau de humidade reduzido, ou a armazenagem adequada imediatamente após a colheita.

A título de exemplo, pode citar-se o uso de estratégias integradas para minimizar a podridão provocada por *A. carbonarius* em cachos de uvas, de forma a reduzir as quantidades de OTA produzidas e, conseqüentemente, a minimizar a sua incidência no vinho, que,

segundo Rousseau e Blateyron (2002), podem levar à redução da ocorrência de OTA neste produto em cerca de 80%. Tal como é sugerido por Battilani e colaboradores (2004), que consideram a manutenção de um bom estado de conservação das uvas desde a sua formação até ao seu amadurecimento como essencial para controlar a presença dos *aspergilli* negros ocratoxigénicos nas vinhas. No entanto, outras medidas podem ser também levadas a cabo de forma a limitar a incidência de OTA no vinho, como, por exemplo, a remoção das uvas podres na fase da vindima, na medida em que a ocorrência de OTA é maior em uvas com sinais visíveis de podridão do que em uvas sãs (Kozakiewicz *et al.*, 2003).

Em princípio, a adesão a boas práticas agrícolas permitirá simplificar os pontos críticos de controlo na fase de pré-colheita. Contudo, os mecanismos de formação de micotoxinas nas culturas agrícolas não são ainda suficientemente conhecidos e foram encontradas evidências de que em alguns casos o uso inadequado de fungicidas pode aumentar a contaminação por micotoxinas (EC, 1999). Por estas razões, a aplicação do HACCP é mais problemática na fase de pré-colheita do que nas fases subsequentes.

1.3.1.2 Aplicação do HACCP ao controlo de micotoxinas – fase de pós-colheita

A fase pós-colheita refere-se normalmente à armazenagem, à secagem quando necessária e ao transporte dos produtos agrícolas. Tal como na fase de pré-colheita, a adopção de códigos de boas práticas pode permitir programas de HACCP mais simples também após as colheitas, reduzindo o número de pontos críticos de controlo necessários. É o caso, por exemplo, das Boas Práticas de Higiene no manuseamento dos produtos e, em especial, do Código de Boas Práticas de Armazenagem, aplicáveis à armazenagem a granel e também às condições de transporte, tais como as condições sanitárias e de robustez das estruturas do armazém, a prevenção de acesso de humidade, a temperatura e ventilação, e a prevenção de infestação por invertebrados, roedores e pássaros.

O parâmetro mais importante para o controlo da formação de micotoxinas nesta fase é o nível de humidade, que é um ponto crítico na prevenção da contaminação fúngica. Mais importante do que o conteúdo de água no produto é a actividade da água (a_w), relacionada com a fracção do conteúdo de água no material que se encontra em estado livre, por ser esta a que se encontra disponível para suportar o crescimento dos fungos. O limite crítico para o crescimento da maioria dos fungos é de $a_w=0,7$ e o seu crescimento aumenta consideravelmente a $a_w=0,8$, sendo por isso recomendado que a armazenagem se efectue a $a_w<0,65$. Como a actividade da água aumenta com a temperatura, o controlo da temperatura

nos locais de armazenamento é também importante. Outros factores, como o estado físico dos grãos, a composição do ar intergranular, as interacções microbiológicas e a presença de conservantes químicos ou biológicos são parâmetros a ter, também, em consideração (Binder, 2007).

A interacção entre fungos no ecossistema do armazém e o respectivo efeito na produção de micotoxinas é matéria ainda pouco estudada mas de alguma importância, porque as condições ambientais, principalmente o teor de humidade, parecem influenciar a dominância de algumas espécies. Por exemplo, Magan e co-autores (2003) concluíram que a produção de OTA por *P. verrucosum* era fortemente influenciada pela competição com outros fungos, tendo nomeadamente verificada uma redução significativa na produção de OTA em presença de *Fusarium culmorum* ou *F. poae*.

A presença de estragos causados por infestantes é outro elemento relevante para o controlo das micotoxinas, porque a actividade desses infestantes pode provocar aquecimento e humidade locais, gerando áreas mais húmidas e quentes ideais para a iniciação e desenvolvimento do crescimento de fungos e produção de micotoxinas. Estes efeitos localizados contribuem também para condições de heterogeneidade na armazenagem, dificultando a recolha de amostras significativas, como referido anteriormente. Um problema adicional com o aparecimento de fungos é que, uma vez iniciado o seu crescimento, a água acumulada metabolicamente pelos próprios pode perpetuar e amplificar o processo e permitir mesmo o aparecimento de outras espécies dependentes de a_w mais elevada.

A escolha de pontos críticos de controlo num programa HACCP deverá ter todas estas considerações em mente. A título de exemplo, num caso relatado de um sistema de produção de milho para rações de animais (FAO/IAEA, 2001) foram identificados seis pontos críticos, a saber: (i) o grau de secagem das espigas antes da colheita, com um limite crítico do conteúdo de humidade inferior a 22%; (ii) a segregação de espigas bolorentas antes do descaroçamento, com um limite crítico correspondente à rejeição das espigas com uma área afectada por bolor superior a 10%; (iii) a secagem das espigas para armazenagem nos dois dias imediatos à colheita (nível crítico de 16% de conteúdo de humidade) ou descaroçamento no prazo máximo de uma semana após a colheita; (iv) a secagem do grão após o descaroçamento, para garantir um grau de humidade inferior a 16%; (v) após o transporte para o distribuidor, este deve garantir um grau de humidade inferior a 14%, não devendo qualquer porção do milho armazenado apresentar mais de 15% de humidade; (vi) a análise da existência de micotoxinas em amostras representativas, com limite crítico correspondente ao valor regulamentado por

lei. Neste exemplo, as fases de cultivo e colheita, bem como as condições de descarçamento, são reguladas pelo Código de Boas Práticas Agrícolas, não se traduzindo em pontos críticos de controlo HACCP.

O exemplo apresentado denota uma situação que é típica em muitos produtos sujeitos a armazenagem, em relação aos quais os pontos de controlo mais importantes se centram na secagem e gestão da humidade, na identificação e segregação de material inaceitável e em condições apropriadas de armazenagem, sendo a análise de micotoxinas considerada importante apenas nos estágios finais do processo.

Um programa HACCP representa, por conseguinte, uma abordagem global e integrada de todo um processo de produção, nas suas diferentes fases, com o objectivo de identificar pontos e medidas de controlo, associados ao estabelecimento de limites críticos quantificáveis, numa óptica de prevenção da formação de micotoxinas.

1.3.2 Compostos antifúngicos

Os fungicidas desempenham um papel importante no controlo da presença de fungos nas culturas agrícolas. Estes têm de ser considerados seguros para o meio ambiente e seres humanos antes de autorizada a sua utilização no campo, sendo por isso objecto de muita investigação nesse sentido. No entanto, os benefícios que a aplicação de tais fungicidas produzem em relação à prevenção ou redução dos níveis de micotoxinas estão pouco estudados. Ademais, a procura de novos compostos antifúngicos é uma necessidade constante, uma vez que existem cada vez mais pressões da sociedade no sentido de se utilizarem agentes químicos que possam ser utilizados em menores quantidades e que ao mesmo tempo possuam maior actividade antifúngica, menores impactos ambientais e baixa toxicidade para o ser humano e a vida selvagem. Existe, para além disso, a necessidade de compostos com novos modos de acção e uma eficiência melhorada, de forma a combaterem fungos patogénicos resistentes ou com reduzida sensibilidade aos tratamentos actuais (Knight *et al.*, 1997).

Contudo, como se referiu atrás, o uso de fungicidas pode, em determinadas condições, estimular a produção de micotoxinas. Por exemplo, verificou-se que a utilização de azoxistrobina provocou um aumento da produção de desoxinivalenol por unidade de patogénico em ensaios artificialmente inoculados com *Fusarium* sp. e *Microdochium nivale* (Simpson *et al.*, 2001); que o miconazole e fenpropimorfe levaram o *A. parasiticus* a produzir quantidades mais elevadas de aflatoxina em ensaios *in vitro* (D'Mello *et al.*, 1998) e que o

fenehexamida, mancozebe e uma mistura de sais de cobre aumentaram a produção de OTA pelo *A. carbonarius* em uvas (Bellí *et al.*, 2006).

Ainda a respeito desta temática, o Comité Científico Europeu para as plantas, num relatório em que avalia os estudos disponíveis sobre o impacto da utilização de pesticidas na presença de micotoxinas, conclui que não existem evidências suficientes de que estes pesticidas desempenham um papel preponderante e consistente na prevenção ou inibição da produção de micotoxinas; e recomenda que no futuro os fungicidas sejam seleccionados tendo por base a sua eficácia para inibir efectivamente a produção de micotoxinas (EC, 1999).

A própria comunidade científica reconhece indirectamente esta necessidade dado o crescente número de publicações que descrevem o efeito de diversos compostos, sintéticos ou naturais, sobre a inibição do crescimento de fungos micotoxigénicos ou sobre a produção de micotoxinas. A título de exemplo, um alcalóide que inibe a produção de aflatoxinas por *Aspergillus* spp. e de desoxinivalenol por *Gibberella* spp. foi patenteado (Trail *et al.*, 2006); óleos essenciais da planta *Cymbopogon citratus* inibiram a produção de aflatoxinas e o crescimento de *A. flavus* (Paranagama *et al.*, 2003); óleos essenciais de especiarias inibiram o crescimento de *A. parasiticus* e *F. moniliforme* e preveniram a formação de aflatoxinas e de fumonisinas (Juglal *et al.*, 2002); diversos fungicidas foram testados para verificar os que melhor inibiam o crescimento de *A. carbonarius* e a produção de OTA (Bellí *et al.*, 2006) e óleos essenciais de especiarias inibiram o crescimento de *A. ochraceus* e a produção de OTA (Basilico & Basilico, 1999).

A utilização de fungicidas como método preventivo da formação de micotoxinas exige, por conseguinte, alguns cuidados, podendo constituir, numa abordagem HACCP, um pré-requisito de controlo em relação à produção de micotoxinas.

Como o objectivo principal desta introdução não é o de abordar toda a diversidade de compostos fungicidas disponíveis no mercado e os seus modos de actuação, para uma breve revisão podem ser consultados os artigos de Knight *et al.*, 1997 e Gullino *et al.*, 2000, iremos pois, apenas fazer uma exposição sobre as propriedades antifúngicas dos derivados de cromo e do Na₂EDTA por terem sido objecto de estudo durante o trabalho desenvolvido para elaborar esta dissertação.

1.3.2.1 Derivados de cromo

Os cromenos são uma importante classe de compostos, sintetizados por plantas e presentes em vegetais e frutos comestíveis (Curini *et al.*, 2006). Muitos são conhecidos pelas suas

propriedades biológicas, tendo sido desenvolvidos análogos sintéticos com aplicações importantes na área da farmacologia (Yu *et al.*, 2003; Borges *et al.*, 2005; Chimenti *et al.*, 2006; Kulkarni *et al.*, 2006) e como agentes antimicrobianos (El Agrody *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2004). Alguns têm, também, propriedades antifúngicas, como é o exemplo do 6-acetil-7,8-dimetoxi-2,2-dimetilcromeno isolado a partir das raízes da planta *Eupatorium riparium* (Bandara *et al.*, 1992), do 5-hidroxi-6-acetil-2-hidroximetil-2-metil cromeno isolado a partir de raízes de *Blepharispermum subsessile* (Agarwal *et al.*, 2000) ou de diversos cromenos isolados a partir de folhas de *Peperomia serpens* (Saga Kitamura *et al.*, 2006).

O método clássico para a síntese de 2-iminocromenos utiliza a condensação de Knoevenagel de aldeídos salicílicos com compostos de metileno activos sobe condições de reacção apropriadas (Sakurai *et al.*, 1972; O'Callaghan *et al.*, 1995; Fringuelli *et al.*, 2003; Volmajer *et al.*, 2005).

1.3.2.2 Na₂EDTA

O ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) é um agente com forte capacidade para complexar iões metálicos (agente quelante), formando diversos complexos metálicos ou salinos que são amplamente usados em detergentes e produtos de limpeza, na agricultura e no processamento de alimentos (Oviedo & Rodriguez, 2003). Na indústria alimentar, o EDTA é usado para remover sabores metálicos pela complexação de iões metálicos libertados durante o processamento ou armazenagem, como por exemplo em feijão enlatado. Concentrações de Na₂EDTA de 36 a 500 ppm, que correspondem a 0,1 e 1,5 mM em solução, são permitidas nos EUA em alguns produtos alimentares (Heimbach *et al.*, 2000). Na agricultura, o EDTA é usado em produtos agro-químicos para estabilizar formulações e para fornecer micronutrientes como zinco, manganésio, ferro, cobre, magnésio, cálcio e potássio. É também reconhecido como agente antibacteriano, que afecta a integridade das membranas celulares, e que potencia o efeito de outros agentes letais (Oita, 2003). As suas propriedades antifúngicas foram essencialmente testadas em leveduras (Siqueira & Sen, 2004; Kubo *et al.*, 2005), tendo também sido relatados efeitos sinérgicos com outros agentes antifúngicos na redução de aspergillose pulmonar (Hachem *et al.*, 2006), bem como o seu efeito no controlo do mildio em folhas de tomateiro (Ehret *et al.*, 2002). O impacto que a utilização de Na₂EDTA tem, no campo da agricultura, relativamente à inibição do crescimento de fungos ou à inibição da presença de micotoxinas não é conhecido.

1.3.3 Engenharia genética de plantas

O desenvolvimento de plantas transgênicas representa uma abordagem nova e com bastante interesse económico para reduzir a contaminação dos cereais por micotoxinas. Diversas abordagens têm sido desenvolvidas, como a inserção de genes que codificam para proteínas com propriedades insecticidas (milho Bt) que reduzem os danos provocados por insectos e por consequência os níveis de micotoxinas, uma vez que os grãos danificados são mais susceptíveis às infecções fúngicas (Bakan *et al.*, 2002). Outras, que procuraram inserir genes que conferem resistência a infecções fúngicas, em particular as provocadas por espécies do género *Fusarium*. No entanto, estas têm tido pouco sucesso não estando no mercado disponível nenhuma cultura com estas características. Outras, ainda, que procuram inserir genes que codificam para compostos que inibem a produção de certas micotoxinas ou para enzimas que são capazes de as degradar e destoxificar (Duvick, 2001).

Utilizando esta estratégia e a título de exemplo, foi produzido milho geneticamente modificado capaz de degradar a fumonisina B₁, por inserção de genes de *Exophiala spinifera* que codificam para duas enzimas com actividade de desesterificação e de desaminação oxidativa, envolvidas na degradação desta micotoxina pela levedura em causa (Duvick *et al.*, 2003). Foram, também, produzidas plantas transgênicas de arroz e de trigo com capacidade para destoxificar a zearalenona por inserção dos genes que codificam para uma lactonohidrolase produzida pelo fungo *Clonostachys rosea* (Higa *et al.*, 2003; Higa-Nishiyama *et al.*, 2005).

1.4 Estratégias de remediação para o controlo de micotoxinas em alimentos

Apesar da implementação das melhores estratégias de prevenção, a eliminação total da presença de micotoxinas parece impossível, sobretudo, em anos agrícolas com condições climatéricas adversas e favoráveis ao desenvolvimento de doenças e pragas. Como tal, a presença de micotoxinas em produtos agrícolas e em alimentos é uma constante, existindo, também, uma necessidade concreta e real de minimizar o seu impacto através da implementação de estratégias de remediação. Os processos mais evidentes e praticados até à data têm sido o redireccionamento dos lotes mais contaminados para a alimentação animal, sobretudo para os menos susceptíveis às micotoxinas em causa, e a mistura dos lotes contaminados com outros não contaminados de forma a reduzir os níveis de micotoxinas para valores aceitáveis (Binder, 2007). No entanto, nem sempre é possível proceder dessa forma, sobretudo, quando essas práticas são proibidas por lei, como acontece na União Europeia. É, por isso, frequente a aplicação de diversos métodos de remediação que são capazes de atenuar o impacto das micotoxinas de forma comprovada, muito embora nenhum desses métodos seja capaz de actuar na redução de todas as micotoxinas que possam ocorrer em simultâneo num determinado produto.

Estas estratégias são de vários tipos, sendo normalmente divididas em métodos físicos, químicos e biológicos tendo em conta o tipo de processo que utilizam para minimizar a presença ou os efeitos tóxicos das micotoxinas. Para serem efectivos estes devem ainda obedecer a alguns requisitos básicos como, (i) serem capazes de remover, destruir ou destoxificar as micotoxinas em causa, (ii) não darem origem a outros compostos tóxicos, (iii) não alterarem significativamente as características nutritivas dos alimentos e (iv) a sua implementação ser técnica e economicamente viável (Galvano *et al.*, 2001). Alguns destes métodos, em especial os químicos, nem sempre garantem a segurança toxicológica do produto final, uma vez que na sua grande maioria não são estudados os produtos de reacção formados.

De seguida, descrevem-se alguns desses processos e algumas aplicações concretas referentes aos mesmos.

1.4.1 Métodos físicos

1.4.1.1 Segregação e fraccionamento por densidade

Não estando as micotoxinas uniformemente distribuídas nos produtos alimentares, uma vez que certos grãos, partículas ou fracções dos mesmos podem concentrar maiores quantidades, a segregação ou separação de porções de produto danificadas, descoradas, ou com sinais visíveis de podridão leva à uma redução significativa dos níveis de micotoxinas nos lotes tratados desta forma. Estes processos podem ser mais ou menos automatizados existindo mesmo alguns que recorrem à fluorescência das micotoxinas para efectuar a separação mecanizada das porções mais contaminadas. Outros, e uma vez que os grãos de cereais danificados por bolor e contaminados com micotoxinas apresentam propriedades físicas diferentes dos grãos não danificados, recorrem à sua separação por segregação de densidade em meios líquidos adequados ou ao seu fraccionamento de acordo com tabelas de gravidade específicas. A segregação por densidade e consequente remoção dos grãos que flutuam numa solução saturada de cloreto de sódio pode reduzir os níveis de várias micotoxinas nos cereais. O uso de tabelas específicas de gravidade permite a remoção das fracções menos densas correspondentes aos grãos danificados. A sua aplicação em trigo contendo 4-7 mg/Kg de desoxinivalenol permite reduções entre os 68 a 85% (Kabak *et al.*, 2006).

1.4.1.2 Lavagem

A lavagem de cereais contaminados pode permitir a redução dos níveis de toxinas, tendo sido relatadas reduções de 65-69% nos níveis de desoxinivalenol em cevada e milho lavados três vezes com água destilada (Trenholm *et al.*, 1992). Este método, porém, só tem interesse no caso do cereal ser posteriormente submetido à moagem húmida ou à fermentação alcoólica, uma vez que a secagem do cereal após a lavagem tem custos proibitivos.

1.4.1.3 Descasque

Este processo de descontaminação tira partido do facto de a porção externa dos grãos afectados apresentar uma maior concentração de micotoxinas. A eficácia do método, que consiste no descasque do grão e remoção do farelo produzido, depende do grau de penetração dos fungos no grão. Estudos efectuados mostraram que o descasque de cevada, trigo e arroz contaminados com 5-23 mg/Kg de desoxinivalenol e 0,5-1,2 mg/Kg de zearalenona permitiu reduções de 40-100% na contaminação, com uma perda de 13-19% de material (Trenholm *et*

al., 1991). Os farelos obtidos constituem, contudo, um produto bastante usado na alimentação directa de animais ou na elaboração de rações para estes, o que obriga ao uso de métodos adicionais para a sua descontaminação.

1.4.1.4 Crivagem ou triagem

Os grãos partidos e os resíduos de cereais contêm normalmente níveis de micotoxinas bastante superiores aos dos grãos intactos. A separação e remoção dos resíduos por crivagem permite, por conseguinte, a redução dos níveis de contaminação. Tal como acontece com os farelos, os resíduos de crivagem constituem, porém, uma proporção significativa dos produtos de cereais usados em rações para animais, o que obriga ao uso de métodos adicionais para a sua descontaminação.

1.4.1.5 Processamento térmico

As micotoxinas podem ser destruídas pelas temperaturas alcançadas durante alguns processamentos de alimentos, como sejam a cozedura em forno, a torrefacção, a extrusão, o cozinhar e a fritura. Contudo, algumas micotoxinas são quimicamente estáveis, não sendo completamente destruídas pelas temperaturas de processamento. O grau de descontaminação depende das temperaturas alcançadas e do tempo de exposição a essas temperaturas. Por exemplo, o tempo necessário para reduzir o conteúdo de ocratoxina A em 50% no trigo varia de 6 a 700 minutos para temperaturas variando entre 250 e 100 °C (Boudra *et al.*, 1995).

1.4.1.6 Moagem húmida

No processo de moagem dos cereais as micotoxinas presentes ficam distribuídas pelas diferentes fracções do produto moído. No caso da moagem húmida do milho, o amido produzido fica praticamente isento de fumonisinas e aflatoxinas, porque estas toxinas são altamente solúveis em água e permanecem, por isso, na fracção líquida da moagem.

1.4.1.7 Moagem seca

A distribuição de desoxinivalenol nas diversas fracções da moagem seca do trigo depende do grau de penetração do fungo no endosperma. Assim, no caso de contaminação superficial, a maioria das micotoxinas fica no farelo e a farinha apresenta níveis baixos de micotoxinas (Scudamore *et al.*, 2003). O efeito é semelhante ao atrás descrito para o descasque. Estudos efectuados mostram uma redução de 66% de ocratoxina A na produção de farinha branca a

partir da moagem de trigo duro contaminado com 618 µg/Kg após inoculação com *P. verrucosum*. No caso de trigo mole, a redução, em circunstâncias idênticas, foi de 40%, demonstrando uma maior penetração do fungo nos grãos de trigo (Osborne *et al.*, 1996).

1.4.1.8 Adsorção

A adição de adsorventes às rações alimentares é o método mais usado para proteger os animais contra as micotoxinas. Os adsorventes destinam-se a fixar e imobilizar as micotoxinas no trato gastrointestinal, diminuindo conseqüentemente a biodisponibilidade das toxinas e a sua absorção através dessa via.

A descontaminação ou destoxificação das rações alimentares adquire uma grande relevância económica, uma vez que a contaminação das rações por micotoxinas afecta a saúde dos animais e diminui a produtividade pecuária, devido à recusa e à má assimilação dos alimentos por parte dos animais, com a conseqüente redução de peso. Adicionalmente, podem surgir problemas de imunodepressão, o que torna os animais mais sensíveis a diferentes agentes patogénicos, distúrbios na capacidade reprodutiva e resíduos de micotoxinas em produtos alimentares de origem animal.

O processo de destoxificação por adsorção consiste em adicionar à ração adsorventes nutricionalmente inertes, por forma a reduzir a absorção das micotoxinas pelo trato gastrointestinal e, por conseguinte, atenuar os efeitos tóxicos para os animais e a transposição de micotoxinas para os produtos de origem animal. A eficiência da adsorção depende das estruturas químicas do adsorvente e da micotoxina, sendo também importante que o adsorvente não remova nutrientes essenciais da dieta. Os aluminossilicatos são os adsorventes preferidos para o efeito. De entre estes, os aluminossilicatos hidratados de sódio e cálcio (HSCAS) têm sido os mais estudados, dado a sua promissora capacidade para adsorver a aflatoxina. No entanto, outros materiais como o carvão activado, bentonites, colestiramina, zeólitos, argilas e paredes celulares de microrganismos têm sido objecto de estudo, com o intuito de verificar a sua capacidade para adsorver determinadas micotoxinas (Galvano *et al.*, 2001).

Apesar da divulgada eficácia de inúmeros adsorventes disponíveis no mercado, alguns investigadores têm verificado que a maioria dos produtos comercializados não é capaz de adsorver *in vitro* certas micotoxinas, como as produzidas pelos *Fusarium*, e que apenas um número reduzido destes produtos é capaz de adsorver mais do que uma micotoxina em simultâneo (Avantaggiato *et al.*, 2004; Huwig *et al.*, 2001). Ademais, segundo Schatzmayr e

colaboradores (2003), a aplicação prática da estratégia de destoxificação por adsorventes em rações alimentares, que tem sido usada com sucesso para as aflatoxinas com a utilização de HSCAS, não tem tido sucesso com a ocratoxina A devido às propriedades físico-químicas desta micotoxina, considerando ainda estes ser necessário recorrer a estratégias alternativas para a sua destoxificação, nomeadamente biológicas. O insucesso da utilização de adsorventes para reduzir a absorção gastrointestinal da ocratoxina A está patente no estudo de Plank e co-autores (1990), que demonstra a ineficácia de HSCAS e de várias bentonites para reduzir a presença desta micotoxina no sangue de suínos.

Pelo contrário, no vinho, a utilização de adsorventes para reduzir os níveis de ocratoxina A tem sido melhor sucedida. Existem, entre outras, referências à eficácia do caseinato de potássio e do carvão activado (Castellari *et al.*, 2001), embora este último possa afectar algumas propriedades organolépticas do produto (Rousseau & Blateyron, 2002). Mais recentemente, tem-se verificado que algumas leveduras (Bejaoui *et al.*, 2004; Caridi *et al.*, 2006b), paredes celulares de leveduras (Ringot *et al.*, 2005) e componentes das paredes celulares de leveduras (Ringot *et al.*, 2007; Yiannikouris *et al.*, 2006) são capazes de adsorver a ocratoxina A, demonstrando-se, também, que o uso de leveduras expressamente seleccionadas permite a redução substancialmente dos níveis de OTA durante a vinificação (Moruno *et al.*, 2005; Cecchini *et al.*, 2006; Caridi *et al.*, 2006c).

1.4.2 Métodos químicos

Diversos compostos químicos como ácidos, bases, aldeídos, bissulfitos, agentes oxidantes e gases têm sido testados de forma a verificar a sua capacidade para degradar ou destoxificar várias micotoxinas. No entanto, muitos dos processos propostos, apesar de destruírem efectivamente várias micotoxinas, são pouco atractivos do ponto de vista prático devido ao facto de se conhecer mal as propriedades toxicológicas dos produtos de reacção formados, de permanecerem resíduos dos químicos utilizados no produto descontaminado e de afectarem significativamente a qualidade nutritiva dos mesmos.

1.4.2.1 Amoniação

O processo de amoniação, com recurso a hidróxido de amónio ou a amónia em estado gasoso, pode reduzir até 99% os níveis de aflatoxina presentes em cereais, produtos de amendoim, semente de algodão e produtos de semente de algodão. Em alguns Estados dos

EUA o processo de amoniação é permitido para produtos de semente de algodão (Arizona, Texas e Califórnia) e para cereais contaminados (Texas, Carolina do Norte, Georgia e Alabama). No México, a amoniação é possível para cereais e, em França, África do Sul, Senegal e Brasil, em amendoim usado para rações de animais. Na Europa, as rações amoniadas não podem ser usadas para o gado leiteiro e para ovinos, porque os níveis de aflatoxina B₁ residual nos produtos amoniados pode exceder o limite máximo permitido por lei (Kabak *et al.*, 2006).

No que diz respeito à OTA, foi verificado que a amoniação permite reduzir a sua presença em milho, trigo e cevada para níveis não detectáveis (Chelkowski *et al.*, 1982).

1.4.2.2 Tratamento com bissulfito de sódio

O tratamento de milho e trigo com uma solução de bissulfito de sódio reduz os níveis de desoxinivalenol, formando um conjugado desoxinivalenol-sulfonado, produto este que parece não ter efeitos tóxicos em porcos, o que torna este tratamento útil na descontaminação de cereais afectados por esta micotoxina para efeitos de produção de rações para suínos. Segundo Young e co-autores (1987) conseguiu-se uma redução de 95% nos níveis de desoxinivalenol em milho contaminado, autoclavando-o durante uma hora a 121 °C na presença de uma solução aquosa com 8,3% de bissulfito de sódio.

Para a alimentação humana este tratamento não é adequado, porque afecta as propriedades reológicas da farinha e porque o desoxinivalenol se volta a formar em certas condições de processamento e panificação.

1.4.2.3 Ozonação

A utilização de ozono para destruir diversas micotoxinas por oxidação tem sido estudada. McKenzie e co-autores (1997) verificaram que a ocratoxina A, as aflatoxina B₁ e G₁, a patulina, o ácido ciclopiazónico e a zearalenona são rapidamente destruídas por ozonação sem que sejam detectados sub-produtos de reacção por HPLC e comprovaram que este processo diminui significativamente a toxicidade destas micotoxinas. Contudo, verificaram também que a degradação rápida da fumonisina B₁ não correlaciona com a destoxificação, visto terem sido detectados sub-produtos nas soluções desta micotoxina tratadas com ozono que mantiveram toxicidade nos bioensaios realizados.

Este processo tem a vantagem de não deixar resíduos químicos no produto alimentar tratado uma vez que o ozono se dissocia rapidamente em oxigénio quando em solução aquosa.

1.4.3 Métodos biológicos

A utilização de métodos biológicos é considerada por muitos autores a melhor forma para eliminar a presença de micotoxinas em produtos alimentares, pois estes são extremamente específicos uma vez que resultam sobretudo da acção de enzimas. Sendo assim, a qualidade nutritiva e toxicológica do produto alimentar processado está garantida desde que os produtos de reacção formados sejam não tóxicos (Karlovsky, 1999).

Existem descritos na literatura inúmeros microrganismos com capacidade para degradarem várias micotoxinas, tendo sido diversas implementações também estudadas. De seguida, procura-se apresentar uma breve revisão sobre trabalhos efectuados nesta área, sobretudo, com ocratoxina A. Esta micotoxina é passível de ser destoxificada através da simples hidrólise da ligação amida que existe entre a L-β-fenilalanina e a ocratoxina α (Figura 1.4.1), uma vez que esta última é praticamente não tóxica, como foi descrito atrás. Muitos microrganismos e algumas enzimas são capazes de degradar a OTA por esta via.

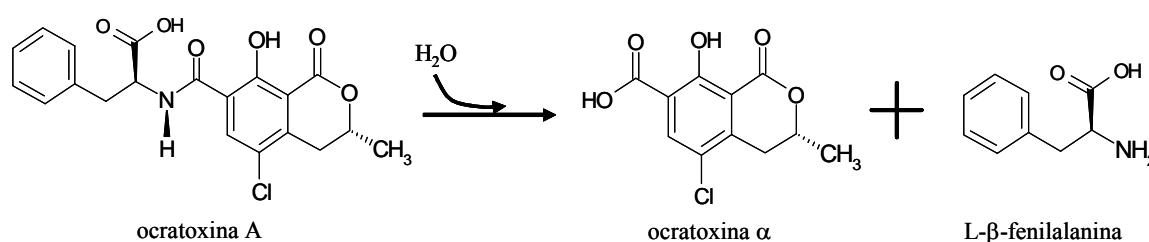


Figura 1.4.1 Hidrólise da ocratoxina A em ocratoxina α e L-β-fenilalanina.

1.4.3.1 Degradação por microrganismos

Existem diversas bactérias, fungos filamentosos e leveduras com capacidade para degradar a ocratoxina A. Nomeadamente, estirpes de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e outras bactérias de iogurte demonstraram ser capazes de eliminar a OTA na totalidade, em amostras de leite contaminadas com 50 e 100 µg/L, e uma estirpe de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* em leite contaminado com 500 µg/L (Skrinjar *et al.*, 1996). Uma estirpe de *Acinetobacter calcoaceticus* removeu 0,1005 e 0,0636 µg/h/mL desta micotoxina quando crescida, respectivamente, a 25 e 30 °C num meio de cultura com

10 µg/mL de OTA (Hwang & Draughon, 1994). Também algumas estirpes de *A. fumigatus*, *A. japonicus* e *A. niger* demonstraram ser capazes de degradar a OTA total ou parcialmente, tendo sido, neste caso, detectada OTα como produto de reacção (Varga *et al.*, 2000). Leveduras foram também descritas como capazes de degradar a OTA, nomeadamente estirpes de *Trichosporon* sp., *Rhodotorula* sp. e *Cryptococcus* sp. (Schatzmayr *et al.*, 2003), de *Saccharomyces cerevisiae* (Piotrowska & Zakowska, 2000) e de *Phaffia rhodozyma* (Peteri *et al.*, 2007). Esta última degradou 90% da OTA presente num meio de cultura suplementado com 7,5 µg/mL desta micotoxina após 15 dias a 20 °C. Neste estudo, os autores conseguiram associar a degradação da OTA à presença, na parede celular da levedura, de uma metaloprotease similar à carboxipeptidase A, uma vez que agentes quelantes como o EDTA e 1,10-fenantrolina inibiram a degradação da micotoxina.

Uma das estirpes de *Trichosporon* sp. estudadas por Schatzmayr e co-autores (2003) veio mais tarde a ser considerada uma nova espécie, tendo sido classificada de *Trichosporon mycotoxinivorans* pela sua excelente capacidade para destoxificar as micotoxinas ocratoxina A e zearalenona (Molnar *et al.*, 2004). Estudos subsequentes sobre o impacto da utilização desta levedura na alimentação de frangos de aviário revelaram que esta bloqueia por completo os efeitos imunossupressores da OTA (Politis *et al.*, 2005). Adicionalmente, suínos alimentados com rações contaminadas com 0,5 µg/Kg de OTA e suplementadas com esta levedura apresentaram maior peso corporal do que suínos alimentados da mesma forma mas sem a levedura (Hofstetter *et al.*, 2006). Outros microrganismos com capacidade para degradar a OTA encontram-se listados na Tabela 1.4.1.

No que diz respeito a outras micotoxinas existem, entre outras, referências à capacidade de (i) uma bactéria (*Eubacterium* BBSH 797) para destoxificar tricotecenos através da eliminação enzimática do anel 12,13-epóxido presente na estrutura destes compostos e que é responsável pelos seus efeitos tóxicos (Fuchs *et al.*, 2002); (ii) uma levedura negra (*Exophiala spinifera*) isolada a partir de milho para metabolizar a fumonisina B₁ através da acção de uma esterase extracelular (Blackwell *et al.*, 1999), microrganismo este que tem sido usado como fonte de genes para a produção de plantas de cereais transgénicas capazes de degradar esta micotoxina; (iii) uma bactéria isolada do solo e pertencente ao género *Rhizobium* para converter desoxinivalenol num derivado menos tóxico (Shima *et al.*, 1997) e (iv) uma estirpe de *Mycobacterium fluoranthenivorans* para degradar a aflatoxina B₁ (Hormisch *et al.*, 2004).

Para além de microrganismos, culturas de células de trigo, milho, tomate, soja, batata-doce e outras plantas são também capazes de transformar completamente a OTA em outros produtos (Ruhland *et al.*, 1996).

Tabela 1.4.1 Alguns microrganismos capazes de degradar a ocratoxina A

Microrganismos	Degradação (referência)
Bactérias	
<i>Phenylobacterium immobile</i>	Degradou a OTA presente num meio de cultura com 100 µg/L após 3-5 horas a 25 °C. Quatro produtos de degradação foram identificados, entre os quais a OTα. (Wegst & Lingens, 1983)
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Degradaram a totalidade da OTA presente em meios de cultura com 50, 100 ou 500 µg/L. (Skrinjar <i>et al.</i> , 1996)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Degradou 0,1005 e 0,0636 µg OTA/h/mL num meio de cultura com 10 µg/mL a 25 e 30 °C. (Hwang <i>et al.</i> , 1994)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. sanfranciscensis</i>	Dependendo da espécie – reduções de 50, 70 e 85% da OTA presente num meio de cultura com 1 µg/L após 5 dias a 37 °C foram obtidas. (Piotrowska & Zakowska, 2005)
Fungos filamentosos	
<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. japonicus</i> , <i>A. niger</i>	Degradaram total ou parcialmente a OTA presente em meios de cultura com 2 µg/mL após 10 dias a 30 °C. (Varga <i>et al.</i> , 2000)
<i>Rhizopus homothallicus</i> , <i>R. oryzae</i> , <i>R. stolonifer</i> , <i>Rhizopus</i> sp.	Degradaram mais de 95% da OTA presente num meio de cultura com 7,5 µg/mL após 16 dias a 25 °C. (Varga <i>et al.</i> , 2005)
<i>Aspergillus carbonarius</i> , <i>A. japonicus</i> , <i>A. niger</i>	77 e 45% das estirpes testadas degradaram mais de 80% da OTA em 2 meios de cultura com 2 µg/mL. (Bejaoui <i>et al.</i> , 2006)
Leveduras	
<i>Trichosporon</i> sp., <i>Rhodotorula</i> sp., <i>Cryptococcus</i> sp.	Degradou 80 a 100% da OTA presente num meio de cultura com 0,2 µg/L após 2,5 a 5 horas de incubação a 35 °C. (Schatzmayr <i>et al.</i> , 2003)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Degradou 41% da OTA presente num meio de cultura com 300 µg/L após 24 horas a 30 °C. (Piotrowska & Zakowska, 2000)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Degradou 90% da OTA presente num meio de cultura com 7,5 µg/mL após 15 dias a 20 °C. (Peteri <i>et al.</i> , 2007)

1.4.3.2 Degradação enzimática

Os microrganismos citados atrás são capazes de degradar ou de transformar as micotoxinas referidas graças à produção de diversos enzimas que actuam sobre esses compostos. No entanto, existe, na maioria das situações, pouca informação acerca dos enzimas envolvidos, sendo muito poucos os que foram isolados e caracterizados.

Entre outros, foi isolado e purificado um enzima a partir de *Armillariella tabescens* que é capaz de destoxificar a aflatoxina B₁ a pH 6,8 e 35 °C (Liu *et al.*, 2001), um enzima a partir de *Pleurotus ostreatus* capaz de degradar a aflatoxina B₁ a pH 4,0-5,0 e 25 °C (Motomura *et al.*, 2003), uma lactono-hidrolase a partir de *Clonostachys rosea* responsável pela destoxificação de zearalenona cuja sequência genética que a codifica foi identificada (Takahashi-Ando *et al.*, 2002) e as sequências genéticas que codificam para enzimas com capacidade para degradar a fumonisina B₁ e a sua utilização foram patenteadas (Duvick *et al.*, 1998).

No caso da ocratoxina A, é bem conhecido que esta micotoxina pode ser hidrolisada pela carboxipeptidase A do pâncreas bovino (Pitout, 1969) e existem, ainda, relatos de que uma lipase comercial obtida a partir de *Aspergillus niger* é também capaz de a hidrolisar (Stander *et al.*, 2000).

1.5 Objectivos e estrutura da dissertação

Tendo em conta este enquadramento teórico pretendeu-se, no âmbito desta dissertação, desenvolver estratégias de prevenção e de remediação que pudessem contribuir para diminuir a presença de ocratoxina A em alimentos. No sentido de responder a este objectivo geral desenvolveram-se os trabalhos de investigação apresentados nos capítulos que se seguem, tendo-se procurado de forma concreta:

- Seleccionar fungos filamentosos e leveduras capazes de degradar a OTA (Capítulo II).
- Isolar, purificar e caracterizar, a partir de uma estirpe de *Aspergillus niger*, o enzima envolvido na degradação da OTA; avaliar *in vitro* a degradação da OTA por alguns enzimas e preparados enzimáticos comerciais; verificar se alguns dos enzimas testados degradam a OTA em mostos de forma a serem usados no processo de vinificação (Capítulo III).
- Verificar o potencial antifúngico de diversos compostos sintéticos novos e do Na₂EDTA; verificar o efeito destes sobre a produção de OTA utilizando estirpes ocratoxigénicas (Capítulo IV).

Capítulo II

Biodegradação da ocratoxina A por fungos

2.1 Introdução

Diversas publicações têm descrito a capacidade de alguns microrganismos para degradar a ocratoxina A. A título de exemplo, foram referidas as bactérias *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus brevis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. sanfrancisco*, e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*; os fungos filamentosos *A. carbonarius*, *A. fumigatus*, *A. japonicus*, *A. niger*, *Rhizopus homothallicus*, *R. microsporus*, *R. oryzae* e *R. stolonifer* e as leveduras *Cryptococcus* sp., *Phaffia rhodozyma*, *Rhodotorula* sp., *Saccharomyces cerevisiae* e *Trichosporon mycotoxinivorans*.

Alguns destes microrganismos são utilizados em processos fermentativos na produção de certos produtos alimentares, o que pode tornar a sua capacidade para degradar a OTA num valioso contributo para reduzir a presença desta micotoxina nesses produtos. Outros são utilizados como aditivos na alimentação animal contribuindo para reduzir os efeitos tóxicos da OTA.

A descontaminação biológica é considerada a melhor alternativa para reduzir ou eliminar a presença de micotoxinas em produtos alimentares uma vez que esta ocorre na maior parte das vezes por acção de enzimas produzidos pelos microrganismos, o que torna estes processos altamente específicos, evitando assim alterações na qualidade dos alimentos.

Com o trabalho descrito neste capítulo procurou-se encontrar alguns microrganismos que fossem capazes de degradar a OTA e que pudessem vir a ser utilizados, directa ou indirectamente, em processos de descontaminação alimentar. Para tal:

- testaram-se 76 estirpes de fungos filamentosos pertencentes a várias espécies;
- testaram-se 9 estirpes de leveduras fermentativas.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Biodegradação da ocratoxina A por fungos filamentosos

2.2.1.1 Material biológico

Utilizaram-se 37 estirpes de aspergilli negros, 25 estirpes pertencentes a outras espécies do género *Aspergillus* e 14 estirpes pertencentes a outros géneros (Tabela 2.2.1). Todas as estirpes foram isoladas a partir de uvas, identificadas e caracterizadas por Serra *et al.* (2003).

Tabela 2.2.1 Códigos de isolamento e códigos MUM dos fungos filamentosos testados

Espécie	Código de isolamento (Código MUM)
aspergilli negros	
<i>A. carbonarius</i> (produtores de OTA)	01UAs129, 01UAs178, 01UAs198, 01UAs236, 01UAs263 (MUM 03.59)
<i>A. ellipticus</i>	01UAs82, 01UAs139
<i>A. foetidus</i>	01UAs162
<i>A. ibericus</i>	01UAs294 (MUM 03.49)
<i>A. japonicus</i>	01UAs128
Agregado <i>A. niger</i>	00UAs1, 00UAs2, 00UAs3, 00UAs5, 00MAs19, 00MAs20, 00MAs21, 00MAs22, 00MAs23, 00MAs24, 01UAs22, 01UAs42, 01UAs83, 01UAs101 (MUM 03.58), 01UAs107, 01UAs119, 01UAs125, 01UAs126, 01UAs160, 01UAs181, 01UAs185, 01UAs192
Agregado <i>A. niger</i> (produtores de OTA)	01UAs193, 01UAs204, 01UAs273, 01UAs318, 01UAs358
Outros aspergilli	
<i>A. alliaceus</i> (produtor de OTA)	01UAs62
<i>A. clavatus</i>	01UAs11
<i>A. flavus</i>	01UAs1, 01UAs383, 01UAs388
<i>A. fumigatus</i>	01UAs18, 01UAs23, 01UAs117, 01UAs118, 01UAs384
<i>A. ochraceus</i>	01UAs8
<i>A. ochraceus</i> (produtor de OTA)	01UAs65
<i>A. terreus</i>	01UAs7, 01UAs10, 01UAs301
<i>A. ustus</i>	01UAs5, 01UAs45, 01UAs385
<i>A. versicolor</i>	01UAs9, 01UAs69, 01UAs382
<i>A. wentii</i>	01UAs63 01UAs64, 01UAs68, 01UAs121
Outros	
<i>Alternaria</i> sp.	00UA15
<i>Aureobasidium pullulans</i>	00UAu1
<i>Botrytis cinerea</i>	00UB1
<i>Cladosporium</i> sp.	00UC12
<i>Emericella nidulans</i>	01UAs17
<i>Mucor</i> sp.	00UZ2
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	01UP30, 01UP34, 01UP43, 01UP44
<i>Penicillium spinulosum</i>	01UP74
<i>Rhizopus</i> sp.	00MZ3
<i>Trichoderma</i> sp.	00UT4
<i>Trichothecium roseum</i>	00UTm1

2.2.1.2 Preparação do inóculo, dos meios de cultura e sua inoculação

As estirpes utilizadas foram crescidas em placas de petri com o meio de cultura *Malt extract agar* (MEA) durante 7 dias a 25 °C no escuro tendo-se preparado, a partir destas, suspensões de esporos em agar semi sólido (0,2% de agar e 0,05% de Tween 80). Elaboraram-se os meios de cultura: *Yeast extract sucrose* suplementado com 1 µg/mL de OTA (YES+OTA) e *Yeast extract sucrose* (YES), autoclavaram-se a 121 °C durante 15 min e colocaram-se porções de 5 mL em tubos de vidro universais esterilizados. Para cada estirpe inoculou-se um tubo com YES+OTA e um tubo com YES (controlo) adicionando 100 µL de suspensão de esporos. Os frascos foram incubados inclinados, de forma a aumentar a superfície de crescimento, a 25 °C no escuro durante 6 dias.

MEA (formulação de Blakeslee)	Extracto de Malte	20 g/L
	Glucose	20 g/L
	Peptona	1 g/L
	Agar (Oxoid Nº 3)	20 g/L
YES	Extracto de levedura (Difco)	20 g/L
	Sacarose	150 g/L

2.2.1.3 Extração da ocratoxina A

Após os 6 dias de incubação e para cada um dos tubos de vidro, a OTA foi extraída utilizando o procedimento que se segue. Descartou-se o micélio formado, adicionou-se 1 mL de HCl (2 N) e 5 mL de clorofórmio ao meio de cultura líquido restante. Agitaram-se os tubos fortemente durante 1 min utilizando o vortex e quebrou-se a emulsão formada com a ajuda de um magneto para permitir uma boa separação das fases. Recolheu-se o clorofórmio com a ajuda de uma pipeta Pasteur e evaporou-se a 50 °C com a ajuda de uma ligeira corrente de azoto num frasco de vidro limpo. Este processo foi repetido e, finalmente, cada resíduo seco foi ressuscitado em 1,0 mL de fase móvel e filtrado por um filtro de seringa de 0,45 µm (acrodisc GHP, Gelman). Da mesma forma, extraiu-se um frasco com 5 mL de YES para confirmar a ausência de OTA neste meio e três frascos com 5 mL de YES+OTA para calcular as taxas de recuperação do processo de extração ($OTA_{(recuperada)}$). A concentração média de OTA detectada nestes últimos foi utilizada como referência para o cálculo das taxas de degradação da OTA utilizando a equação 2.1.

$$\text{Taxa degr.} = 100 - \left(\frac{OTA \times 100}{OTA_{(recuperada)}} \right) \quad (\text{eq. 2.1})$$

2.2.1.4 Quantificação da OTA por HPLC

As amostras foram de seguida analisadas por HPLC de forma a quantificar a OTA presente. Utilizou-se um sistema de HPLC constituído por uma bomba Knauer K-1001, um detector de fluorescência Jasco FP-920 ($\lambda_{\text{ex}} = 333 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$) e um programa de aquisição de dados Borwin versão 1.21.60. Utilizou-se uma coluna analítica C_{18} de fase reversa Waters Spherisorb ODS2 (250 x 4,6 mm e 5 μm) protegida por uma pré-coluna com o mesmo enchimento e mantida a 30 °C. A fase móvel, constituída por acetonitrilo/ H_2O /ácido acético (99:99:2, v/v/v) foi filtrada utilizando um filtro de 0,2 μm (GHP, Gelman) e desgaseificada. Utilizou-se um caudal de 1,0 mL/min e um volume de injeção de 10 μL . Elaboraram-se, regularmente, curvas de calibração utilizando padrões de OTA (O1877, Sigma). Os tempos de retenção verificados nestas condições foram de 11,3 min para a OTA e de 2,3 min para a OT α .

2.2.1.5 Preparação da curva de calibração para a ocratoxina A

O procedimento utilizado para preparar a curva de calibração baseia-se no método descrito pelo comité de normalização europeu para a análise de OTA em vinho e cerveja (CEN, 2001). Em primeiro lugar, dissolveu-se o padrão comercial de OTA (O1877, Sigma) em 50 mL de tolueno/ácido acético (99:1, v/v) de forma a obter uma solução com aproximadamente 20 $\mu\text{g/mL}$ (*stock-1*). Determinou-se a absorvência máxima desta solução registando o espectro de absorvência entre os 300 e os 370 nm utilizando um espectrofotómetro (V-560, Jasco) e calculou-se a sua concentração exacta utilizando a equação 2.2.

$$\mu\text{g OTA/ml} = \frac{A \times M \times 100}{\varepsilon \times \delta} \quad (\text{eq. 2.2})$$

em que A= absorvência máxima da solução (a $\lambda \approx 333 \text{ nm}$), M= massa molecular da OTA (403,8 g/mole), ε = coeficiente de extinção molar da OTA neste solvente (544 mole^{-1}) e δ = passo óptico da cuvete (1 cm). A partir desta e por diluição elaborou-se uma solução com 2 $\mu\text{g/mL}$ em tolueno/ácido acético (99:1, v/v) (*stock-2*) tendo a sua concentração correcta também sido determinada como já descrito. De seguida, um volume apropriado de *stock-2* foi pipetado para um frasco de vidro limpo e foi evaporado a 50 °C, com a ajuda de uma ligeira corrente de azoto. O resíduo seco foi ressuscitado em 1 mL de acetonitrilo/ H_2O /ácido acético (99:99:2, v/v/v) de forma a preparar uma solução com 100 ng OTA/mL. A partir desta prepararam-se, por diluição, soluções padrão com 20, 10, 1, 0,1 e 0,05 ng OTA/mL que foram analisadas por HPLC em simultâneo com as amostras. Regularmente, novos padrões foram

preparados e injectados de forma a verificar e a ajustar a curva de calibração. O *stock-1* foi guardado a -20 °C e o *stock-2* a 4 °C, tendo a sua concentração sido regularmente verificada.

2.2.1.6 Preparação de padrões de ocratoxina α

Padrões de OT α foram preparados por hidrólise ácida e por hidrólise enzimática a partir de padrões de OTA (O1877, Sigma).

A hidrólise ácida foi efectuada como descrito por van der Merwe *et al.* (1965a). Brevemente, a OTA foi ressuspensa em HCl 6N e aquecida com refluxo durante 72 horas.

A hidrólise enzimática foi efectuada com carboxipeptidase A (C-9268, Sigma) de pâncreas bovino como descrito por Pitout (1969). Brevemente, a OTA foi dissolvida em 1 mL de tampão Tris-HCl (25 mM a pH 7,5 com 0,5 M de NaCl) e incubada à temperatura ambiente durante 2 dias, com 20 μ l de enzima.

2.2.2 Biodegradação da ocratoxina A por leveduras

2.2.2.1 Material biológico

Utilizaram-se as seguintes estirpes: *Issatchenkia orientalis* PL34, *Pichia membranifaciens* PL17, *Rhodotorula glutinis* IGC4177T, *R. minuta* IGC4689, *Saccharomyces bayanus* IGC4456T, *S. cerevisiae* D35, *S. cerevisiae* D305, *S. pasteurianus* IGC4601T e *Kluyveromyces marxianus* IGC3286 todas elas conservadas na colecção de leveduras do Departamento de Biologia da Universidade do Minho.

2.2.2.2 Preparação do inóculo, dos meios de cultura e sua inoculação

As estirpes utilizadas foram crescidas em placas de petri com o meio de cultura *Yeast peptone dextrose* (YPD) durante 3 dias a 30 °C no escuro.

YPD	Extracto de levedura	10 g/L
	Glucose	20 g/L
	Peptona bacteriológica	10 g/L
	Agar (Oxoid N° 3)	20 g/L

Preparou-se meio YPD líquido (sem agar) suplementado com 0,5 μ g/mL de OTA (YPD+OTA), autoclavou-se a 121 °C durante 15 min e colocaram-se porções de 5 mL em tubos de Greiner de 50 mL. Para cada levedura, inocularam-se dois tubos de Greiner utilizando um palito estéril com o qual se recolheu uma porção da colónia. Os tubos foram

incubados durante 2 dias a 30 °C com agitação orbital. Como controlos, cinco tubos com 5 mL de meio YPD+OTA estéril foram incubados nas mesmas condições.

2.2.2.3 Extracção da OTA

Após os 2 dias de incubação e para cada um dos tubos de Greiner, a OTA foi extraída utilizando o seguinte procedimento. Adicionou-se 1 mL de HCl (2 N), 5 mL de clorofórmio e agitou-se fortemente durante 1 min utilizando o vortex. De seguida centrifugaram-se os tubos a 4000 RCF durante 2 min a 4 °C (Megafuge 1.0R, Heraeus) de forma a quebrar a emulsão formada e a permitir uma boa separação das fases. Recolheu-se o clorofórmio e evaporou-se a 50 °C, com a ajuda de uma ligeira corrente de azoto num frasco de vidro limpo. Este processo foi repetido mais duas vezes e os resíduos secos foram guardados a 4 °C até serem analisados por HPLC. Da mesma forma, extraíram-se os cinco frascos com YPD+OTA (controlos) de forma a calcular as taxas de recuperação do processo de extracção.

2.2.2.4 Quantificação da OTA por HPLC

Os resíduos secos foram ressuspensos em 1 mL de fase móvel, filtrados por um filtro de seringa de 0,45 µm (acrodisc GHP, Gelman), diluídos quando necessário e analisados por HPLC para quantificar a OTA. Utilizou-se, para tal, um sistema equipado por uma bomba Varian 9002, um detector de fluorescência Jasco FP-920 (λ_{ex} = 333 nm e λ_{em} = 460 nm), um amostrador automático Marathon Basic e uma coluna C₁₈ de fase reversa YMC-Pack ODS-AQ (250 x 4,6 mm e 5 µm) protegida por uma pré-coluna com o mesmo enchimento e mantida a 30 °C. A fase móvel, constituída por acetonitrilo/H₂O/ácido acético (99:99:2, v/v/v), foi filtrada utilizando um filtro de 0,2 µm (GHP, Gelman) e desgaseificada. Utilizou-se um caudal de 0,8 mL/min e um volume de injeção de 100 µL. Elaboraram-se, regularmente, curvas de calibração utilizando padrões de OTA (O1877, Sigma) como já descrito acima. Na Figura A-2.1 do anexo a este capítulo encontra-se um exemplo de uma curva de calibração elaborada. A taxa de degradação da OTA foi calculada utilizando a equação 2.3. Neste caso, dado a taxa de recuperação ter rondado os 100%, utilizou-se a quantidade de OTA adicionada ao meio de cultura para calcular a taxa de degradação e não a OTA recuperada, como aconteceu na equação 2.1. Os tempos de retenção verificados nestas condições foram de 19,1 min para a OTA e de 8,3 min para a OT α .

$$\text{Taxa degr.} = 100 - \left(\frac{\text{OTA} \times 100}{2,5} \right) \quad (\text{eq. 2.3})$$

2.3 Resultados

2.3.1 Biodegradação da ocratoxina A por fungos filamentosos

2.3.1.1 Taxa de recuperação do processo de extracção

De forma a determinar a eficácia do processo de extracção, extraíram-se, como já descrito, 3 controlos constituídos por 5 mL de meio YES+OTA. Na Tabela 2.3.1 pode-se encontrar a OTA detectada em cada um deles e as respectivas taxas de recuperação. O valor médio de OTA detectada ($4,294 \pm 0,031 \mu\text{g}$) foi utilizado como referência para calcular as taxas de degradação das estirpes. A taxa de recuperação média do processo de extracção foi de $85,9 \pm 0,6\%$. No meio de cultura YES não foi detectada OTA.

Tabela 2.3.1 OTA detectada nos meios de cultura utilizados para o cálculo das taxas de recuperação

	OTA (μg)	Taxa de recuperação (%)
YES+OTA controlo 1	4,325	86,5
YES+OTA controlo 2	4,264	85,3
YES+OTA controlo 3	4,292	85,8
Média	4,294	85,9
Desvio padrão	0,031	0,6

2.3.1.2 Biodegradação da ocratoxina A pelos aspergilli negros

Verificou-se que a maioria das estirpes de aspergilli negros testadas foram capazes de degradar a quase totalidade da OTA presente no meio de cultura YES+OTA (Tabela 2.3.2). Das 37 estirpes testadas: 29 apresentaram taxas de degradação superiores a 95%; 6 taxas de degradação entre os 80 e os 95% e 2 taxas de degradação entre os 50 e os 80%.

Entre as estirpes de *A. carbonarius* produtoras de OTA, verificou-se que três apresentaram taxas de degradação mais elevadas (92,8, 93,7 e 98,4%) e duas taxas de degradação mais baixas (55,2 e 60%). Verificou-se, também, que as estirpes com taxas de degradação mais elevadas são exactamente as que menos OTA produziram quando crescidas em YES (0,977, 0,123 e 0,040 μg , respectivamente). Verificou-se, ainda, que as estirpes de *A. ellipticus*, *A. foetidus*, *A. ibericus* e *A. japonicus* degradaram todas elas mais de 95% da OTA presente

no meio de cultura e que, de entre as estirpes de *A. niger* não produtoras de OTA, apenas três não apresentaram taxas de degradação superiores a 95%. Finalmente, entre as estirpes de *A. niger* produtoras de OTA, verificou-se que apenas uma degradou menos de 95% da OTA presente no meio de cultura. Essa estirpe foi, também, a que mais OTA produziu no meio YES (1,193 µg).

Tabela 2.3.2 OTA detectada nos meios de cultura e respectivas taxas de degradação dos aspergilli negros testados

Espécie	Código de isolamento	OTA (µg) detectada em		Taxa de degradação (%)		
		YES+OTA	YES	[50;80[[80;95[[95;100]
<i>Aspergillus carbonarius</i> (produtor de OTA)	01UAs129	0,270	0,123	-	93,7	-
	01UAs178	1,716	2,547	60,0	-	-
	01UAs198	1,925	1,337	55,2	-	-
	01UAs236	0,071	0,040	-	-	98,4
	01UAs263	0,310	0,977	-	92,8	-
<i>Aspergillus ellipticus</i>	01UAs82	0,091	0	-	-	97,9
	01UAs139	0,046	0	-	-	98,9
<i>Aspergillus foetidus</i>	01UAs162	0,132	0	-	-	96,9
<i>Aspergillus ibericus</i>	01UAs294	0,008	0	-	-	99,8
<i>Aspergillus japonicus</i>	01UAs128	0,186	0	-	-	95,7
<i>Aspergillus niger</i> (não produtores de OTA)	00UAs1	0,055	0	-	-	98,7
	00UAs2	0,179	0	-	-	95,8
	00UAs3	0,132	0	-	-	96,9
	00UAs5	0,564	0	-	86,9	-
	00MAs19	0,007	0	-	-	99,9
	00MAs20	0,004	0	-	-	99,9
	00MAs21	0,003	0	-	-	99,9
	00MAs22	0,004	0	-	-	99,9
	00MAs23	0,005	0	-	-	99,9
	00MAs24	0,003	0	-	-	99,9
	01UAs22	0,106	0	-	-	97,5
	01UAs42	0,538	0	-	87,5	-
	01UAs83	0,015	0	-	-	99,7
	01UAs101	0,001	0	-	-	99,9
	01UAs107	0,031	0	-	-	99,3
	01UAs119	0,065	0	-	-	98,5
	01UAs125	0,085	0	-	-	98,0
	01UAs126	0,077	0	-	-	98,2
	01UAs160	0,035	0	-	-	99,2
	01UAs181	0,013	0	-	-	99,7
01UAs185	0,282	0	-	93,4	-	
01UAs192	0,033	0	-	-	99,2	
<i>Aspergillus niger</i> (produtores de OTA)	01UAs193	0,029	0,007	-	-	99,3
	01UAs204	0,059	0	-	-	98,6
	01UAs273	0,170	0,057	-	-	96,1
	01UAs318	0,069	0,009	-	-	98,4
	01UAs358	0,669	1,193	-	84,4	-

Para cada uma das espécies anteriores, apresentam-se os cromatogramas referentes a uma das estirpes testadas (Figuras 2.3.1 a 2.3.7). Nas situações em que existem estirpes ocratoxigénicas e não ocratoxigénicas apresentam-se os cromatogramas de uma estirpe produtora e não produtora de OTA.

Se compararmos os cromatogramas obtidos a partir do meio de cultura YES+OTA com os obtidos a partir do meio de cultura YES, verifica-se o aparecimento ou aumento de dois picos ($t_r = 2,4$ min e $t_r = 3,4$ min), que resultam muito provavelmente da biodegradação da OTA por estas estirpes. O pico com tempo de retenção de 2,4 min foi identificado como sendo OT α utilizando um padrão produzido a partir de OTA por hidrólise ácida (Figura 2.3.8). A identificação do pico com tempo de retenção de 3,4 min não foi possível, no entanto, este surge no cromatograma referente à hidrólise enzimática da OTA (Figura 2.3.9).

Este perfil de degradação foi verificado em todos os aspergilli negros testados e deve-se, muito provavelmente, à produção por estas espécies de uma peptidase capaz de hidrolisar a OTA.

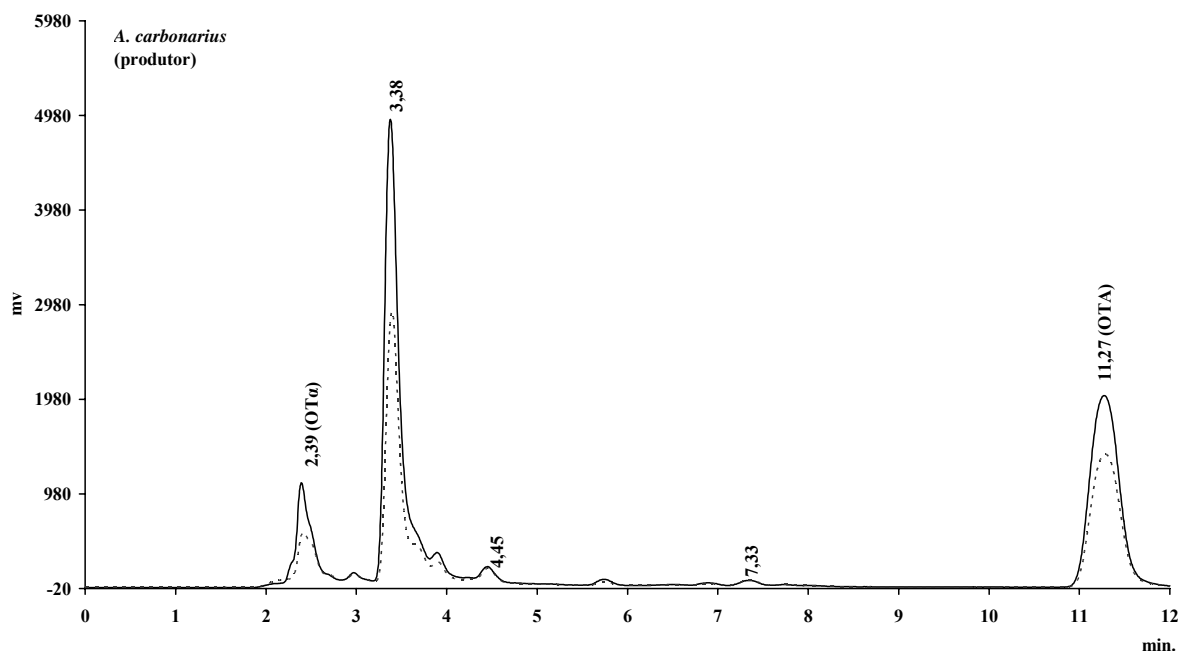


Figura 2.3.1 Cromatogramas de HPLC obtidos com *A. carbonarius* 01UAs198 (produtor de OTA) para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

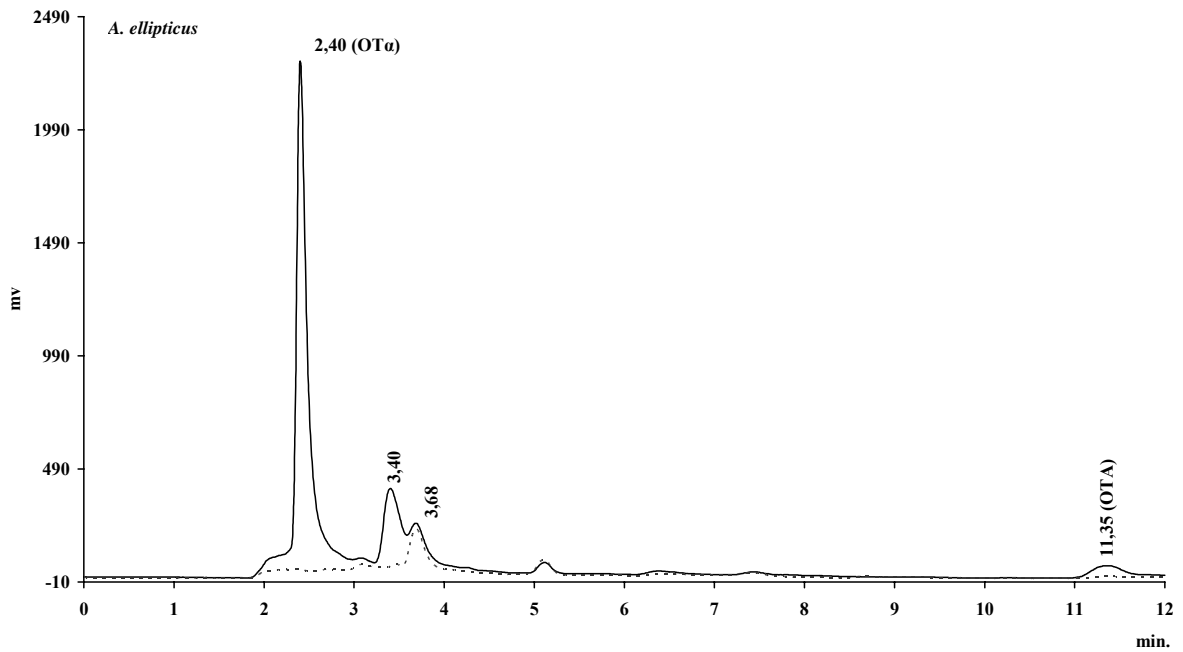


Figura 2.3.2 Cromatogramas de HPLC obtidos com *A. ellipticus* 01UAs139 para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

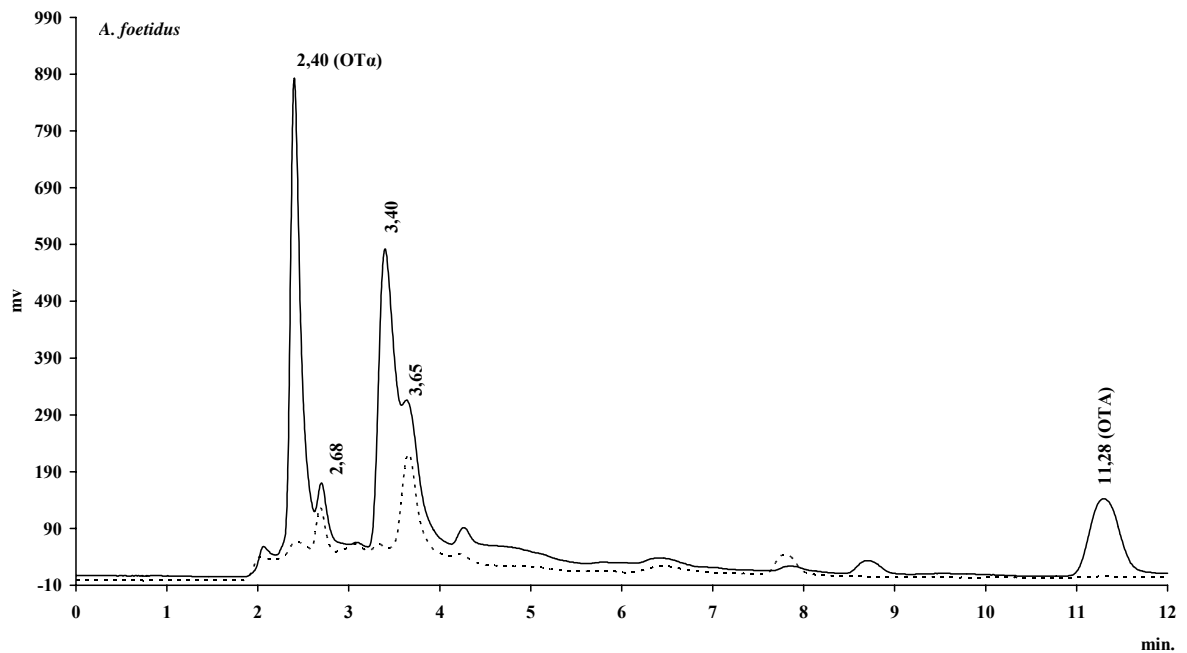


Figura 2.3.3 Cromatogramas de HPLC obtidos com *A. foetidus* 01UAs162 para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

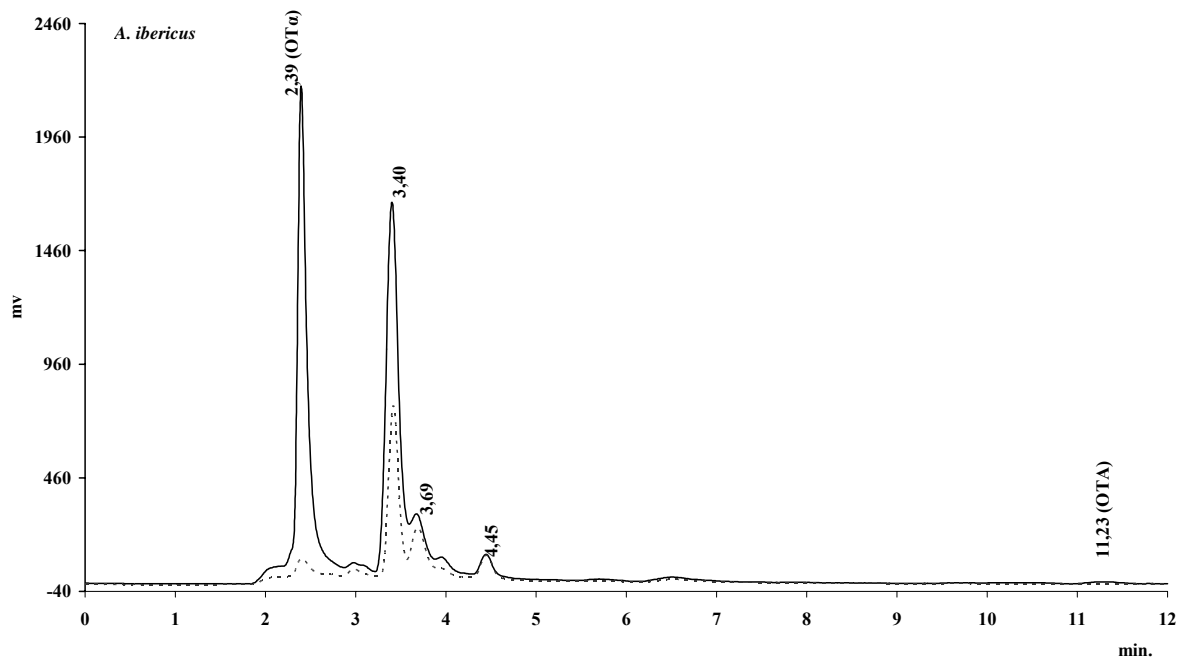


Figura 2.3.4 Cromatogramas de HPLC obtidos com *A. ibericus* 01UAs294 para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

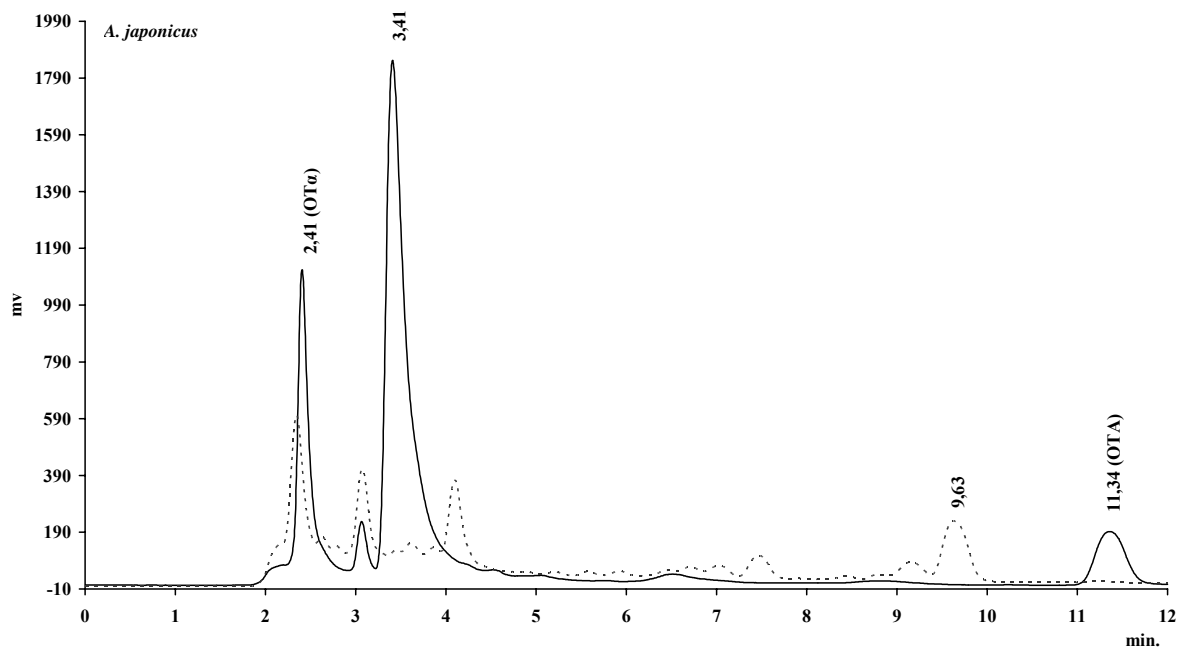


Figura 2.3.5 Cromatogramas de HPLC obtidos com *A. japonicus* 01UAs128 para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

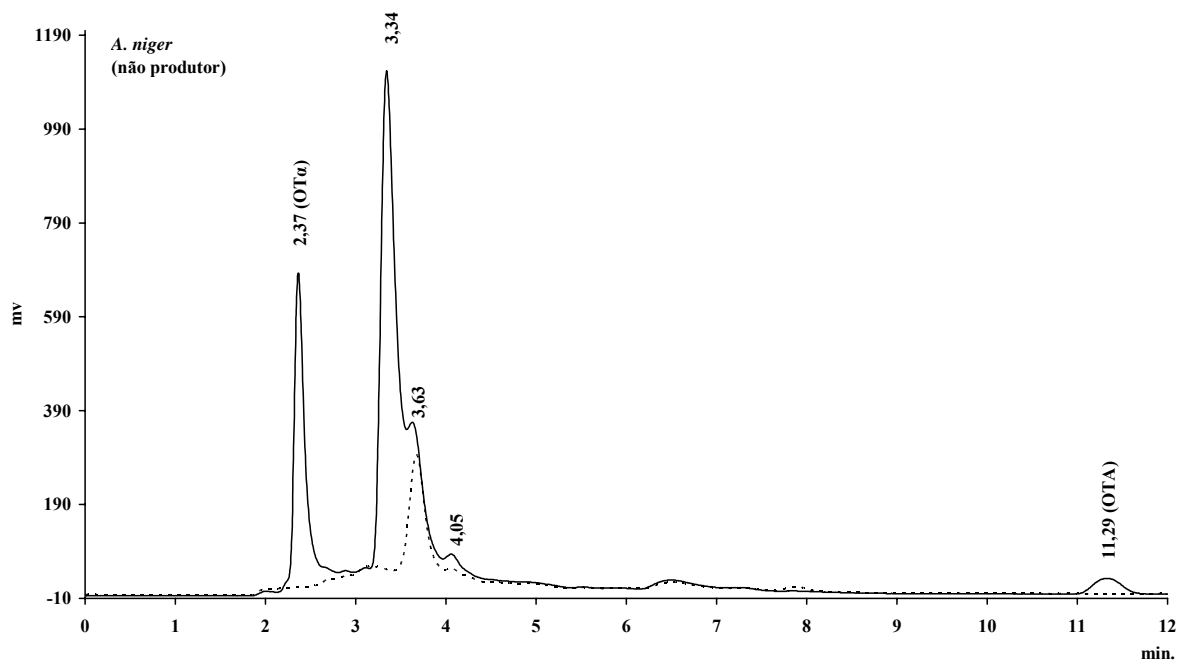


Figura 2.3.6 Cromatogramas de HPLC obtidos com *A. niger* 01UAs107 (não produtor de OTA) para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

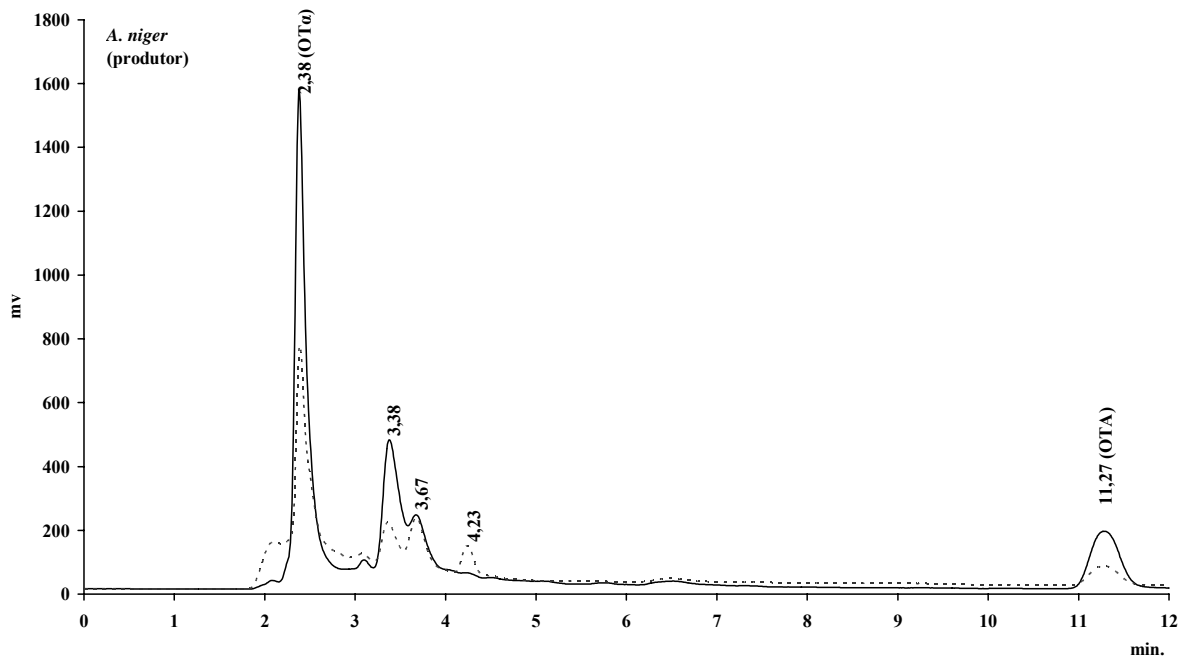


Figura 2.3.7 Cromatogramas de HPLC obtidos com *A. niger* 01UAs273 (produtor de OTA) para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

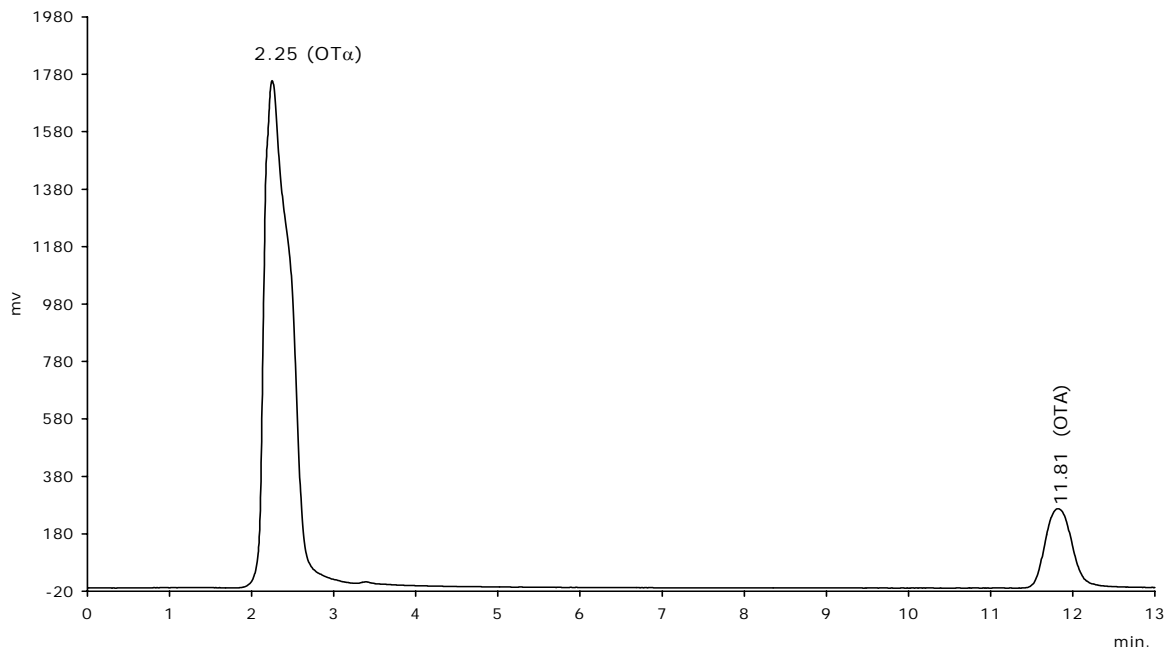


Figura 2.3.8 Cromatograma de HPLC do padrão de OT α obtido por hidrólise ácida da OTA.

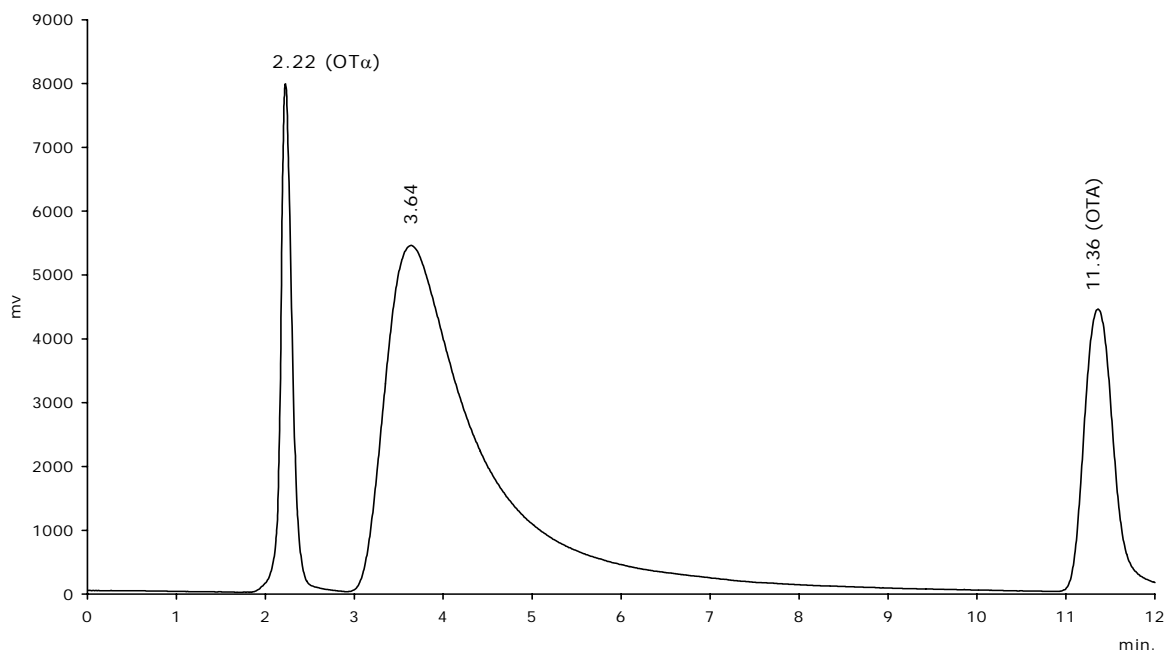


Figura 2.3.9 Cromatograma de HPLC do padrão de OT α obtido por hidrólise enzimática da OTA com carboxipeptidase A.

2.3.1.3 Biodegradação da ocratoxina A por outras espécies de aspergilli

Das 25 estirpes testadas: 6 apresentaram taxas de degradação superiores a 95%; 6 taxas de degradação entre os 80 e os 95%; 7 taxas de degradação entre os 50 e os 80%; 4 taxas de degradação entre os 1 e os 50% e duas não foram capazes de degradar a OTA presente no meio de cultura YES+OTA (Tabela 2.3.3). As estirpes que não degradaram a OTA foram *A. alliaceus* 01UAs62 e *A. ochraceus* 01UAs65. Quando estas foram crescidas no meio de cultura YES+OTA, detectou-se mais OTA (171,831 e 7,864 µg, respectivamente) do que aquela que foi adicionada ao meio de cultura. Com se pode verificar a partir da OTA detectada no meio de cultura YES (182,242 e 26,564 µg, respectivamente) estas estirpes produzem grandes quantidades de OTA e portanto, ou não são capazes de degradar de todo a OTA ou degradam-na mais lentamente do que a produzem.

Tabela 2.3.3 OTA detectada nos meios de cultura e respectivas taxas de degradação dos outros aspergilli testados

Espécie	Código de isolamento	OTA (µg) detectada em			Taxa de degradação (%)			
		YES+OTA	YES	0	[1;50[[50;80[[80;95[[95;100]
<i>A. alliaceus</i> (produtor de OTA)	01UAs62	171,831	182,242	0	-	-	-	-
<i>A. clavatus</i>	01UAs11	0,263	0	-	-	-	93,9	-
<i>A. flavus</i>	01UAs1	3,306	0	-	23,0	-	-	-
	01UAs383	1,596	0	-	-	62,8	-	-
	01UAs388	1,820	0	-	-	57,6	-	-
<i>A. fumigatus</i>	01UAs18	0,631	0	-	-	-	85,3	-
	01UAs23	0,508	0	-	-	-	88,2	-
	01UAs117	1,612	0	-	-	62,5	-	-
	01UAs118	0,481	0	-	-	-	88,8	-
	01UAs384	0,340	0	-	-	-	92,1	-
<i>A. ochraceus</i> (não produtor de OTA)	01UAs8	0,018	0	-	-	-	-	99,6
<i>A. ochraceus</i> (produtor de OTA)	01UAs65	7,864	26,564	0	-	-	-	-
<i>A. terreus</i>	01UAs7	2,383	0	-	44,5	-	-	-
	01UAs10	1,533	0	-	-	64,3	-	-
	01UAs301	1,389	0	-	-	67,7	-	-
<i>A. ustus</i>	01UAs5	2,181	0	-	49,2	-	-	-
	01UAs45	1,996	0	-	-	53,5	-	-
	01UAs385	2,158	0	-	49,7	-	-	-
<i>A. versicolor</i>	01UAs9	0,065	0	-	-	-	-	98,5
	01UAs69	0,073	0	-	-	-	-	98,3
	01UAs382	0,205	0	-	-	-	-	95,2
<i>A. wentii</i>	01UAs63	0,207	0	-	-	-	-	95,2
	01UAs64	1,860	0	-	-	56,7	-	-
	01UAs68	0,138	0	-	-	-	-	96,8
	01UAs121	0,498	0	-	-	-	88,4	-

A estirpe de *A. ochraceus* não produtora de OTA, as estirpes de *A. versicolor* e duas estirpes de *A. wentii* apresentaram taxas de degradação superiores a 95%. Uma das estirpes de *A. flavus* apresentou a taxa de degradação mais baixa de entre as estirpes testadas (23%).

Para cada uma das espécies anteriores, apresentam-se os cromatogramas referentes a uma das estirpes testadas (Figuras 2.3.10 a 2.3.19). Nas situações em que existem estirpes ocratoxigénicas e não ocratoxigénicas apresentam-se os cromatogramas de uma estirpe produtora e não produtora de OTA.

Nos cromatogramas de *A. clavatus*, *A. flavus* e *A. terreus* não se verificou a presença de picos que possam corresponder a produtos de degradação da OTA. Nos cromatogramas de *A. fumigatus* e *A. versicolor* verificou-se a presença do pico com $t_r = 3,4$ min, já observado nos cromatogramas dos aspergilli negros. Nos cromatogramas de *A. ochraceus* e *A. wentii* verificou-se a presença de dois picos ($t_r = 5,1$ min e $t_r = 5,8$ min) que não são detectados nos cromatogramas dos aspergilli negros. Estas duas espécies degradam a OTA utilizando uma via de degradação diferente da observada nos aspergilli negros, que origina a $OT\alpha$.

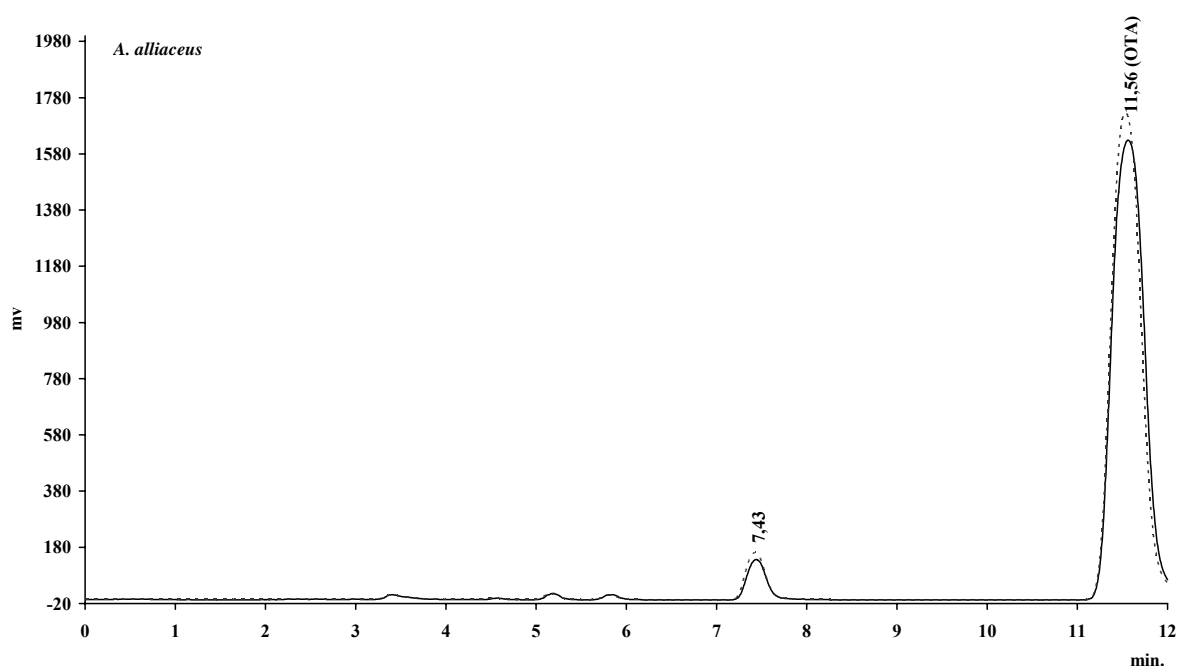


Figura 2.3.10 Cromatogramas de HPLC obtidos com *A. alliaceus* 01UAs62 (produtor de OTA) para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

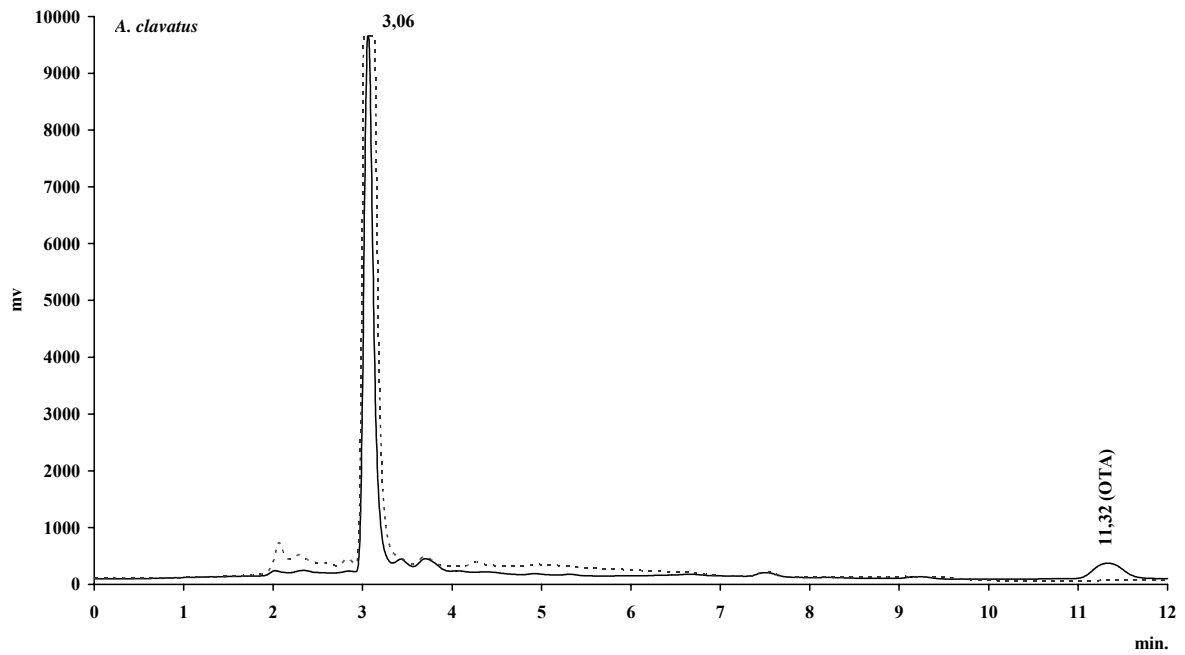


Figura 2.3.11 Cromatogramas de HPLC obtidos com *A. clavatus* 01UAs11 para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

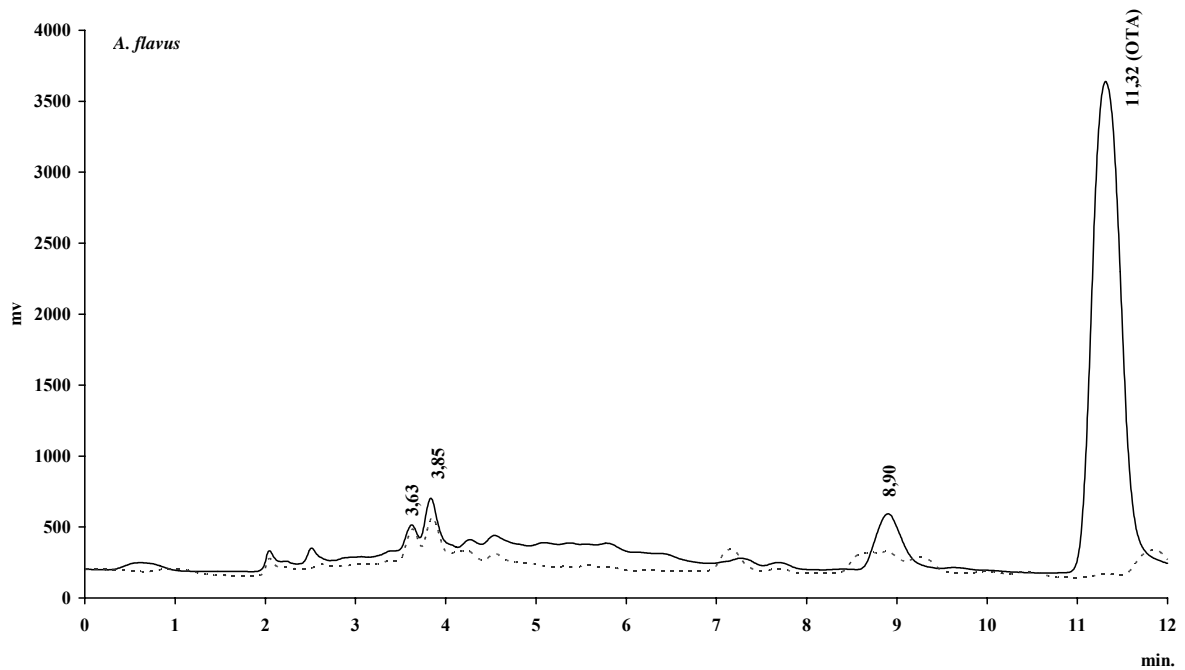


Figura 2.3.12 Cromatogramas de HPLC obtidos com *A. flavus* 01UAs1 para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

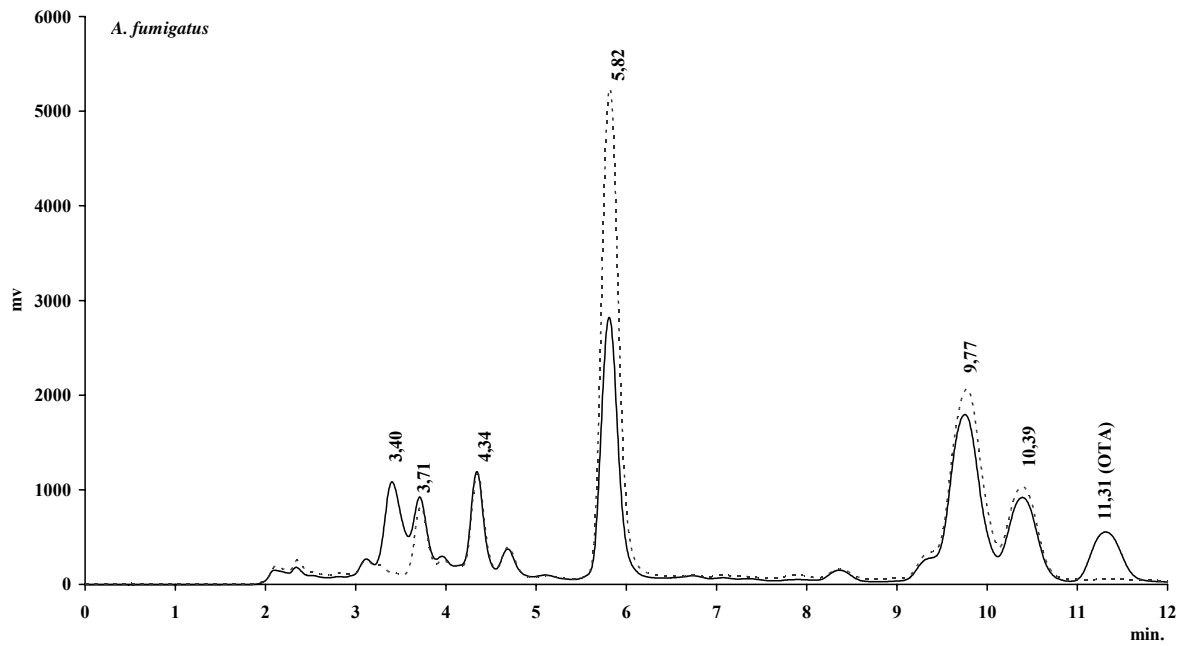


Figura 2.3.13 Cromatogramas de HPLC obtidos com *A. fumigatus* 01UAs23 para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

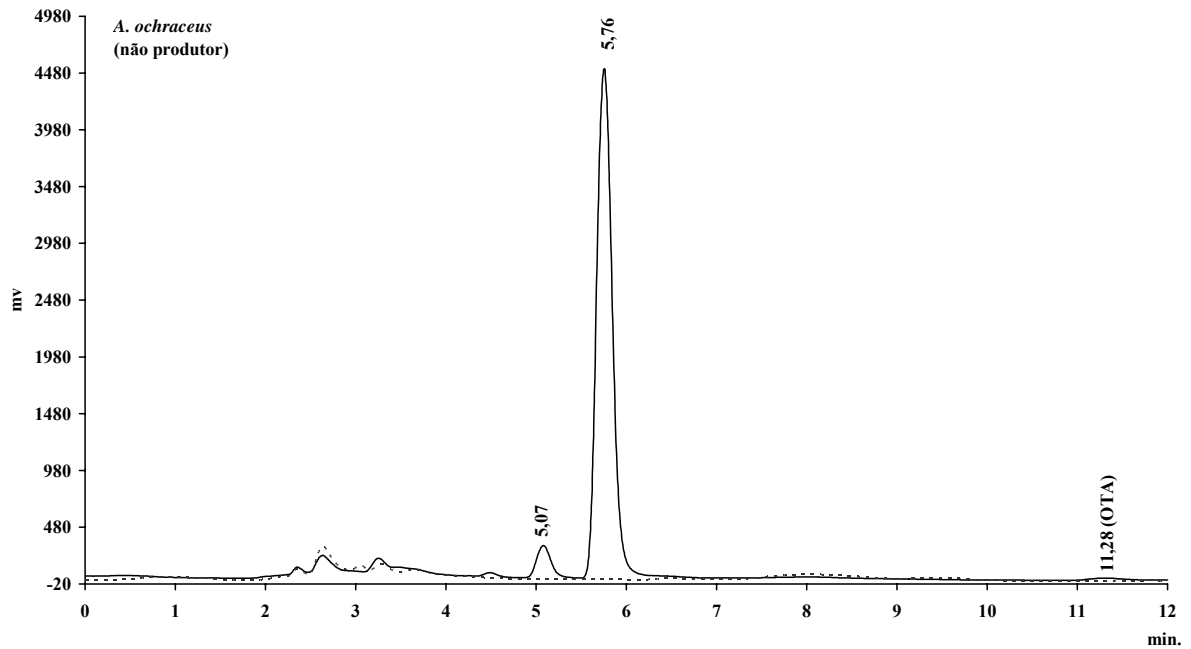


Figura 2.3.14 Cromatogramas de HPLC obtidos com *A. ochraceus* 01UAs8 (não produtor de OTA) para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

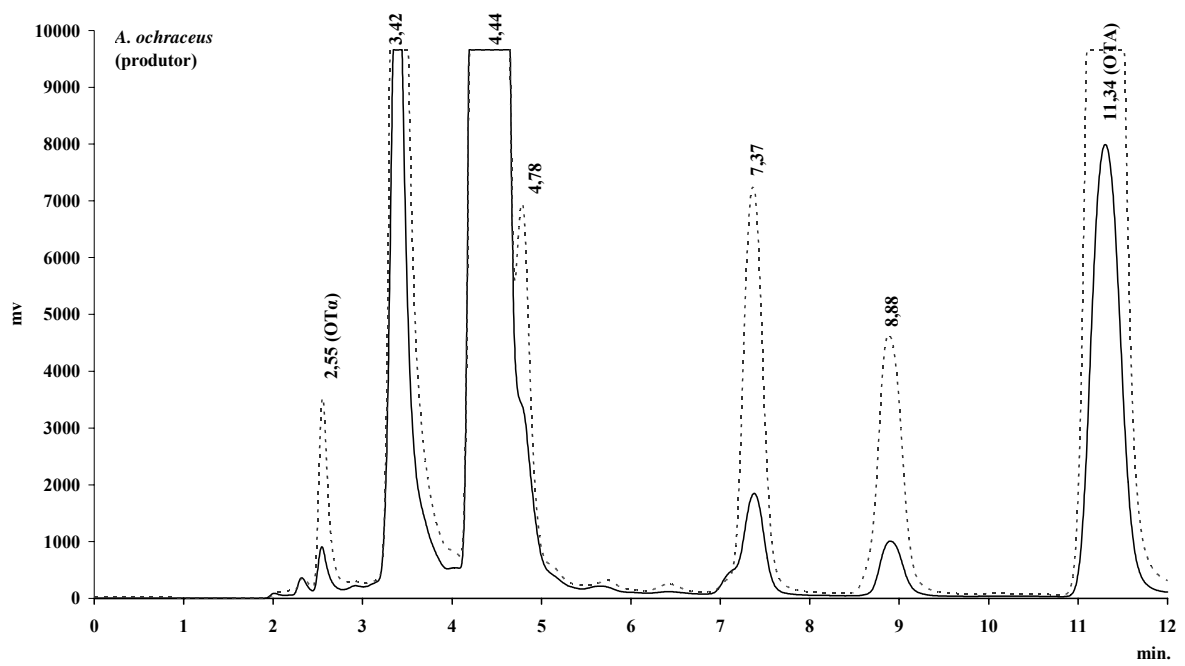


Figura 2.3.15 Cromatogramas de HPLC obtidos com *A. ochraceus* 01UAs65 (produtor de OTA) para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

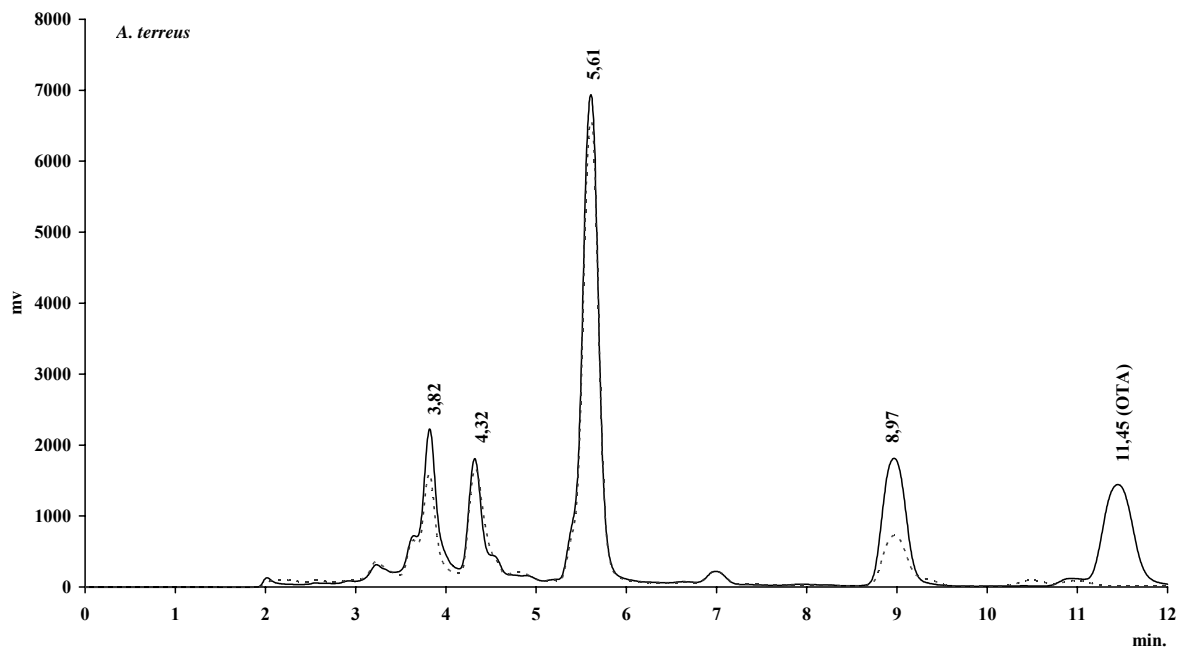


Figura 2.3.16 Cromatogramas de HPLC obtidos com *A. terreus* 01UAs301 para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

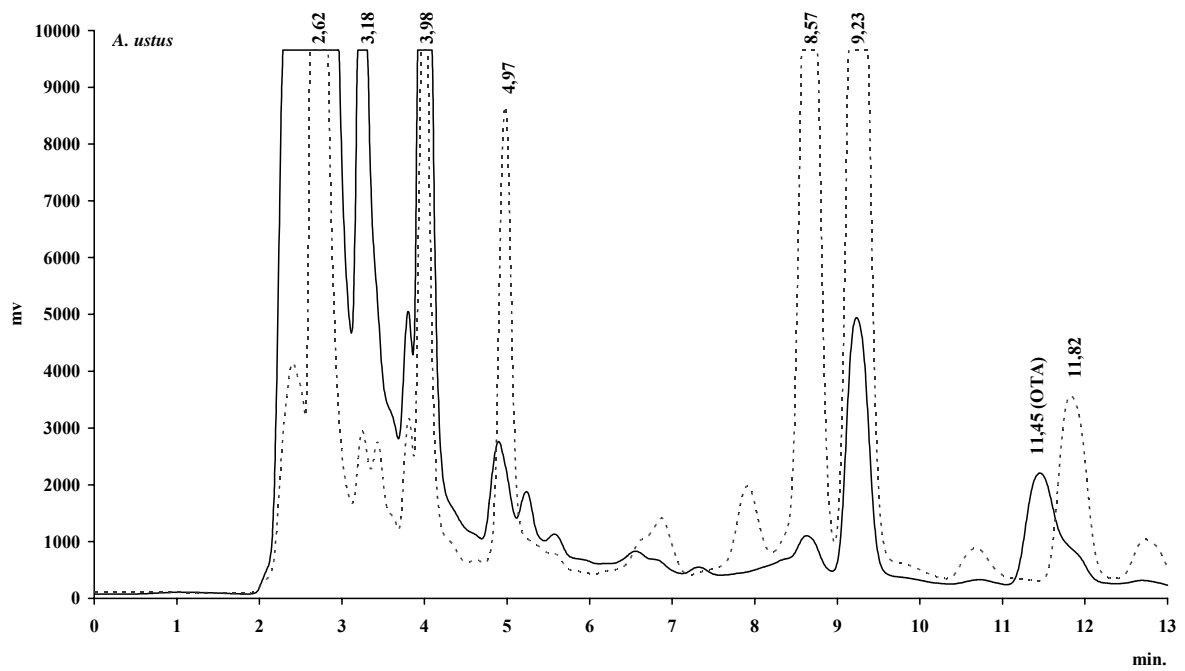


Figura 2.3.17 Cromatogramas de HPLC obtidos com *A. ustus* 01UAs45 para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

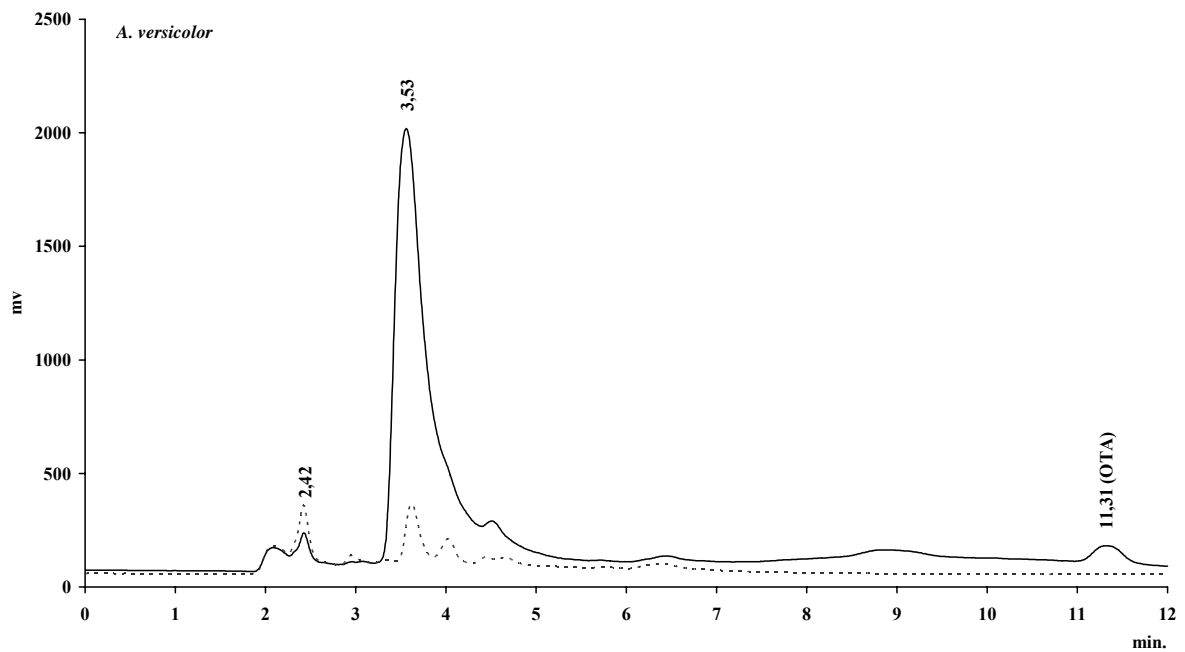


Figura 2.3.18 Cromatogramas de HPLC obtidos com *A. versicolor* 01UAs69 para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

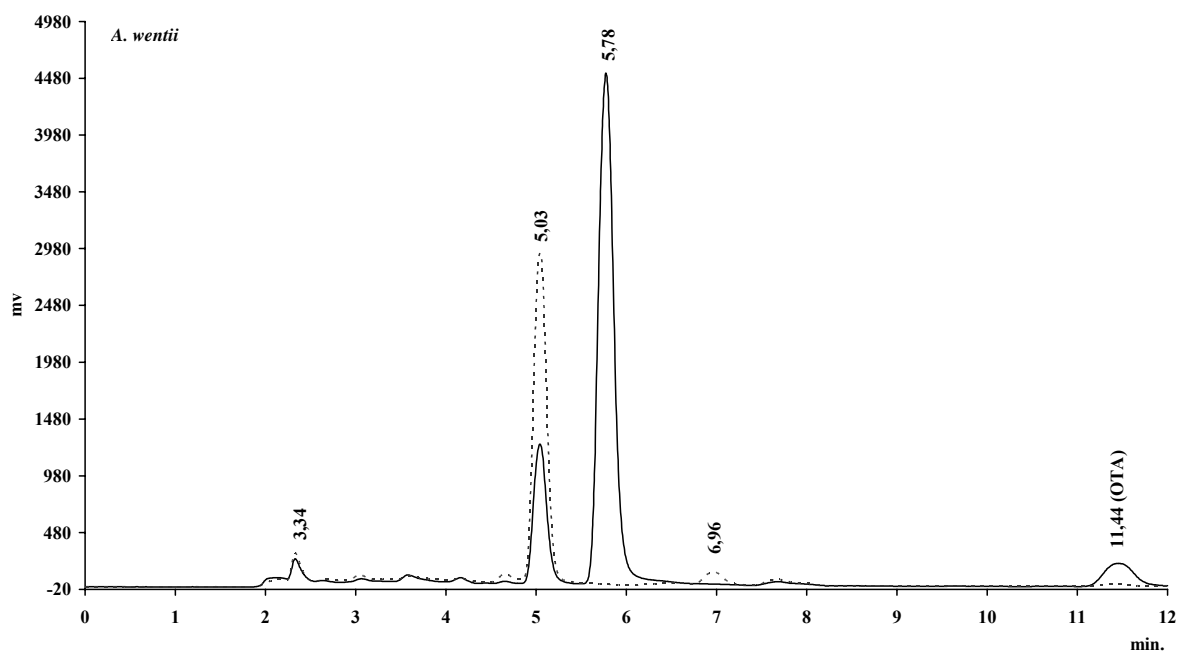


Figura 2.3.19 Cromatogramas de HPLC obtidos com *A. wentii* 01UAs63 para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

2.3.1.4 Biodegradação da ocratoxina A por outros géneros

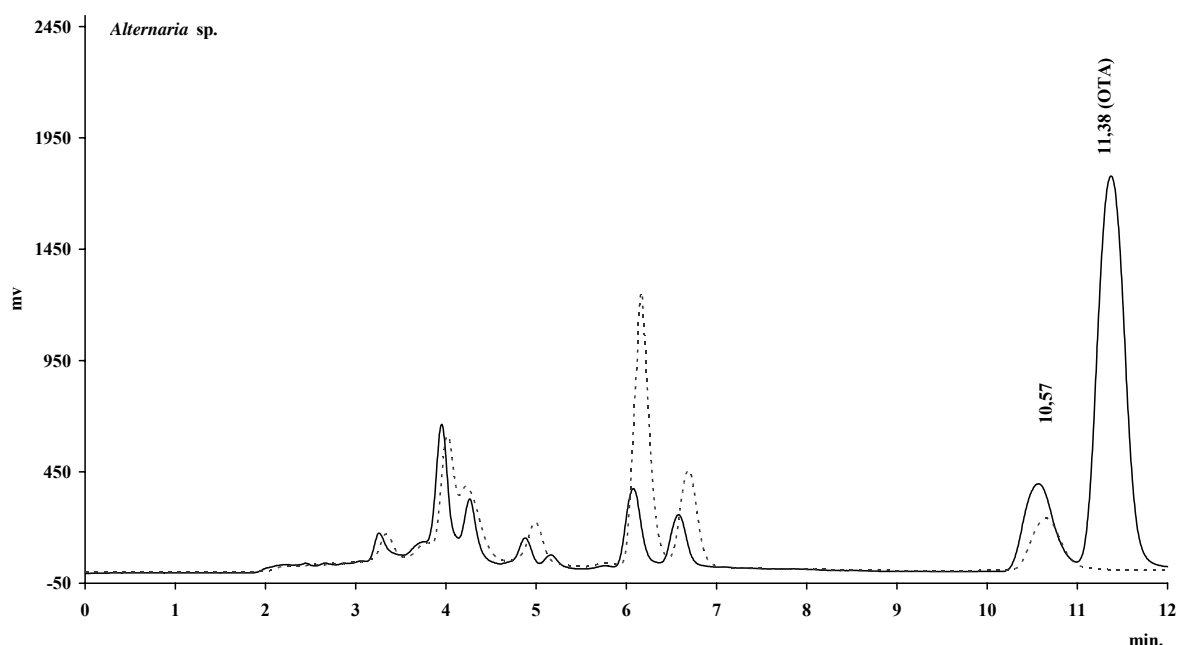
Das 14 estirpes testadas: 5 apresentaram taxas de degradação entre os 1 e os 50%; 4 taxas de degradação entre os 50 e os 80%; e 5 taxas de degradação entre os 80 e os 95% (Tabela 2.3.4).

A estirpe de *Cladosporium* sp., as 3 estirpes de *P. aurantiogriseum* e a de *P. spinulosum* apresentaram as taxas de degradação mais elevadas (90,8, 89,3, 85,3, 83,6 e 82,6%, respectivamente). As estirpes *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Trichothecium roseum* e *Trichoderma* sp. apresentaram as taxas de degradação mais baixas (32,8, 26,9, 19,1 e 14,8%, respectivamente).

Nas Figuras 2.3.20 a 2.3.30 podem-se observar os cromatogramas referentes a cada uma das espécies anteriores. Na maioria dos casos não se detectaram picos que possam ter resultado da degradação da OTA. No entanto, nos cromatogramas de *Cladosporium* sp., *Emericella nidulans* e *Trichoderma* sp. observa-se a presença do pico com $t_r = 3,4$ min, já observado nos cromatogramas dos aspergilli negros. O pico da OTA não foi detectado em nenhum destes cromatogramas.

Tabela 2.3.4 OTA detectada nos meios de cultura e respectivas taxas de degradação dos outros géneros testados

Espécie	Código de isolamento	OTA (μg) detectada em		Taxa de degradação (%)		
		YES+OTA	YES	[1;50[[50;80[[80;95]
<i>Alternaria sp.</i>	00UA15	1,610	0	-	62,5	-
<i>Aureobasidium pullulans</i>	00UAu1	2,537	0	40,9	-	-
<i>Botrytis sp.</i>	00UB1	1,699	0	-	60,4	-
<i>Cladosporium sp.</i>	00UC12	0,396	0	-	-	90,8
<i>Emericella nidulans</i>	01UAs17	1,998	0	-	53,5	-
<i>Mucor sp.</i>	00UZ2	2,887	0	32,8	-	-
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	01UP30	0,632	0	-	-	85,3
	01UP34	0,459	0	-	-	89,3
	01UP43	1,079	0	-	74,9	-
	01UP44	0,705	0	-	-	83,6
<i>Penicillium spinulosum</i>	01UP74	0,747	0	-	-	82,6
<i>Rhizopus sp.</i>	00MZ3	3,140	0	26,9	-	-
<i>Trichoderma sp.</i>	00UT4	3,657	0	14,8	-	-
<i>Trichothecium roseum</i>	00UTm1	3,474	0	19,1	-	-

**Figura 2.3.20** Cromatogramas de HPLC obtidos com *Alternaria sp.* 00UA15 para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

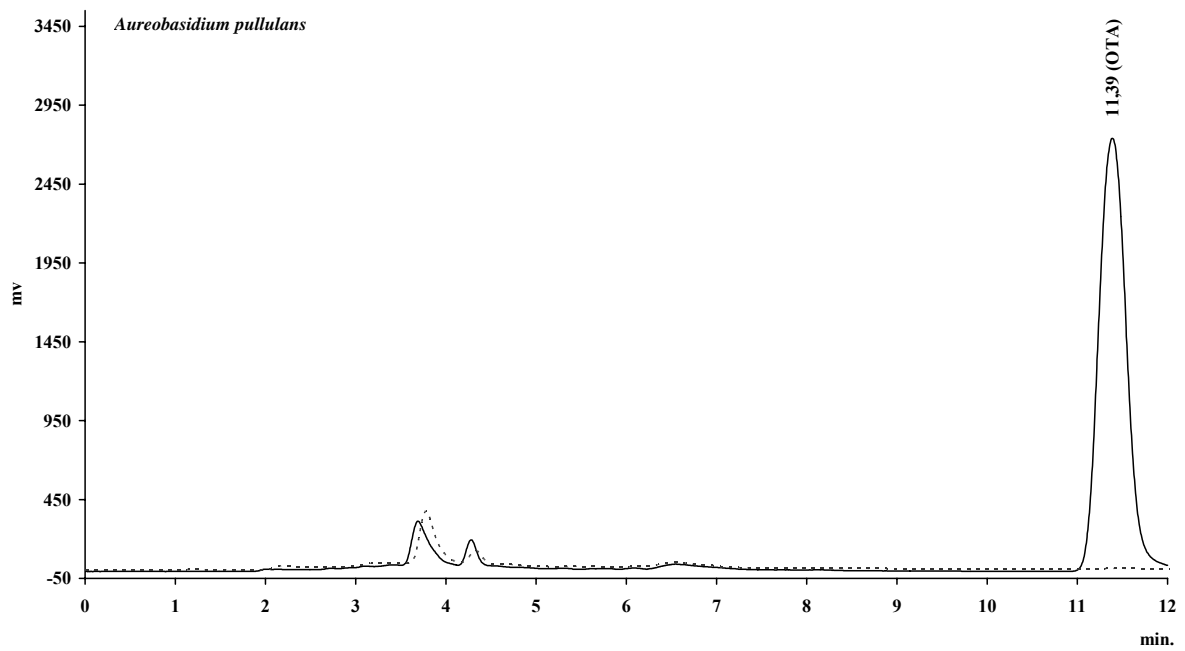


Figura 2.3.21 Cromatogramas de HPLC obtidos com *Aureobasidium pullulans* 00UAu1 para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

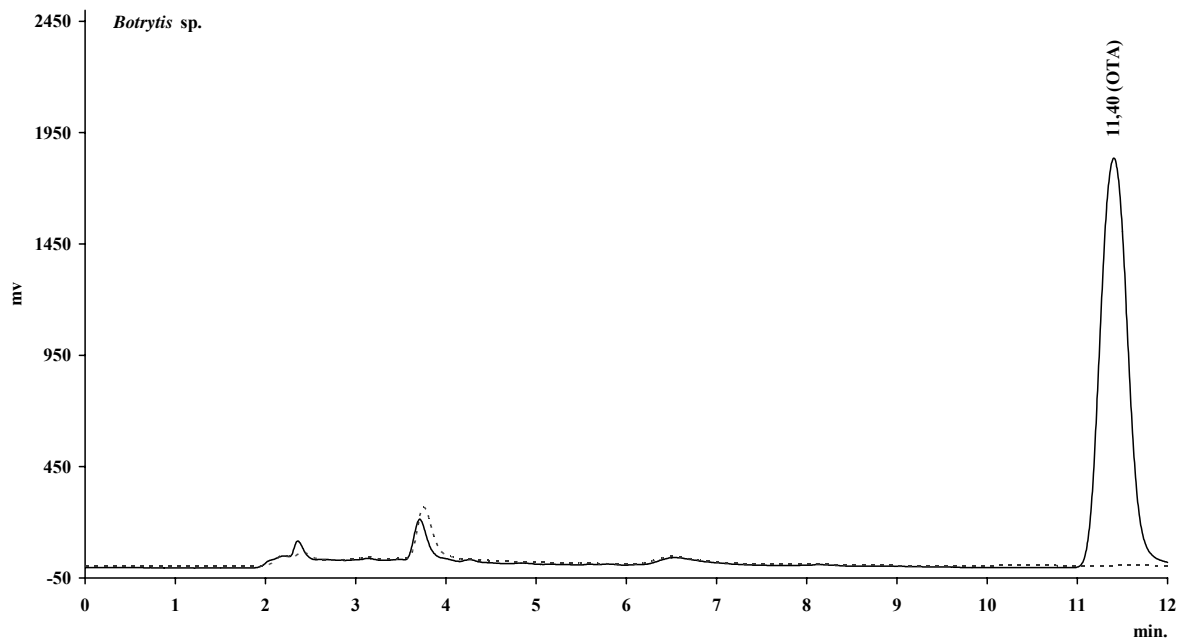


Figura 2.3.22 Cromatogramas de HPLC obtidos com *Botrytis sp.* 00UB1 para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

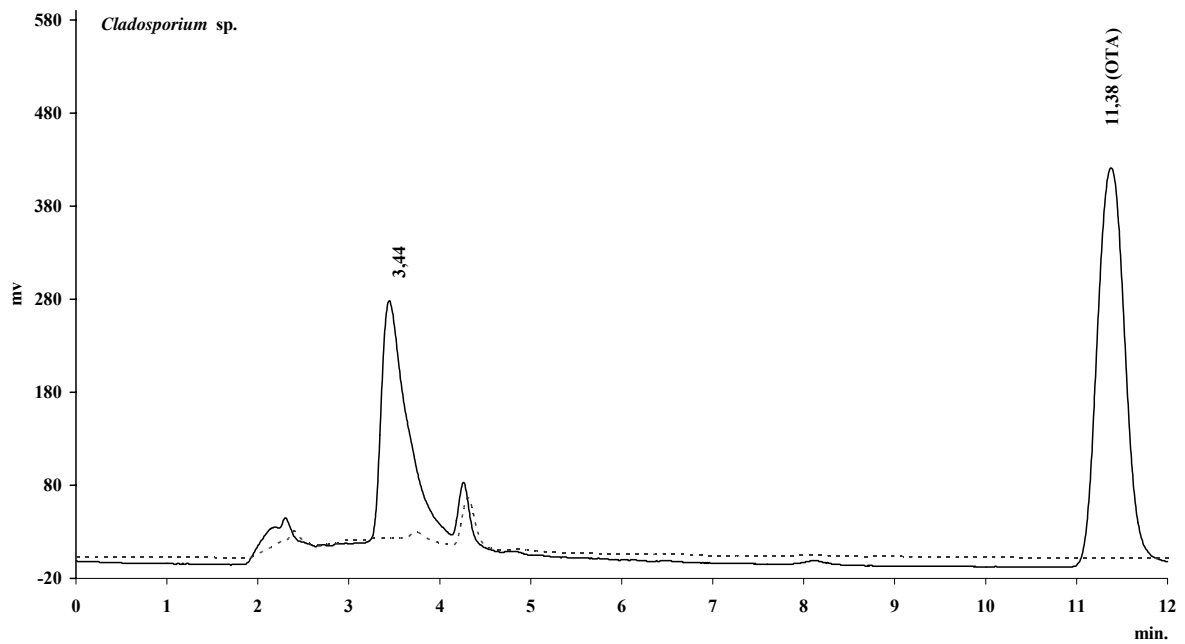


Figura 2.3.23 Cromatogramas de HPLC obtidos com *Cladosporium sp.* 00UC12 para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

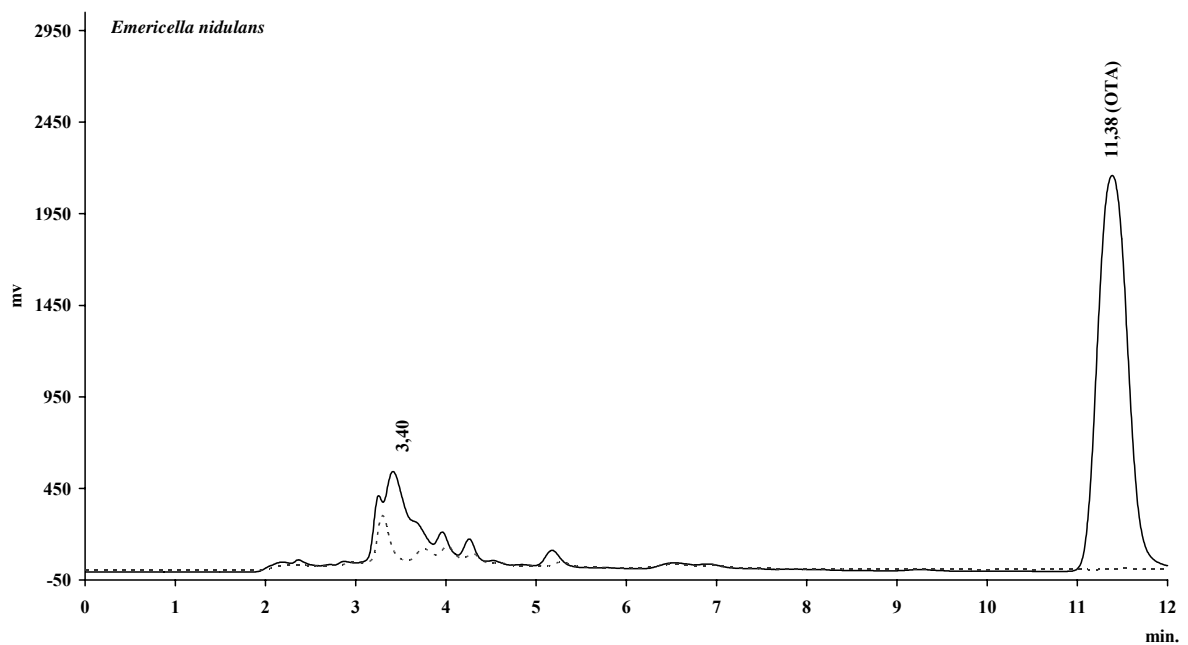


Figura 2.3.24 Cromatogramas de HPLC obtidos com *Emericella nidulans* 00UAs17 para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

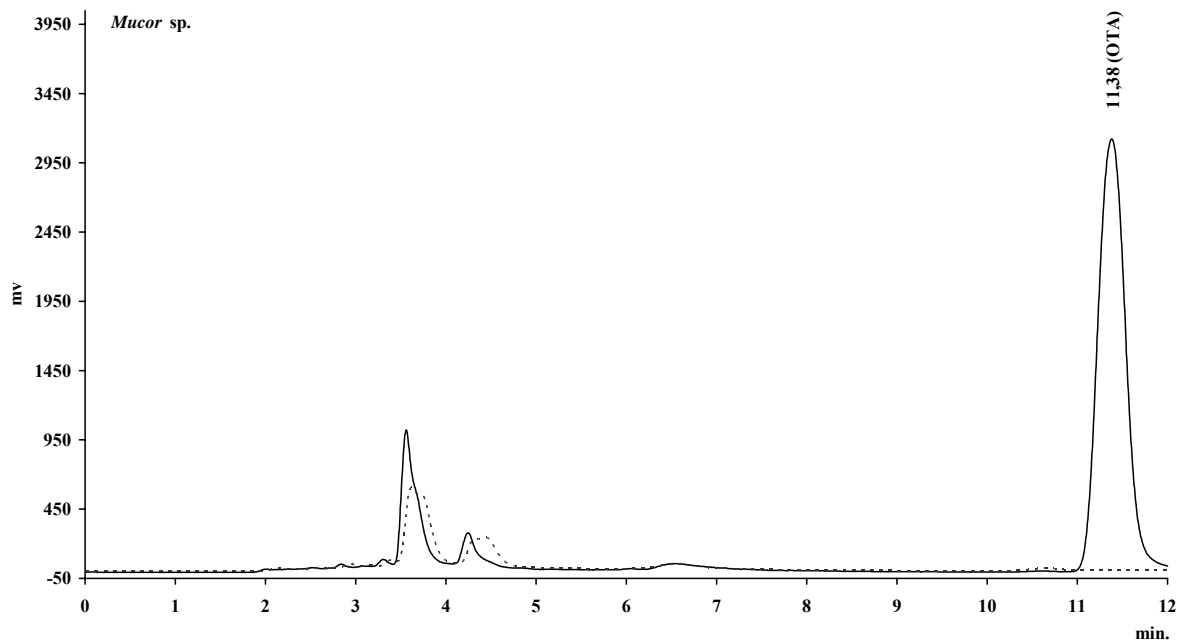


Figura 2.3.25 Cromatogramas de HPLC obtidos com *Mucor sp.* 00UZ2 para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

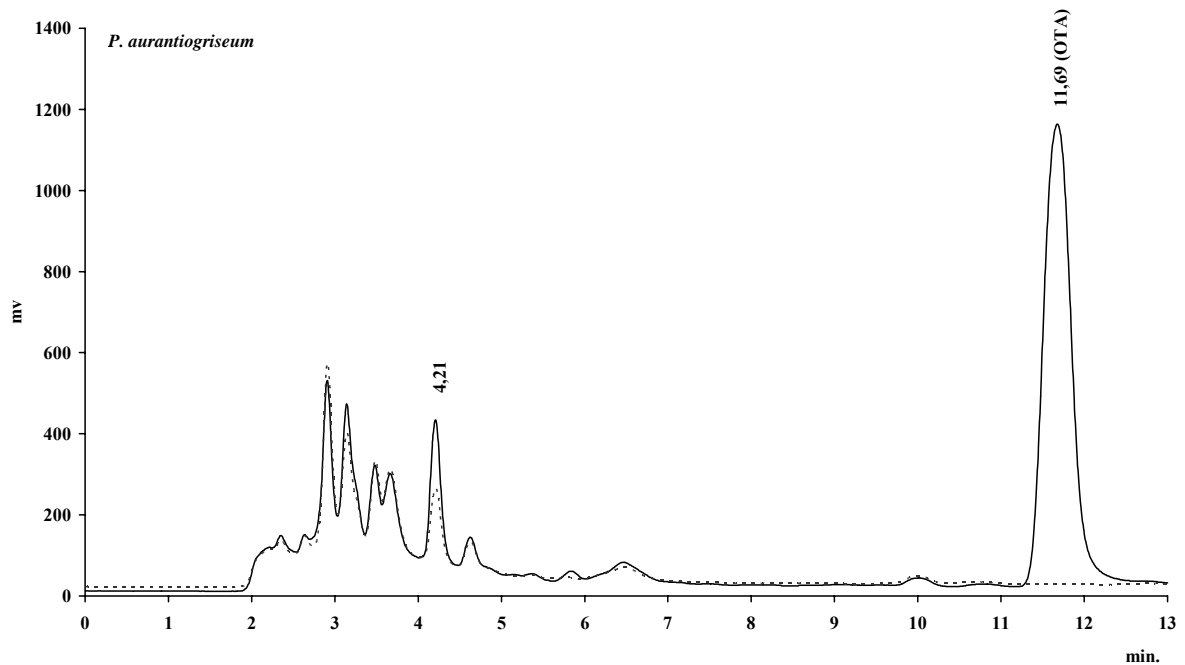


Figura 2.3.26 Cromatogramas de HPLC obtidos com *Penicillium aurantiogriseum* 01UP43 para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

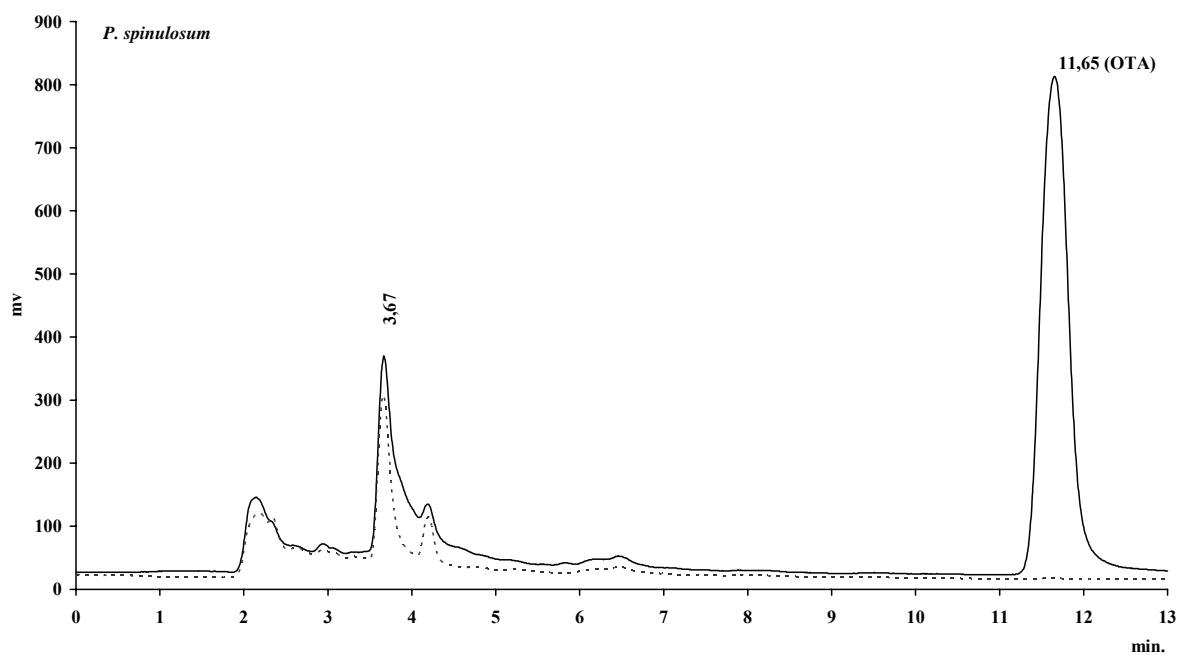


Figura 2.3.27 Cromatogramas de HPLC obtidos com *Penicillium spinulosum* 01UP74 para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

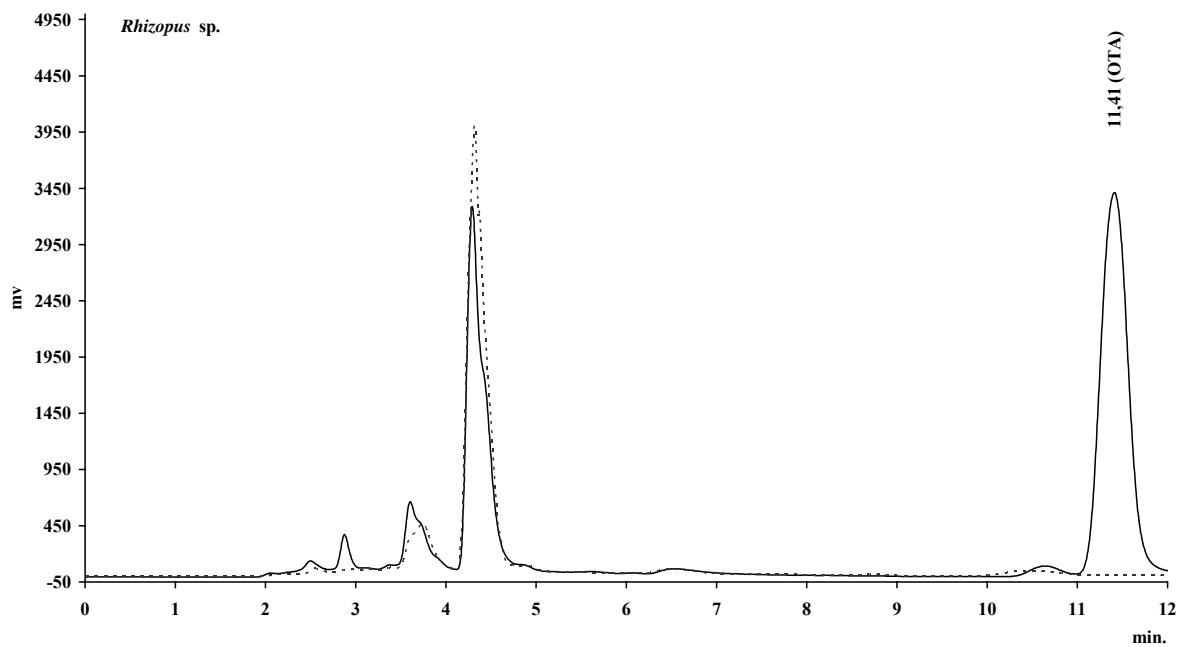


Figura 2.3.28 Cromatogramas de HPLC obtidos com *Rhizopus sp.* 00MZ3 para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

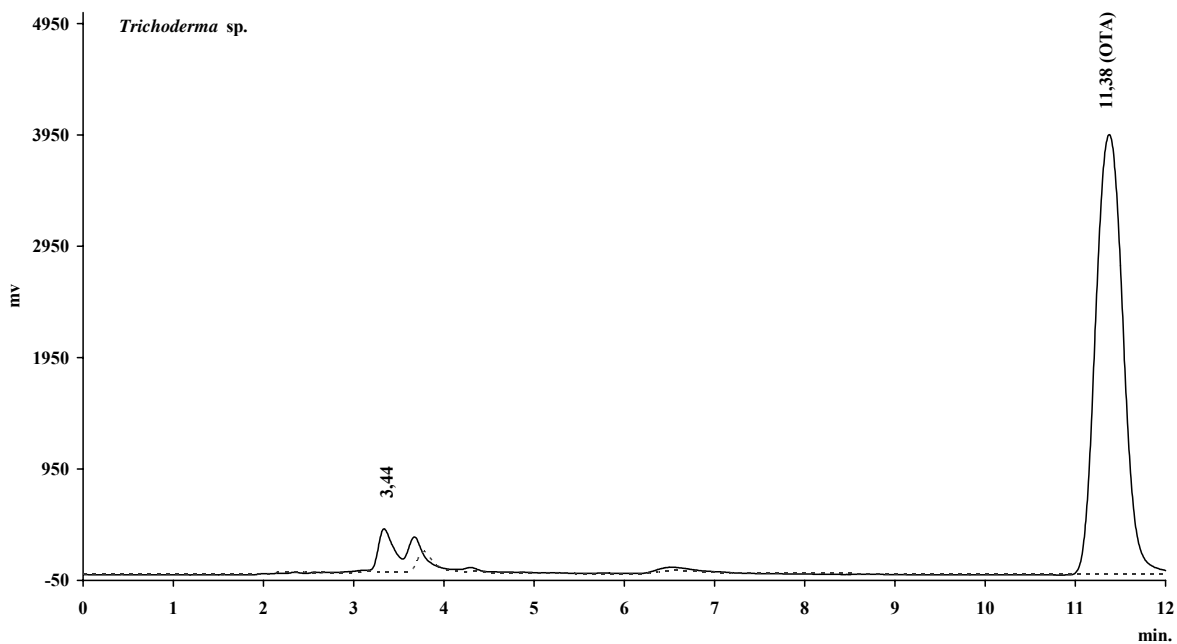


Figura 2.3.29 Cromatogramas de HPLC obtidos com *Trichoderma sp.* 00UT4 para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

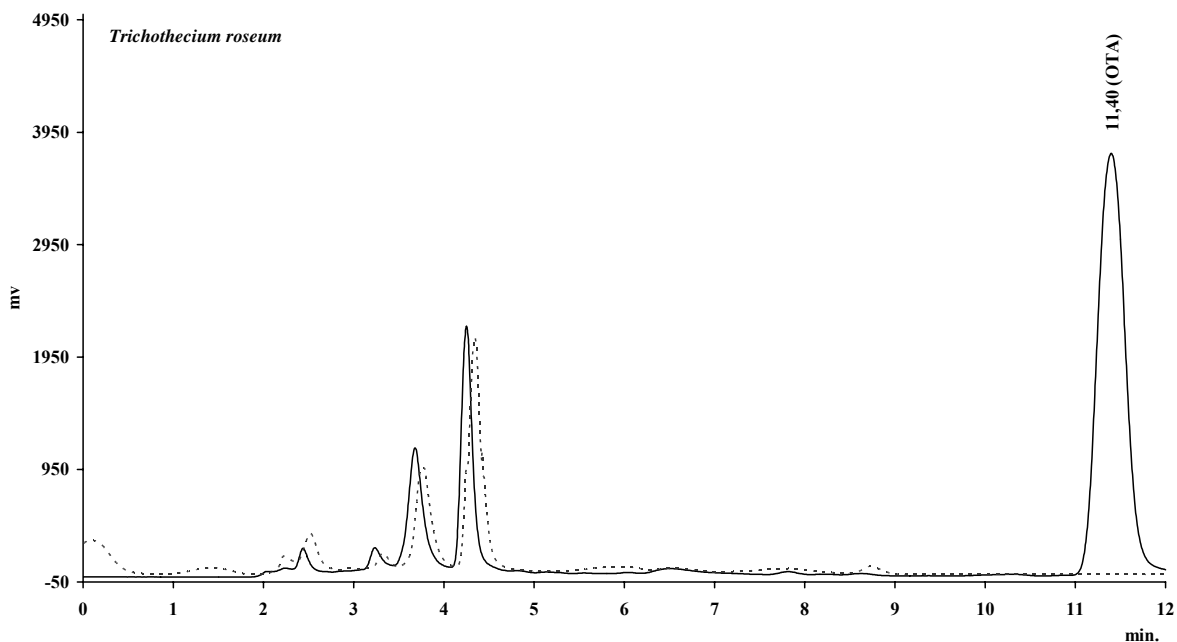


Figura 2.3.30 Cromatogramas de HPLC obtidos com *Trichothecium roseum* 00UTm1 para os meios de cultura: —, YES+OTA e ---, YES.

2.3.2 Biodegradação da ocratoxina A por leveduras

De forma a determinar a eficácia do processo de extracção, extraíram-se, como já descrito, 5 controlos constituídos por 5 mL de meio YPD+OTA. A OTA detectada em cada um deles e as respectivas taxas de recuperação podem ser consultadas na Tabela 2.3.5. A taxa de recuperação média do processo de extracção foi de $100,5 \pm 3,6\%$.

Tabela 2.3.5 OTA detectada nos meios de cultura utilizados para o cálculo das taxas de recuperação

	OTA (μg)	Taxa de recuperação (%)
YPD+OTA controlo 1	2,404	96,2
YPD+OTA controlo 2	2,639	105,6
YPD+OTA controlo 3	2,557	102,3
YPD+OTA controlo 4	2,454	98,2
YPD+OTA controlo 5	2,507	100,3
Média	2,512	100,5
Desvio padrão	0,091	3,6

As taxas de degradação obtidas para cada uma das leveduras testadas estão apresentadas na Figura 2.3.31. Os dados obtidos para cada ensaio e utilizados na sua elaboração podem ser consultados na Tabela A-2.1 no anexo a este capítulo.

As taxas de degradação mais altas foram obtidas com as leveduras *R. minuta* IGC4689, *P. membranifaciens* PL17 e *K. marxianus* IGC3286. Ao fim de dois dias de incubação, estas degradaram respectivamente, 18,7, 17,1 e 17,0% da OTA presente no meio de cultura YPD+OTA. As leveduras que apresentaram as taxas de degradação mais baixas foram as estirpes *S. pasteurianus* IGC4601T e *R. glutinis* IGC4177T. Estas apenas degradaram cerca de 12% da OTA presente no meio de cultura. As leveduras *S. bayanus* IGC4456T, *S. cerevisiae* D35 e *S. cerevisiae* D305 degradaram cerca de 14% da OTA presente no meio de cultura. Finalmente, a estirpe *I. orientalis* PL34 degradou a OTA em 13,4%.

Nas Figura 2.3.32 a 2.3.40 apresentam-se, também, os cromatogramas registados para cada um dos ensaios efectuados. Pode-se observar que em todos eles a OTA não é detectada.

Em resumo, 12 a 19% da OTA presente no meio de cultura YPD+OTA foi degradada pelas leveduras testadas após um período de incubação de 2 dias a 30 °C. É importante salientar que, para cada ensaio, foram extraídos o meio de cultura e a biomassa formada. Nenhum

efeito de adsorção às paredes celulares das leveduras pode, por isso, ter contribuído para a diminuição da OTA presente no meio de cultura.

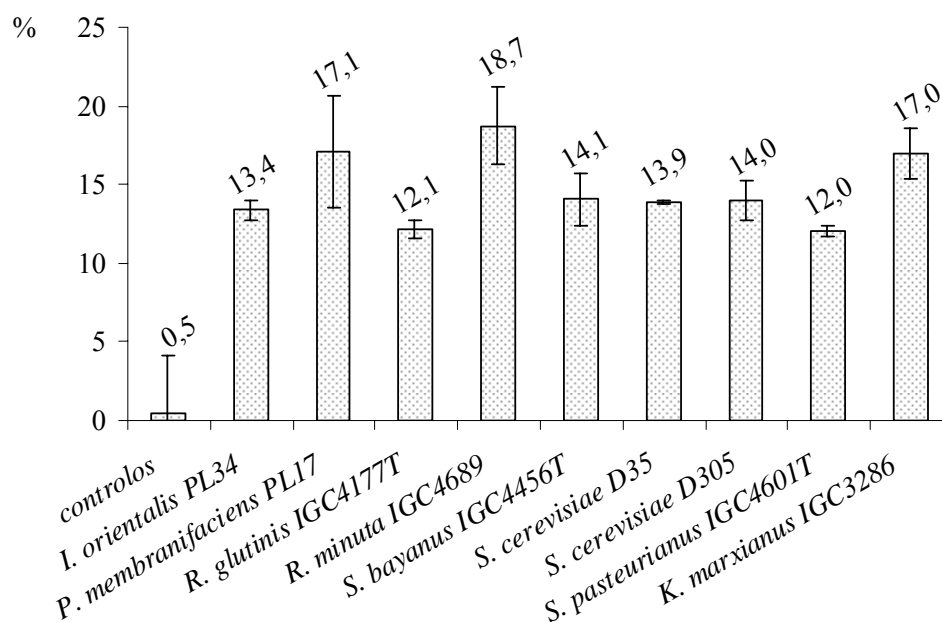


Figura 2.3.31 Taxas de degradação da ocratoxina A com as leveduras testadas. Cada valor representa a média de dois ensaios (5 para os controles) e as barras o respectivo desvio padrão.

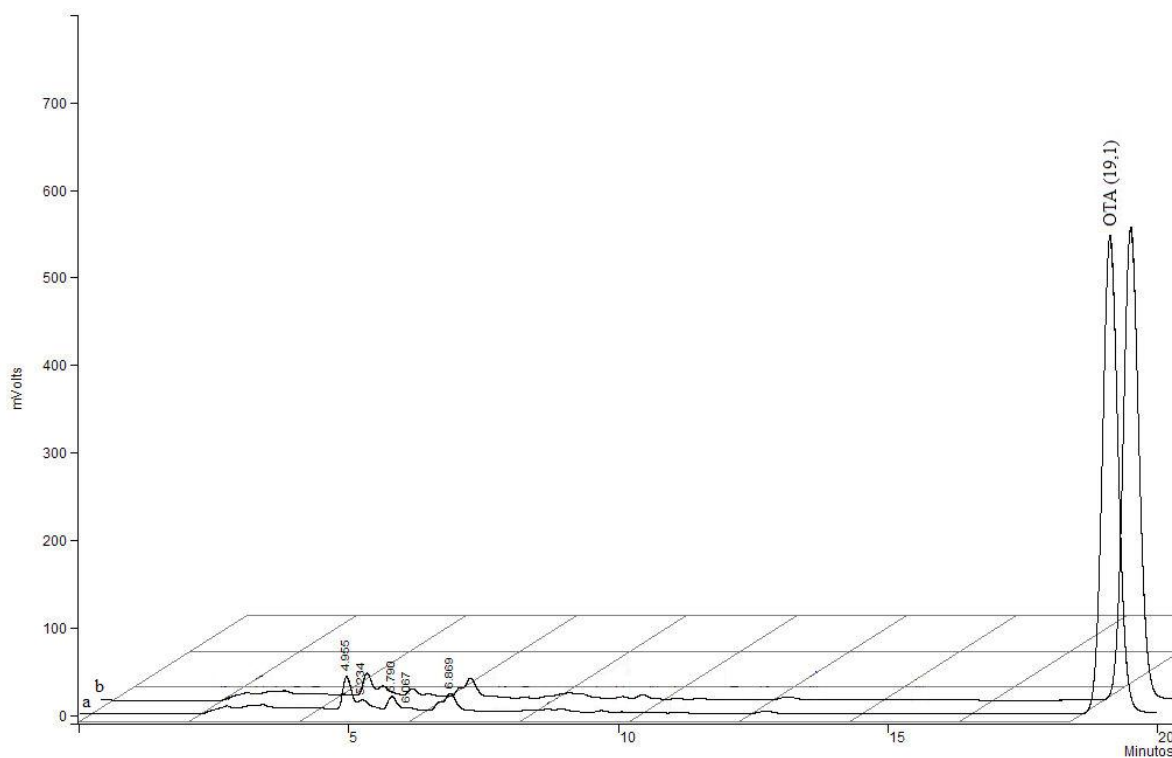


Figura 2.3.32 Cromatogramas de HPLC obtidos com *Issatchenkia orientalis* PL34 quando crescida no meio de cultura YPD+OTA. a) 1ª réplica e b) 2ª réplica.

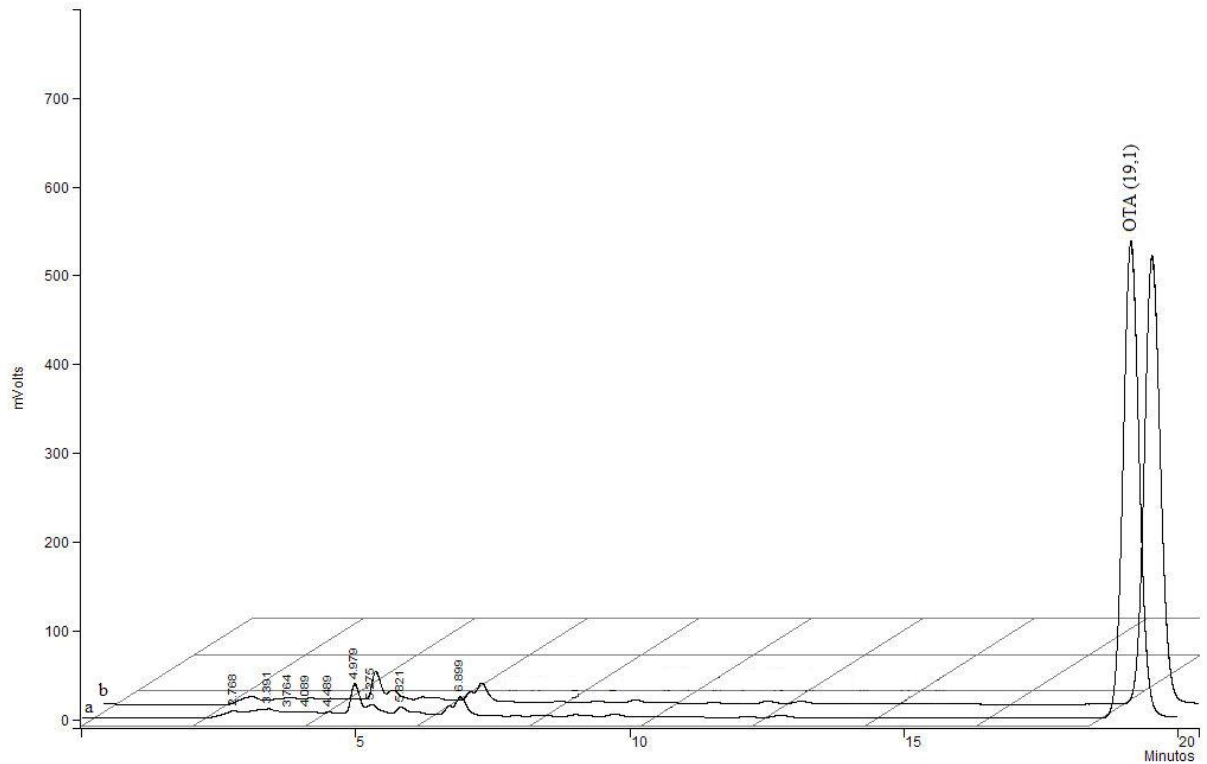


Figura 2.3.33 Cromatogramas de HPLC obtidos com *Pichia membranifaciens* PL17 quando crescida no meio de cultura YPD+OTA. a) 1ª réplica e b) 2ª réplica.

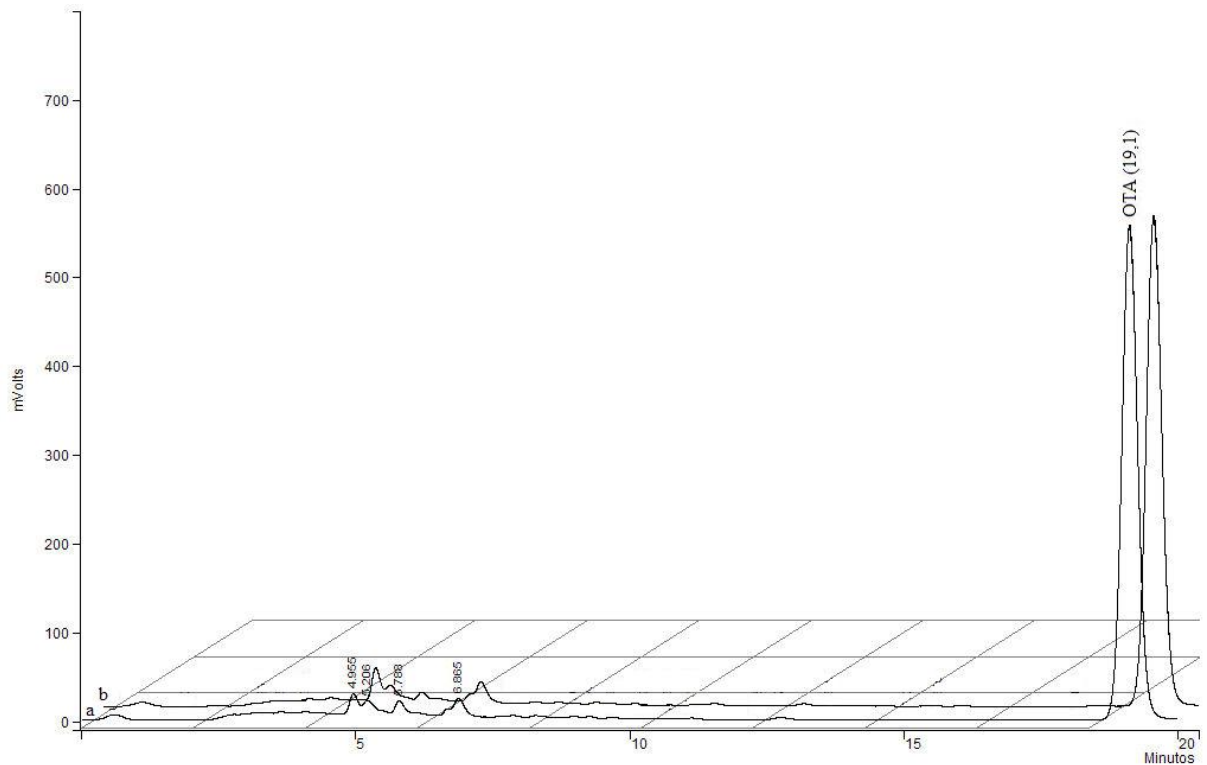


Figura 2.3.34 Cromatogramas de HPLC obtidos com *Rhodotorula glutinis* IGC4177T quando crescida no meio de cultura YPD+OTA. a) 1ª réplica e b) 2ª réplica.

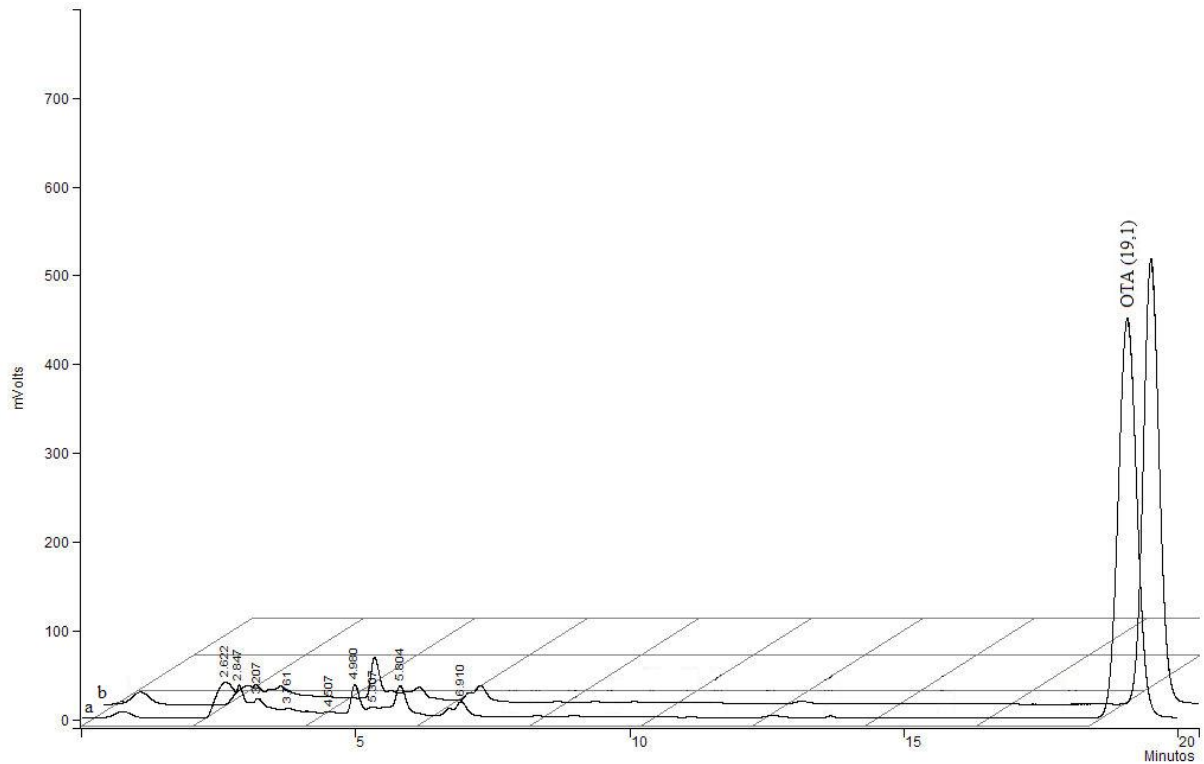


Figura 2.3.35 Cromatogramas de HPLC obtidos com *Rhodotorula minuta* IGC4689 quando crescida no meio de cultura YPD+OTA. a) 1ª réplica e b) 2ª réplica.

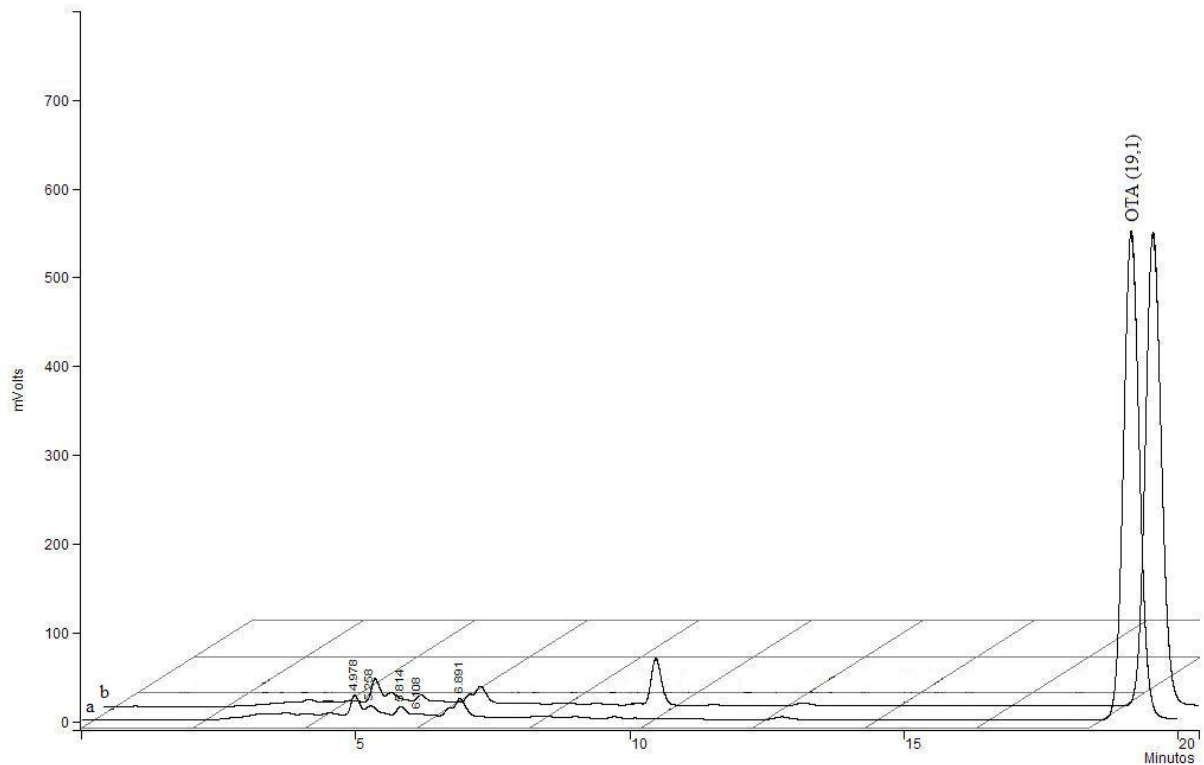


Figura 2.3.36 Cromatogramas de HPLC obtidos com *Saccharomyces bayanus* IGC4456T quando crescida no meio de cultura YPD+OTA. a) 1ª réplica e b) 2ª réplica.

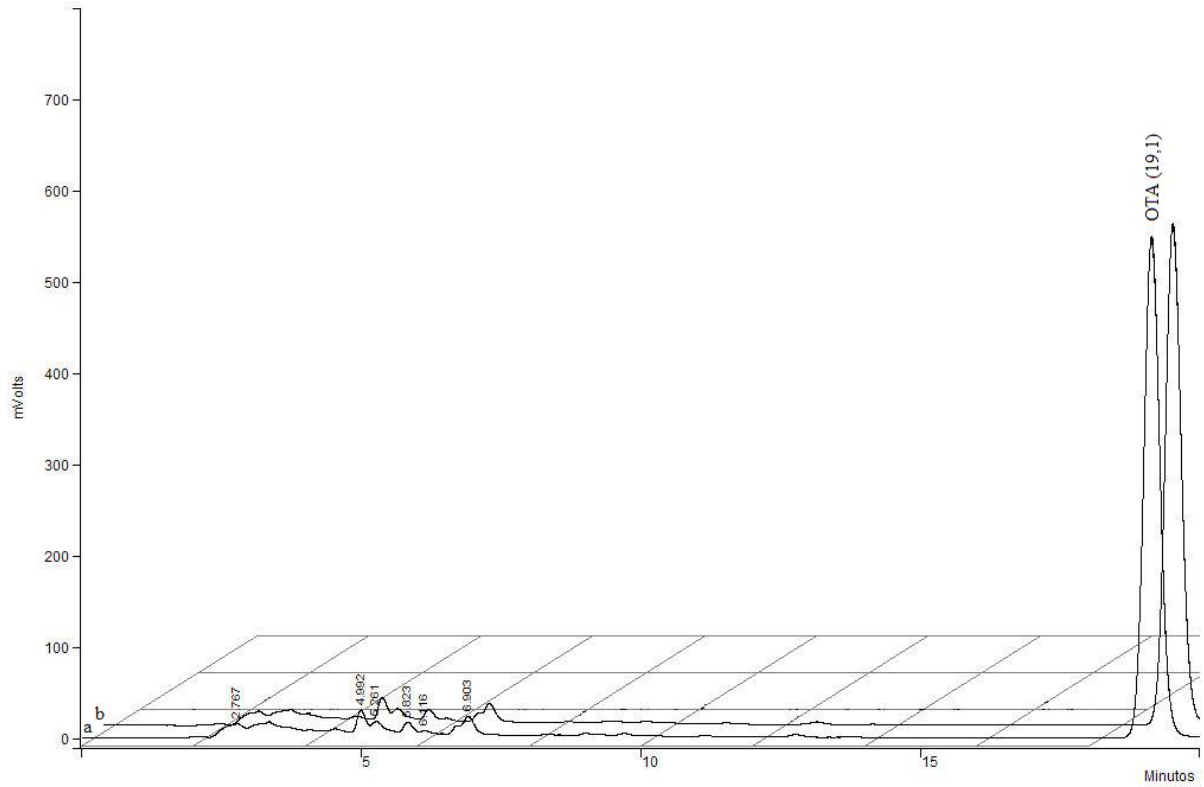


Figura 2.3.37 Cromatogramas de HPLC obtidos com *Saccharomyces cerevisiae* D35 quando crescida no meio de cultura YPD+OTA. a) 1ª réplica e b) 2ª réplica.

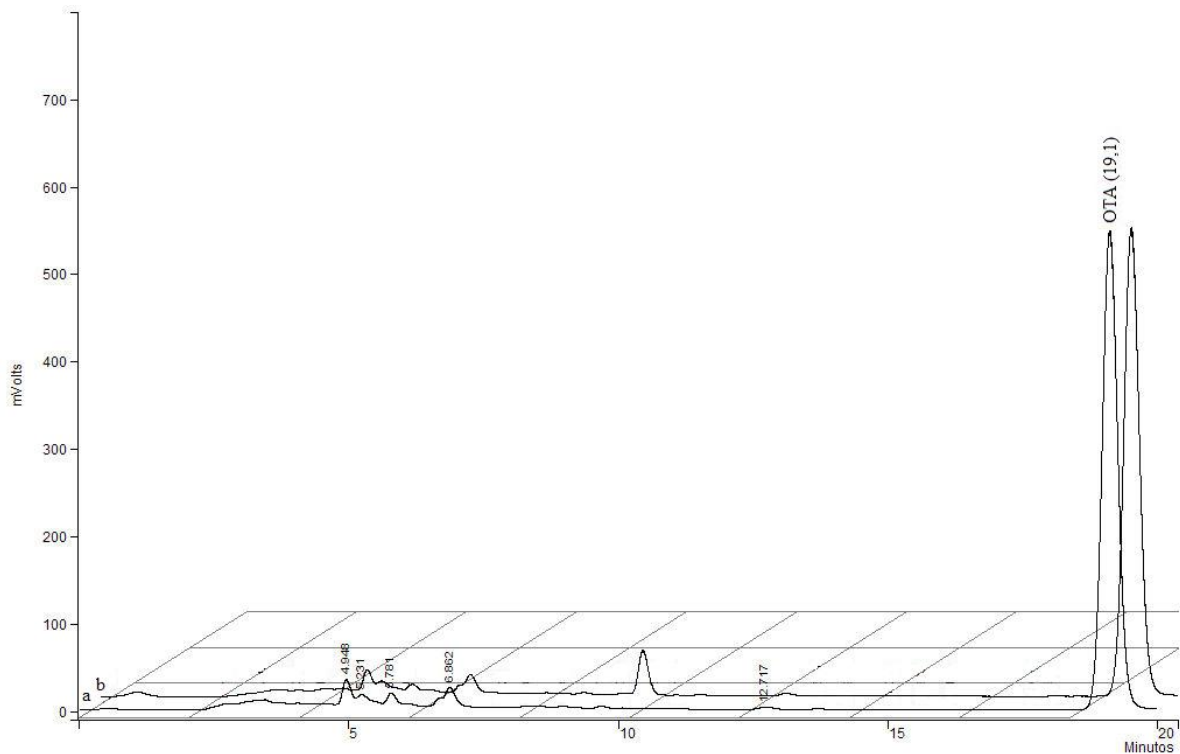


Figura 2.3.38 Cromatogramas de HPLC obtidos com *Saccharomyces cerevisiae* D305 quando crescida no meio de cultura YPD+OTA. a) 1ª réplica e b) 2ª réplica.

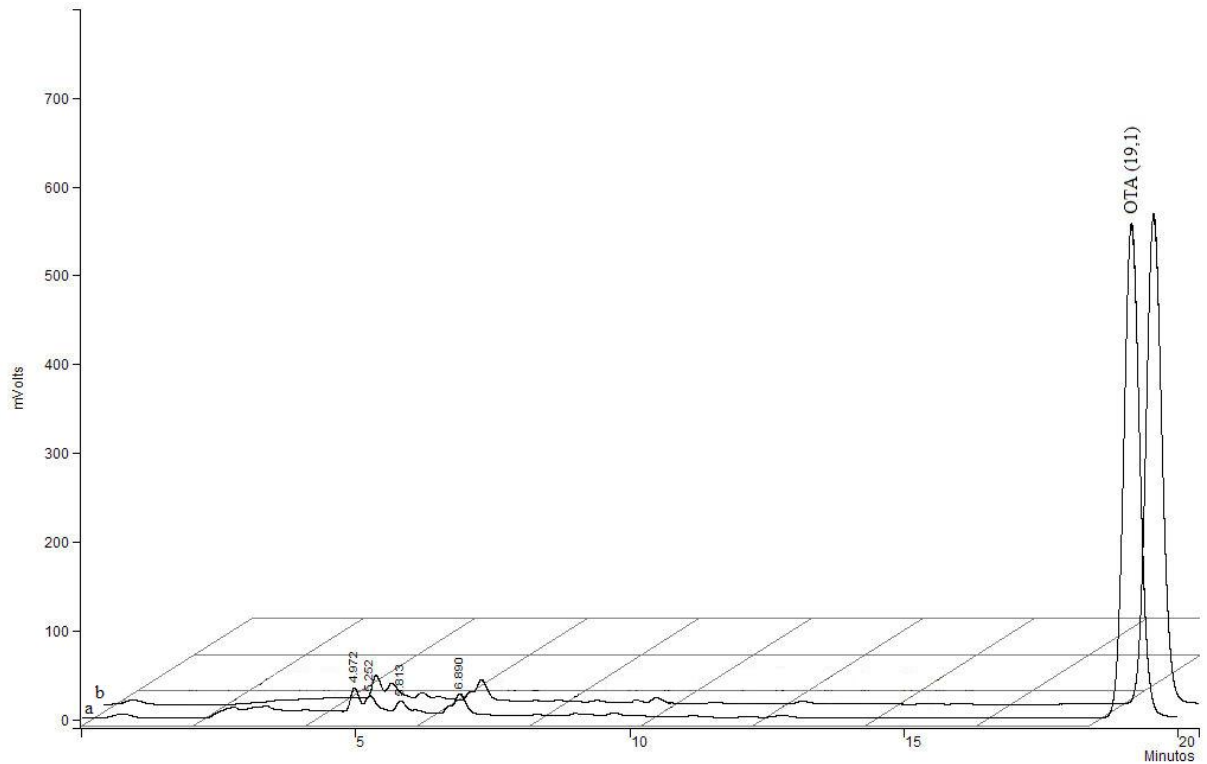


Figura 2.3.39 Cromatogramas de HPLC obtidos com *Saccharomyces pasteurianus* IGC4601T quando crescida no meio de cultura YPD+OTA. a) 1ª réplica e b) 2ª réplica.

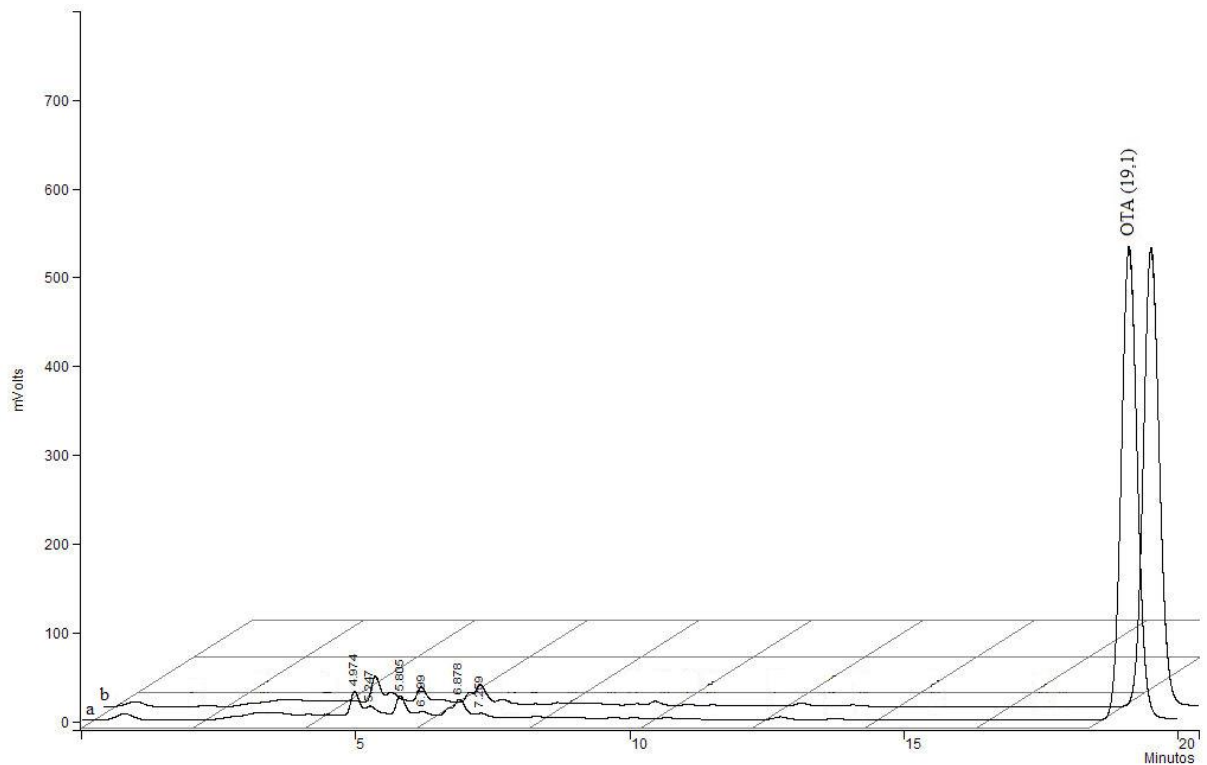


Figura 2.3.40 Cromatogramas de HPLC obtidos com *Kluyveromyces marxianus* IGC3286 quando crescida no meio de cultura YPD+OTA. a) 1ª réplica e b) 2ª réplica.

2.4 Discussão e Conclusão

Setenta e seis estirpes de fungos filamentosos pertencentes a várias espécies e nove leveduras fermentativas foram testadas de forma a verificar a sua capacidade para degradar a OTA.

Observou-se globalmente que 52 estirpes (68% do número total das estirpes testadas) foram capazes de degradar a OTA em mais de 80%. Entre estas podem-se encontrar estirpes pertencentes às espécies *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. foetidus*, *A. ibericus*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. clavatus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *A. wentii*, *Cladosporium* sp., *P. aurantiogriseum* e *P. spinulosum*.

É também importante realçar que 23 estirpes de *A. niger* (85% dos *A. niger* testados) degradaram mais de 95% da OTA presente no meio de cultura e que 7 delas apresentaram a taxa de degradação mais elevada (99,9%) de entre todas as estirpes testadas. Esta espécie foi, claramente, a que melhor degradou a OTA, apesar de outras espécies do grupo dos aspergilli negros terem evidenciado também uma boa capacidade degradativa.

No grupo dos aspergilli negros verificou-se, também, que os isolados ocratoxigénicos foram capazes de degradar a OTA, tendo as estirpes mais produtoras apresentado taxas de degradação mais baixas. Nomeadamente, as estirpes *A. carbonarius* 01UAs178 e 01UAs198 que degradaram respectivamente apenas 60 e 55% da OTA presente no meio de cultura. De realçar que estas foram as estirpes que mais OTA produziram quando crescidas no meio YES (2,547 e 1,337, respectivamente). De forma semelhante, a estirpe *A. niger* 01UAs358, que produziu 1,193 µg de OTA em YES, apresentou a taxa de degradação mais baixa (84,4%) de entre as estirpes de *A. niger* ocratoxigénicas testados.

As estirpes ocratoxigénicas *A. alliaceus* 01UAs62 e *A. ochraceus* 01UAs65 foram as únicas de entre todas as estirpes testadas que não foram capazes de degradar a OTA. Muito pelo contrário, verificou-se que estas estirpes produziram esta micotoxina em ambos os meios de cultura utilizados: respectivamente, 182 e 26 µg em YES, e 172 e 8 µg em YES-OTA.

De forma semelhante ao descrito no presente trabalho, diversas espécies de fungos filamentosos têm sido descritas em várias publicações como sendo capazes de degradar a OTA. Nomeadamente, Varga e co-autores (2000) testaram 70 estirpes de aspergilli (pertencentes a 41 espécies diferentes) e verificaram que três estirpes de *A. fumigatus*, uma de *A. japonicus* e duas de *A. niger* foram capazes de degradar esta micotoxina. Mais tarde, numa

outra publicação, 55 zygomycetes (pertencentes a 9 espécies diferentes) foram testados, tendo os autores verificado que 8 estirpes de *Rhizopus stolonifer*, uma de *R. homothallicus*, 3 de *R. oryzae* e 4 de *Rhizopus* sp. foram também capazes de degradar a OTA (Varga *et al.*, 2005). Mais recentemente, várias estirpes de *A. carbonarius*, *A. japonicus* e *A. niger* foram testadas, tendo os autores verificado, em dois meios de cultura diferentes, que 77 ou 45% dos isolados degradavam mais de 80% da OTA (Bejaoui *et al.*, 2006).

Analisando ainda os resultados dos trabalhos já citados e do presente estudo, verifica-se, que não é possível estabelecer uma relação entre as diferentes espécies e a sua capacidade para degradar a OTA. Por exemplo, no trabalho aqui apresentado, verificou-se que entre as estirpes de *A. flavus* testadas, uma degradou apenas 23% da OTA presente no meio de cultura, enquanto que as outras duas degradaram cerca de 60%. Por outro lado, verificou-se, também, que entre os isolados de *A. carbonarius*, duas das estirpes degradaram apenas 55 e 60% da OTA presente no meio de cultura, enquanto que as outras três degradaram cerca de 93, 94 e 98%. Além do mais, todos os isolados de *A. carbonarius*, *A. flavus*, *A. ochraceus* e *A. versicolor* que testámos foram capazes de degradar a OTA numa maior ou menor extensão; no entanto, Varga e co-autores (2000) não encontraram nenhum isolado pertencente a estas espécies que o tivesse feito. Ao que tudo indica, a capacidade para degradar a OTA parece estar sobretudo associada à estirpe analisada mais do que à espécie em causa.

Neste trabalho, verificaram-se também diferentes perfis de degradação da OTA. Um primeiro, onde se detecta OTa e um composto com tempo de retenção igual a 3,4 min, que não foi possível identificar. Este perfil foi claramente observado nos cromatogramas dos aspergilli negros e de uma forma menos evidente nos cromatogramas das estirpes de *A. fumigatus*, *A. versicolor*, *Cladosporium* sp., *Emericella nidulans* e *Trichoderma* sp. testadas. Um segundo perfil, onde se detectam dois compostos com tempos de retenção de 5,1 e 5,8 min, cuja identificação também não foi possível, e que foram observados no cromatograma da estirpe *A. ochraceus* 01UAs8 e nos cromatogramas das estirpes de *A. wentii* testadas. Com os restantes fungos não se detectaram metabolitos que possam ter resultado da degradação da OTA. É possível que tenha ocorrido, nestes casos, uma metabolização completa da micotoxina ou a sua degradação num composto não fluorescente, impossível por isso de detectar com o detector de fluorescência utilizado.

Os fungos que menos OTA degradaram foram *Trichoderma* sp., *Trichothecium roseum*, *A. flavus* 01UAs1, *Rhizopus* sp. e *Mucor* sp. que apresentaram, respectivamente, taxas de

degradação de 14,8, 19,1, 23,0, 26,9 e 32,8%; e as leveduras testadas, que apresentaram taxas de degradação entre os 12 e os 18,7%.

Entre as leveduras testadas, as taxas de degradação mais baixas foram obtidas com a estirpe *S. pasteurianus* IGC4601T e *R. glutinis* IGC4177T (12%) e as mais altas com as estirpes *R. minuta* IGC4689, *P. membranifaciens* PL17 e *K. marxianus* IGC3286 (18,7, 17,1 e 17,0%, respectivamente). Nestes ensaios, nenhum efeito de adsorção às paredes celulares das leveduras pode ter influenciado e contribuído para a redução da OTA, uma vez que o meio de cultura e a biomassa foram extraídos em conjunto. É importante salientar este facto, uma vez que publicações recentes descrevem leveduras (*e.g.* *S. cerevisiae* e *S. bayanus*) e seus derivados (*e.g.* paredes celulares, β -glucanos e manoproteínas) como capazes de adsorver esta micotoxina (Bejaoui *et al.*, 2004; Ringot *et al.*, 2005; Caridi, 2006a; Ringot *et al.*, 2007) e de, por exemplo, contribuírem para a sua remoção em vinhos (Moruno *et al.*, 2005; Cecchini *et al.*, 2006). Adicionalmente, é importante referi-lo porque nenhum metabolito (*e.g.* OT α) foi detectado nos cromatogramas referentes a estes ensaios de forma a comprovar a degradação da OTA. Muito provavelmente, a OTA em falta foi completamente metabolizada pelas leveduras. Como já vimos na introdução geral, algumas publicações descrevem a capacidade de certas leveduras para degradarem a OTA. A mais recente descreve que a levedura *Phaffia rhodozyma* CBS 5905 degradou mais de 90% da OTA presente no meio de cultura utilizado após 15 dias a 20 °C (Peteri *et al.*, 2007). Outras descrevem um isolado de *Trichosporon* sp. como sendo capaz de degradar 80 a 100% da OTA presente no meio de cultura após 2,5 a 5 horas de incubação a 25 °C (Schatzmayr *et al.*, 2003).

Em conclusão, verificou-se com este trabalho que existe uma grande variedade de espécies de fungos, filamentosos e unicelulares, que são capazes de degradar a OTA. Verificou-se, também, que certas espécies utilizam vias de degradação diferentes. No entanto, a maioria dos fungos testados degradou a OTA através da hidrólise da ligação amida que liga a OT α à L- β -fenilalanina, sugerindo a actuação de uma carboxipeptidase. Como já foi descrito na introdução, algumas enzimas são efectivamente capazes de hidrolisar esta ligação. Nomeadamente, a carboxipeptidase A (Pitout, 1969) e uma lipase de *A. niger* (Stander *et al.*, 2000). Além do mais os fungos são, como já vimos, excelentes produtores de enzimas hidrolíticas entre os quais diversas carboxipeptidases, como, por exemplo, carboxipeptidases ácidas produzidas por *A. niger* (Ichishima *et al.*, 1973) ou a carboxipeptidase Y produzida por *S. cerevisiae* (Rao *et al.*, 1998). Os resultados do presente trabalho levaram-nos a crer que seria possível isolar, a partir de uma das estirpes de *A. niger* testadas, o enzima responsável

pela hidrólise da OTA, de forma a caracteriza-lo e a avaliar a sua possível utilização em processos de descontaminação alimentar. Por outro lado, pretendia-se verificar se a carboxypeptidase Y poderia ser capaz de degradar a OTA, uma vez que esta é produzida por algumas leveduras, de forma a procurarmos explicar a degradação observada com as leveduras testadas.

O capítulo III desta dissertação aborda o trabalho desenvolvido nesse sentido.

Capítulo III

Degradação enzimática da ocratoxina A

3.1 Introdução

A ocratoxina A é constituída por duas sub-moléculas, a ocratoxina α e a L- β -fenilalanina, que se encontram ligadas entre si por uma ligação amida idêntica às ligações estabelecidas entre os aminoácidos das proteínas. Sendo assim, certas hidrolases, como por exemplo a carboxipeptidase A, são capazes de quebrar essa ligação separando as duas sub-unidades que a constituem. Quando a OTA é hidrolisada desta forma, pode-se considerar que ocorre um processo de destoxificação, uma vez que a OT α e a L- β -fenilalanina não possuem, ao contrário da OTA, efeitos tóxicos relevantes.

Com o trabalho descrito neste capítulo procurou-se encontrar um enzima que fosse capaz de hidrolisar a OTA a pH ácido e que pudesse vir a ser aplicada no processo de fabrico de alguns alimentos onde esta micotoxina surge com alguma frequência, como, por exemplo, o vinho. Para tal:

- testaram-se alguns preparados enzimáticos comerciais com o objectivo de verificar a sua capacidade de hidrólise da OTA;
- produziu-se, isolou-se e purificou-se, a partir de uma das estirpes de *A. niger* testadas no capítulo anterior, o enzima responsável pela biodegradação da OTA;
- testou-se a actividade de alguns destes enzimas em mostos contaminados com OTA de forma a verificar se poderiam contribuir para a redução dos níveis de OTA presentes.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Degradação da ocratoxina A por acção de enzimas comerciais

3.2.1.1 Enzimas comerciais

Foram testados diversos preparados proteolíticos produzidos, essencialmente, a partir de fungos filamentosos e utilizados na indústria alimentar. Testaram-se também alguns preparados enzimáticos utilizados em enologia e três carboxipeptidases - a carboxipeptidase Y (CPY), a carboxipeptidase P (CPP) e a carboxipeptidase A (CPA). Esta última foi utilizada como controlo positivo uma vez que a sua acção hidrolítica sobre a OTA é conhecida (Pitout, 1969). As principais características dos enzimas testados estão sumariadas na Tabela 3.2.1.

3.2.1.2 Soluções tampão

Utilizou-se tampão citrato (50 mM, a pH 3,0), tampão citrato/fosfato (50 mM, a pH 3,6; 4,6; 5,6 e 6,6), tampão fosfato (100 mM, a pH 7,5), tampão Tris (50 mM, a pH 8,5) e tampão carbonato/bicarbonato (50 mM, a pH 10,0) (Stoll & Blanchard, 1990). Os reagentes utilizados na preparação destas soluções tampão foram adquiridos à Merck. As soluções tampão foram suplementadas com 0,1% de azida sódica (Sigma) para evitar contaminações biológicas.

Tampão citrato	0,1 M ácido cítrico	465 mL			
	0,1 M $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$	35 mL			
	H_2O_{dd}	500 mL			
	pH	3,0			
Tampão citrato/fosfato	0,1 M ácido cítrico	339 mL	267 mL	210 mL	136 mL
	0,2 M $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	161 mL	233 mL	290 mL	364 mL
	H_2O_{dd}	500 mL	500 mL	500 mL	500 mL
	pH	3,6	4,6	5,6	6,6
Tampão fosfato	0,2 M KH_2PO_4	80 mL			
	0,2 M $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	420 mL			
	H_2O_{dd}	500 mL			
	pH	7,5			
Tampão Tris	0,2 M Tris	250 mL			
	0,2 M HCl	61 mL			
	H_2O_{dd}	689 mL			
	pH	8,5			
Tampão carbonato/bicarbonato	0,2 M Na_2CO_3	137,5 mL			
	0,2 M $NaHCO_3$	112,5 mL			
	H_2O_{dd}	750 mL			
	pH	10,0			

Tabela 3.2.1 Principais características dos preparados enzimáticos e das carboxipeptidases testadas

Nome comercial	Origem	Actividade	pH / T (°C) óptimos	Comercialização
Protease A	<i>Aspergillus niger</i>	Protease ácida	3,0 / 55	Amano Inc.
Protease II	<i>Rhizopus</i> sp.	Protease ácida	3,0 / 50	Amano Inc.
Prolyve PAC	<i>Aspergillus niger</i>	Protease ácida	2,5-3,0 / 55	Lyven
Prolyve BS	<i>Bacillus subtilis</i>	Metalprotease neutral (EC 3.4.24.28)	6,5-7,5 / 50	Lyven
Prolyve NP CONC	<i>Aspergillus oryzae</i>	Protease neutral	7,0 / 50	Lyven
Prolyve 1000	<i>Bacillus licheniformis</i>	Serina protease alcalina (EC 3.4.21.14)	9,0-10,5 / 55-60	Lyven
Papain powder PNS800	<i>Carica papaya</i>	Cisteína protease (EC 3.4.22.2)	4,8-6,2 / 40	Enzybel S.A.
Pancreatin	Pâncreas suíno	Protease, amilase e lipase	7,5-8,0 / 40	Biocatalysts
Lallzyme CB	-	Pectinase e glucosidase	-	Lallemand
Lallzyme β	-	Pectinases com β-glucosidase, ramnosidase, apiosidase e arabinofuranosidase	-	Lallemand
Lallzyme HC	-	Pectinase muito concentrada	-	Lallemand
Lallzyme MMX	-	Pectinase e β-glucanase	-	Lallemand
Carboxipeptidase Y	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Serina carboxipeptidase (EC 3.4.16.1)	6,75 / 25	C-3888, Sigma
Carboxipeptidase P	<i>Penicillium janthinellum</i>	Pro-X carboxipeptidase (EC 3.4.17.16)	3,7 / 30	21946, Fluka
Carboxipeptidase A	Pâncreas bovino	Metalcarboxipeptidase (EC 3.4.17.1)	7,5 / 25	C-9268, Sigma

- Informação não disponível.

3.2.1.3 Preparação de soluções tampão com OTA

Para testar a actividade hidrolítica dos preparados enzimáticos, prepararam-se soluções tampão com 1 µg/mL de ocratoxina A (Sigma) a pH 3,0; 3,6; 4,6; 5,6; 6,6; 7,5; 8,5 e 10,0, utilizando as soluções tampão descritas acima. Para tal, 10 µg de OTA (400 µL de *stock* a 25 µg/mL em tolueno/ácido acético (99:1, v/v)) foram evaporadas em frascos de 10 mL, a 50 °C, com a ajuda de uma ligeira corrente de azoto (heating module reacti-therm, Pierce) e ressuspendidas em 10 mL de cada solução tampão. Para solubilizar bem a OTA nas diversas soluções tampão, utilizou-se um banho de ultrasons (Sonicor), durante 30 min à temperatura ambiente.

3.2.1.4 Avaliação da actividade hidrolítica

Ensaio de degradação a pH 3,0; 5,6; 7,5; 8,5 e 10,0 foram preparados, dissolvendo os preparados enzimáticos em 1 mL das respectivas soluções tampão com OTA. Utilizaram-se 10 mg de Protease A, Protease II, Prolyve PAC, Prolyve BS, Prolyve NP CONC, Papain powder PNS800, Pancreatin 4XNF-P211P, Lallzyme CB, Lallzyme β, Lallzyme HC e Lallzyme MMX; e 100 µL de Prolyve 1000. Após uma breve agitação, utilizando o vortex (autovortex SA6, Stuart scientific), os ensaios foram incubados a 37 °C (Lab-therm, Kühner) e amostras de 20 µL foram recolhidas decorridas 0, 3, 6, 9, 15 e 25 horas de reacção. Estas foram imediatamente diluídas em 980 µL de fase móvel de HPLC e mais tarde filtradas por um filtro de seringa acrodisc GHP de 0,45 µm (Gelman) de forma a serem analisadas por HPLC para quantificar a OTA e OTα presentes. Utilizando o mesmo procedimento, realizaram-se ensaios com 0,5 mg/mL de CPA (50 µL de *stock* a 10 mg/mL em tampão fosfato a 100 mM e pH 7,5) e ensaios sem nenhum enzima, que constituíram, respectivamente, os controlos positivos e negativos da experiência.

Prepararam-se, da mesma forma, ensaios com 0,1 mg de CPY e de CPP (50 µL de *stock* a 2 mg/mL em tampão citrato/fosfato a 50 mM e pH 5,6) a pH 3,6; 4,6; 5,6 e 6,6. Incubaram-se a 37 °C e recolheram-se amostras de 20 µL decorridas 0, 3, 6, 9, 15 e 25 horas de reacção. O tempo de incubação dos ensaios com CPY foi prolongado, tendo-se recolhido amostras adicionais de 20 µL às 48, 78, 96 e 120 horas de reacção. Todas as amostras recolhidas foram processadas como referido atrás de forma a quantificar a OTA e OTα por HPLC.

3.2.1.5 Quantificação da OTA e OTα por HPLC

Utilizou-se um sistema de HPLC constituído por uma bomba Varian 9002, um detector de fluorescência Jasco FP-920 ($\lambda_{\text{ex}} = 333 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$) e um amostrador automático

Marathon Basic. Utilizou-se uma coluna C₁₈ de fase reversa YMC-Pack ODS-AQ (250 x 4,6 mm e 5 µm), protegida por uma pré-coluna com o mesmo enchimento e mantida a 30 °C. Esta coluna, ao contrário da coluna C₁₈ que é tradicionalmente utilizada, permitiu separar melhor a OTα de algumas impurezas, de forma a ser correctamente quantificada. A fase móvel, acetonitrilo/H₂O/ácido acético (99:99:2, v/v/v), foi filtrada utilizando um filtro de 0,2 µm (GHP, Gelman) e desgaseificada. Utilizou-se um caudal de 0,8 mL/min e um volume de injeção de 100 µL. Elaboraram-se, regularmente, curvas de calibração com padrões de OTA com 0,05; 0,1; 1,0; 10,0 e 20,0 ng/mL como descrito no capítulo 2. A ocratoxina α foi identificada utilizando os ensaios de degradação feitos com a CPA e quantificada em equivalentes de ocratoxina A.

3.2.1.6 Determinação da actividade enzimática

Uma unidade de actividade hidrolítica sobre a OTA (U) foi definida como a produção de 1 ng/min de OTα a 37 °C. Esta foi calculada utilizando a quantidade de OTα detectada ao fim de 3 horas de incubação ao pH óptimo para cada um dos enzimas. A actividade específica foi expressa em unidades de actividade por mg de proteína (U/mg).

3.2.1.7 Efeito de inibidores na actividade hidrolítica dos enzimas comerciais

Os preparados enzimáticos que evidenciaram actividade hidrolítica sobre a OTA e a CPA foram testados na presença de EDTA, inibidor específico de metaloproteases, e de PMSF, inibidor específico de serina proteases (Rao *et al.*, 1998). A Protease A, a Pancreatin e a CPA foram testadas a pH 7,5 e a Prolyve PAC a pH 3,0. Para tal prepararam-se, como já descrito, soluções com OTA a pH 7,5 e 3,0, com 10 mM de EDTA (Merck) ou 1 mM de PMSF (10 µL de *stock* a 0,1 M em metanol, Sigma). Dissolveram-se 10 mg dos preparados enzimáticos ou 0,5 mg de CPA em 1 mL das respectivas soluções e incubaram-se a 37 °C. Recolheram-se amostras de 20 µL decorridas 0, 3, 6, 9, 15 e 25 horas de reacção, que foram processadas como referido atrás para quantificar a OTA e OTα por HPLC. A percentagem de inibição da actividade enzimática foi calculada utilizando a concentração de OTα detectada ao fim de 25 horas de reacção nos ensaios realizados com e sem inibidor e utilizando a equação 3.1.

$$\text{inibição} = 100 - \left(\frac{\text{OT}\alpha_{(\text{inibidor})} \times 100}{\text{OT}\alpha_{(\text{sem inibidor})}} \right) \quad (\text{eq. 3.1})$$

3.2.1.8 Avaliação da actividade hidrolítica a 50 °C

Avaliou-se também a actividade da Protease A, da Prolyve PAC, da Pancreatin e da CPA a 50 °C. Prepararam-se ensaios a pH 7,5 para Protease A, Pancreatin e CPA, e a pH 3,0 para

Prolyve PAC, como referido no ponto 3.2.1.4, e incubaram-se a 50 °C. Recolheram-se amostras de 20 µL decorridas 0, 3, 6, 9 e 15 horas de reacção e processaram-se como já referido para quantificar a OTA e OTα por HPLC.

3.2.2 Degradação da ocratoxina A por acção de um enzima isolado a partir de *Aspergillus niger* MUM 03.58

3.2.2.1 Material biológico

Utilizou-se a estirpe não produtora de ocratoxina A, *Aspergillus niger* MUM 03.58 e a estirpe produtora de ocratoxina A, *A. alliaceus* MUM 03.55. Estas estirpes foram isoladas a partir de uvas, identificadas e caracterizadas por Serra *et al.* (2003).

3.2.2.2 Soluções tampão

Utilizou-se uma solução de extracção constituída por tampão citrato/fosfato (50 mM a pH 5,6) suplementada com 0,24 mM de Triton X-100 (Sigma) e 0,1% de azida sódica. Utilizaram-se as soluções tampão a pH 3,0; 5,6; 7,5; 8,5 e 10,0 descritas na secção 3.2.1.2.

3.2.2.3 Preparação do inóculo

As estirpes utilizadas foram inicialmente crescidas em tubos de greiner de 15 mL com o meio de cultura MEA durante 7 dias a 25 °C no escuro. A partir desta, prepararam-se suspensões de esporos para serem utilizadas com inóculo. Para tal, adicionou-se aos tubos de greiner 4 mL de solução de peptona (0,1% de peptona e 0,001% de Tween 80), homogeneizou-se utilizando o vortex durante 1 min e transferiram-se as suspensões para tubos estéreis novos.

MEA	Extracto de Malte	20 g/L
(formulação de Blakeslee)	Glucose	20 g/L
	Peptona	1 g/L
	Agar (Oxoid N° 3)	20 g/L

3.2.2.4 Preparação dos meios de cultura para a produção do enzima

Utilizou-se um meio de germen de trigo (GT) composto por 30 g de germen de trigo dextrinado (Cem Porcento®), humedecidos com 13,5 mL de água destilada em matrizes de 500 mL e autoclavado a 121 °C durante 15 min (uniclave 88, AJC). Utilizaram-se também duas modificações do meio GT de forma a verificar se a ocratoxina A induzia a produção do enzima em quantidades suficientes que permitissem a sua detecção e isolamento. Elaborou-se,

portanto, um meio enriquecido com ocratoxina A (GT-OTA) e, como controlo, um meio enriquecido apenas com biomassa fúngica (GT-niger). Para elaborar GT-OTA, inoculou-se o meio GT com 1 mL da solução de esporos da estirpe *A. alliaceus* MUM 03.55, incubou-se no escuro a 25 °C (incubator, Sanyo) durante 16 dias para permitir o crescimento do fungo bem como a produção de OTA e autoclavou-se a 121 °C durante 15 min. Para elaborar GT-niger, procedeu-se da mesma forma utilizando neste caso a solução de esporos da estirpe *A. niger* MUM 03.58 para inocular o meio GT. Procurou-se desta forma obter um meio de cultura sem OTA mas onde previamente tivesse crescido um fungo filamentoso, tal como em GT-OTA, de forma a ser utilizado como seu controlo.

3.2.2.5 Inoculação e condições de incubação para a produção do enzima

Foram inoculados matrazes com meio GT, GT-OTA e GT-niger, utilizando 1 mL da solução de esporos da estirpe *A. niger* MUM 03.58 e incubados no escuro a 25 °C durante 10 dias para permitir o crescimento do fungo e a produção do enzima.

3.2.2.6 Preparação dos extractos enzimáticos de *A. niger*

Procedeu-se da seguinte forma para cada um dos meios de cultura onde cresceu o *A. niger*. Adicionaram-se 100 mL de solução de extracção fria, quebrou-se o substrato finamente com a ajuda de uma espátula e deixou-se em agitação magnética durante 2 horas a 4 °C (Selecta asinoro). O homogeneizado assim obtido foi filtrado e espremido através de uma rede de nylon de forma a separar a fracção líquida da fracção sólida. A fracção líquida foi centrifugada a 604 RCF durante 10 min a 4 °C (4K15, Sigma) e o sobrenadante filtrado por papel de filtro (500-A, la papelera del besós, S.a.). Deste filtrado guardou-se uma amostra de 0,5 mL a 4 °C para quantificar a proteína e a actividade hidrolítica. De seguida, o filtrado foi congelado a -80 °C (Ultra-low, Sanyo) e liofilizado (Christ alfa 2-4, B. Braun Biotech international). O liofilizado foi ressuscitado em 10 mL de tampão fosfato frio (100 mM, a pH 7,5) e 20 mL de acetona fria foram-lhe adicionados. Após uma breve agitação colocou-se no congelador durante 30 min de forma a permitir a precipitação da fracção proteica. De seguida, a amostra foi centrifugada (12225 RCF durante 15 min a 4 °C), o sobrenadante descartado e o pellet lavado com 10 mL de acetona fria. Após uma nova centrifugação às condições anteriores, e depois de descartar novamente o sobrenadante, o pellet foi deixado secar ao ar antes de ter sido ressuscitado em 10 mL de tampão fosfato (100 mM a pH 7,5). Os extractos enzimáticos obtidos foram mantidos a 4 °C e o seu conteúdo em proteína quantificado.

3.2.2.7 Quantificação da proteína

Para quantificar a proteína das amostras utilizou-se o método de Bradford (Bradford, 1976) tendo-se procedido da seguinte forma. Diluíram-se as amostras na proporção (1:10) utilizando tampão fosfato (100 mM, a pH 7,5). Prepararam-se soluções padrão de albumina de soro bovino (Sigma) com 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg/mL utilizando o mesmo tampão fosfato. Adicionaram-se, numa microplaca de 96 poços e em quadruplicado, 10 μ L de cada amostra diluída a 290 μ L de reagente de Bradford misturando bem com a ponta da micropipeta. Procedeu-se da mesma forma com cada uma das soluções padrão, de forma elaborar uma curva de calibração, e com a solução de tampão fosfato (100 mM a pH 7,5) para constituir os brancos. Deixou-se repousar à temperatura ambiente durante 20 min e registou-se a absorvência a 595 nm utilizando um espectrofotómetro para microplacas (Synergy HT, Bio-Tek). Representou-se graficamente a concentração de proteína das soluções padrão em função da absorvência registada e obteve-se uma curva de calibração por regressão linear dos dados a partir da qual se calculou a concentração de proteína presente nas amostras.

Reagente de Bradford	Coomassie blue G250	100 mg
	Etanol	50 mL
	Ácido fosfórico (85%)	100 mL
	H ₂ O _{ad} (perfazer)	1000 mL
	(Filtrar por papel de filtro)	

3.2.2.8 Detecção da actividade hidrolítica sobre a OTA

Utilizaram-se soluções com 1 μ g/mL de OTA a pH 3,0; 5,6; 7,5; 8,5 e 10,0, elaboradas como descrito na secção 3.2.1.3, para avaliar a actividade hidrolítica dos extractos enzimáticos produzidos. Prepararam-se e incubaram-se a 37 °C ensaios de degradação constituídos por 980 μ L de solução de OTA e 20 μ L de extracto enzimático. Recolheram-se amostras de 20 μ L às 0, 3, 6, 9, 15 e 25 horas de reacção que foram imediatamente dissolvidos em 980 μ L de fase móvel de HPLC. Estas amostras foram filtradas e analisadas por HPLC como descrito anteriormente. Ensaios de degradação com 0,5 mg/mL de CPA foram também realizados como controlos positivos e ensaios sem nenhum enzima como controlos negativos.

3.2.2.9 Determinação da actividade enzimática

Uma unidade de actividade hidrolítica sobre a OTA (U) foi definida como a produção de 1 ng/min de OT α a pH 7,5 e 37 °C. Esta foi calculada utilizando a quantidade de OT α

detectada ao fim de 3 horas de incubação nessas condições. A actividade específica foi expressa em unidades de actividade por mg de proteína (U/mg).

3.2.2.10 Purificação do extracto de GT-OTA por cromatografia de troca aniónica

Preparou-se uma coluna de cromatografia (1,0 x 4,0 cm) com a resina aniónica Macro-Prep High Q (Biorad). Diluiu-se o extracto enzimático produzido a partir do meio de cultura GT-OTA de forma a ficar com 1 mg/mL de proteína e injectaram-se 0,2 mL na coluna previamente equilibrada com tampão fosfato (100 mM a pH 7,5). Eluiu-se com um gradiente de NaCl a 1,0 M em 60 minutos e a um caudal de 0,5 mL/min, ver Figura 3.3.8 na página 101. Recolheram-se fracções de 1 mL a cada 2 min e quantificou-se a proteína total como descrito acima. Determinou-se, também, a actividade hidrolítica sobre a OTA em cada uma das fracções. Para tal, adicionou-se 1 µg de OTA (20 µL de *stock* a 50 µg/mL em tampão fosfato, 100 mM a pH 7,5) a cada uma das fracções e após 3 horas a 37 °C quantificou-se a OTA e OTα por HPLC, como descrito atrás. O sistema de FPLC utilizado era constituído por duas bombas Pharmacia LKB P-500 e um controlador LCC-500 plus, acoplados a um detector Diode Array Merck-Hitachi L-7455. A proteína eluída foi monitorizada por absorvência a 280 nm.

3.2.2.11 Efeito de inibidores na actividade hidrolítica sobre a OTA

O efeito dos inibidores EDTA e PMSF na actividade do extracto enzimático produzido a partir do meio de cultura GT-OTA foi testado. Prepararam-se, como já descrito, soluções com OTA a pH 7,5 com 10 mM de EDTA, 1 mM de PMSF e sem nenhum inibidor. Ensaios de degradação constituídos por 980 µL destas soluções com OTA e 20 µL de extracto enzimático foram preparados e incubados a 37 °C durante um dia. As amostras foram processadas como já descrito para quantificar a OTA e OTα presentes ao fim de 0, 3, 6, 9, 15 e 25 horas de reacção. As percentagens de inibição da actividade foram calculadas como já referido no ponto 3.2.1.7.

3.2.2.12 Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos do extracto enzimático produzido a partir do meio de cultura GT-OTA foram determinados. Prepararam-se ensaios de degradação com 0,01; 0,1; 0,3; 0,6 e 1,3 mg OTA/mL em tampão fosfato (100 mM a pH 7,5) e 0,01 mg/mL de extracto enzimático de GT-OTA. Incubaram-se a 37 °C e recolheram-se amostras de 20 µL aos 0, 15, 30, 45 e 60 min de reacção para serem processadas como já descrito atrás de forma a quantificar a OTA e OTα presentes em cada uma delas. As velocidades iniciais de reacção (V_0) foram

determinadas por regressão linear da representação gráfica da concentração de OT α em função do tempo. A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima da reacção (V_{max}) foram determinadas por regressão não linear e ajuste dos dados à equação de Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{max} \times [S]}{[S] + K_m} \quad (\text{eq. 3.2})$$

utilizando o programa informático - GraphPad Prism version 4.00 for Windows, GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA, e pelos métodos de representação linear de Lineweaver-Burk e de Hanes-Woolf.

3.2.3 Degradação da ocratoxina A em mostos

3.2.3.1 Material biológico

Utilizou-se a estirpe produtora de ocratoxina A, *Aspergillus carbonarius* MUM 03.59.

3.2.3.2 Enzimas

Utilizaram-se os preparados enológicos Lallzyme HC, Lallzyme CB, Prolyve PAC e o extracto enzimático produzido a partir de GT-OTA. Prepararam-se soluções *stock* em H₂O_{dd} estéril com 5 mg/mL de Lallzyme HC, 10 mg/mL de Lallzyme CB e 50 mg/mL de Prolyve PAC.

3.2.3.3 Preparação do inóculo e da solução de esporos

Cresceu-se a estirpe no meio de cultura MEA, no escuro a 25 °C. Ao fim de 7 dias, transferiu-se o conteúdo da placa de petri para 500 mL de H₂O_d estéril e agitou-se bem de forma a preparar a solução de esporos.

3.2.3.4 Preparação de mosto contaminado com ocratoxina A

Utilizaram-se 2 Kg de uvas da variedade *red globe* adquiridos num mercado local. Os cachos foram mergulhados durante 1 min numa solução de hipoclorito (0,4% de cloro activo em H₂O_d estéril), de seguida mergulhados em H₂O_d estéril para remover resíduos de cloro e escorridos. Picaram-se vários bagos com uma agulha estéril, mergulharam-se os cachos durante alguns segundos na solução de esporos e escorreram-se novamente antes de serem colocados numa caixa de plástico com o fundo revestido a papel absorvente. Incubou-se no escuro a 25 °C durante 6 dias com a tampa pousada de forma a permitir a circulação de ar. De seguida, separaram-se os bagos de uva dos engaços e colocaram-se em sacos de *stomaker*.

Homogeneizou-se durante 5 min a velocidade média no *stomaker* (Seward), misturaram-se as diferentes fracções num recipiente apropriado utilizando um agitador magnético durante 10 min e congelou-se até nova utilização.

3.2.3.5 Preparação dos ensaios de degradação

Para cada ensaio procedeu-se da seguinte forma em duplicado. Depois de descongelado o mosto, pesaram-se 100 g para um frasco de centrífuga de 250 mL (aprox. 50 g de sólidos e 50 g de líquido). Adicionou-se 0,1% de azida sódica e a quantidade de enzima correspondente a cada ensaio (Tabela 3.2.2). Para os enzimas comerciais, adicionaram-se 2 mL dos *stocks* descritos atrás e para o extracto enzimático de *A. niger*, 2,054 mL do extracto preparado a partir de meio de cultura GT-OTA. Depois de preparados, os ensaios foram incubados num agitador orbital (Lab-term, Kühner) durante 16 horas a 160 rpm e a 20 °C. Prepararam-se também 2 controlos sem enzima aos quais se adicionaram 2 mL de H₂O_d estéril. Um deles foi imediatamente processado para quantificar o seu conteúdo em OTA (controlo t₀), o outro foi incubado juntamente com os outros ensaios (controlo t₁₆). Terminado o período de incubação, quantificou-se também a OTA presente nestes ensaios.

Tabela 3.2.2 Quantidade de enzima utilizado na preparação dos ensaios de degradação com mosto.

	Ensaio					
	Controlo (t ₀)	Controlo (t ₁₆)	Lallzyme HC	Lallzyme CB	Prolyve PAC	Extracto de <i>A. niger</i>
Quantidade adicionada por 100 g de mosto	sem enzima	sem enzima	10 mg	20 mg	100 mg	10 mg

3.2.3.6 Quantificação da ocratoxina A nos mostos

Utilizou-se o método descrito em Serra *et al.* (2004) modificado de forma a permitir a análise separada da fracção sólida e líquida do mosto. Para cada um dos ensaios anteriores procedeu-se da seguinte forma. Centrifugou-se o mosto a 11500 RCF durante 20 min a 4 °C. Transferiu-se o sobrenadante para uma proveta graduada, registou-se o volume e o peso, e perpez-se até 150 mL com solução A (1% de PEG e 5% de NaHCO₃). Transferiu-se o pellet para outra proveta graduada, pesou-se e adicionaram-se 150 mL de solução A. De seguida, agitaram-se, separadamente, as duas fracções em frascos de centrífuga durante 30 min utilizando um agitador magnético e, depois de centrifugadas a 11500 RCF durante 20 min a

4 °C, filtraram-se os sobrenadantes resultantes por um filtro de microfibras de vidro de 1,6 µm (904-AH, Whatman). Mediu-se o volume dos filtrados e procedeu-se à limpeza da amostra utilizando colunas de imunoafinidade (OchraTestTM, Vicam). Para tal, passaram-se 20 mL de filtrado por uma coluna de imunoafinidade com a ajuda de um sistema de vácuo (Vac elut SRS24, Varian). De seguida, tendo o cuidado de não deixar secar o gel da coluna, passaram-se 5 mL de solução B (2,5% de NaCl e 0,5% de NaHCO₃) e, no fim destes, 5 mL de H₂O_{dd}. Finalmente, secou-se bem a coluna e passaram-se por esta 2 mL de metanol que foram recolhidos num frasco de vidro limpo. O metanol foi evaporado a 50 °C com a ajuda de uma ligeira corrente de azoto e ressuspendido em 1 mL de fase móvel de HPLC. As amostras foram analisadas por HPLC como já descrito na secção 3.2.1.5 e determinou-se a concentração de OTA (µg/Kg) presente em cada fracção utilizando a equação 3.3.

$$[\text{OTA}]_{\text{amostra}} = \frac{[\text{OTA}]_{\text{HPLC}} \times \text{Volume amostra}}{20 \times \text{peso amostra}} \quad (\text{eq. 3.3})$$

em que o volume da amostra é, para as fracções líquidas, igual a 150 mL e, para as fracções sólidas, igual ao volume apresentado nas Tabelas A-3.26 e A-3.27 no anexo a este capítulo; e em que o peso da amostra é igual ao peso registado para as respectivas fracções e apresentado nestas mesmas Tabelas.

3.3 Resultados

3.3.1 Degradação da ocratoxina A por acção de enzimas comerciais

3.3.1.1 Avaliação da actividade hidrolítica dos enzimas

As concentrações de ocratoxina A e ocratoxina α detectadas ao longo do tempo nos ensaios realizados com cada um dos enzimas encontram-se listadas nas Tabelas A-3.1 a A-3.9 no anexo a este capítulo.

Considerou-se que houve hidrólise da OTA durante um ensaio, sempre que se observou nas amostras recolhidas e ao longo do tempo, uma clara diminuição da concentração de OTA e o respectivo aumento da concentração de OT α , à semelhança do que ocorreu nos ensaios realizados com CPA a pH 7,5 e 8,5 (Figura 3.3.1). Os enzimas Protease A, Prolyve PAC, Pancreatin e CPY foram os únicos a revelar actividade hidrolítica sobre a OTA. A hidrólise da OTA ocorreu nos ensaios realizados com Protease A a pH 7,5 e 8,5 (Figura 3.3.2), com Prolyve PAC a pH 3,0 (Figura 3.3.3), com Pancreatin a pH 7,5 e 8,5 (Figura 3.3.4) e com CPY a pH 4,6, 5,6 e 6,6 (Figura 3.3.5). Os cromatogramas referentes as estes ensaios podem ser consultados nas Figuras A-3.1 a A-3.10 no anexo a este capítulo.

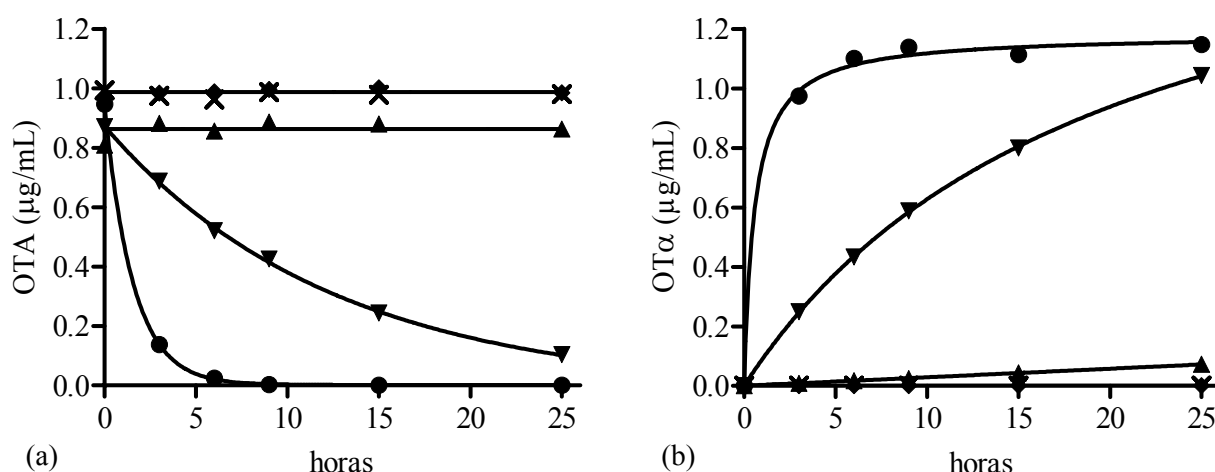


Figura 3.3.1 (a) Ocratoxina A e (b) ocratoxina α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de degradação realizados com CPA a: -♦-, pH 3,0; -▲-, pH 5,6; -▼-, pH 7,5; -●-, pH 8,5 e -×-, pH 10,0 (todos os ensaios foram realizados a 37 °C).

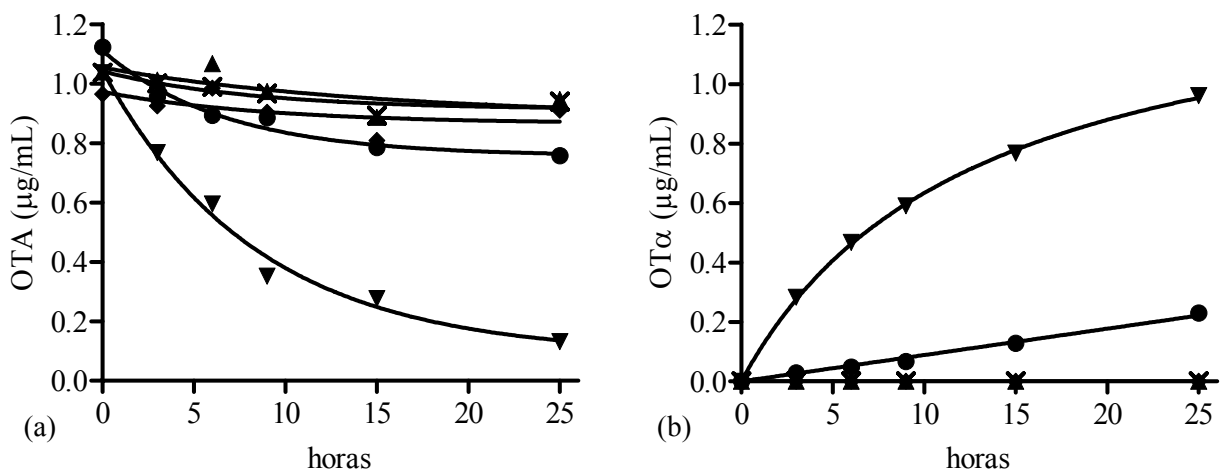


Figura 3.3.2 (a) Ocratoxina A e (b) ocratoxina α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de degradação realizados com Protease A a: -♦-, pH 3,0; -▲-, pH 5,6; -▼-, pH 7,5; -●-, pH 8,5 e -×-, pH 10,0 (todos os ensaios foram realizados a 37 °C).

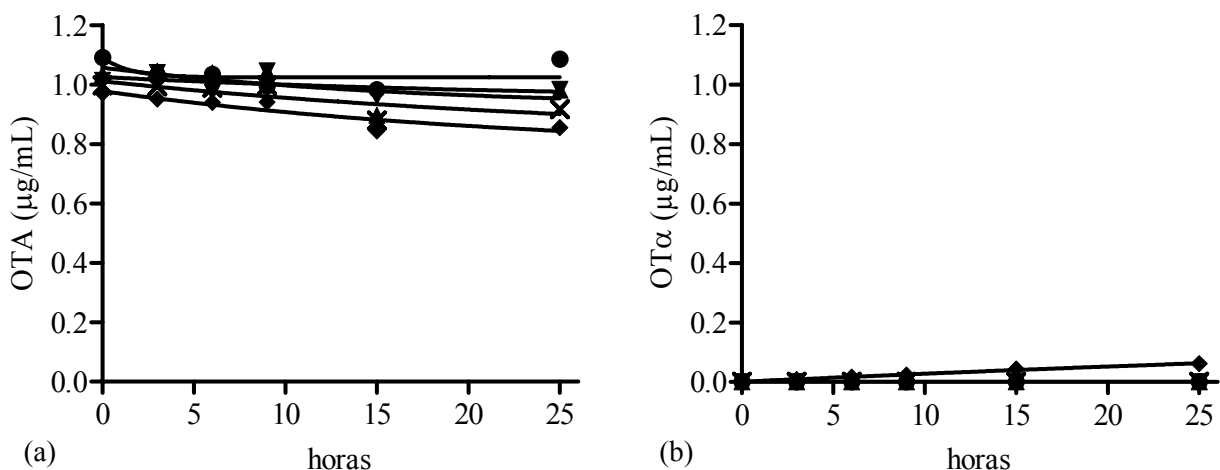


Figura 3.3.3 (a) Ocratoxina A e (b) ocratoxina α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de degradação realizados com Prollyve PAC a: -♦-, pH 3,0; -▲-, pH 5,6; -▼-, pH 7,5; -●-, pH 8,5 e -×-, pH 10,0 (todos os ensaios foram realizados a 37 °C).

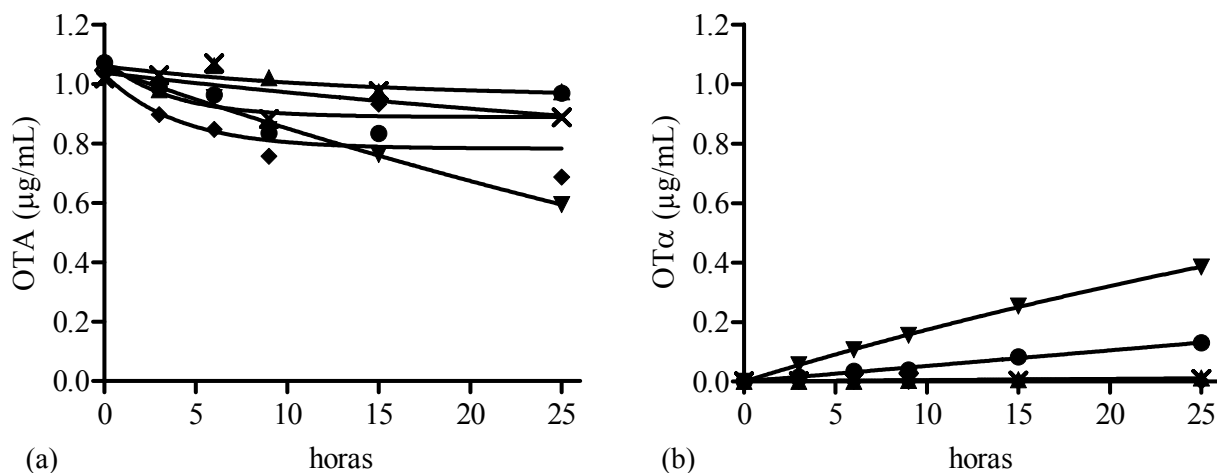


Figura 3.3.4 (a) Ocratoxina A e (b) ocratoxina α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de degradação realizados com Pancreatin a: -♦-, pH 3,0; -▲-, pH 5,6; -▼-, pH 7,5; -●-, pH 8,5 e -×-, pH 10,0 (todos os ensaios foram realizados a 37 °C).

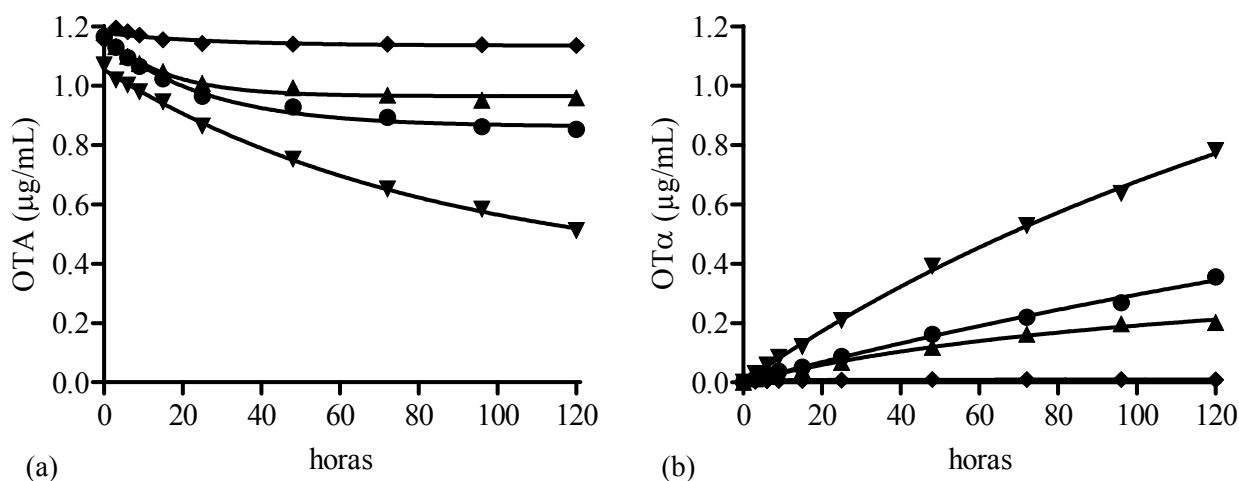


Figura 3.3.5 (a) Ocratoxina A e (b) ocratoxina α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de degradação realizados com CPY a: -♦-, pH 3,6; -▲-, pH 4,6; -▼-, pH 5,6 e -●-, pH 6,6 (todos os ensaios foram realizados a 37 °C).

3.3.1.2 Determinação da actividade enzimática

Calculou-se, para os diferentes pH testados, a actividade específica dos enzimas que foram capazes de hidrolisar a OTA. Para tal, considerou-se que uma unidade de actividade representava a produção de 1 ng/min de OT α a 37 °C. Na Tabela 3.3.1 encontram-se registadas as actividades específicas obtidas. Os enzimas Protease A e Pancreatin apresentaram actividade máxima a pH 7,5 (0,157 e 0,031 U/mg, respectivamente), o Prolyve PAC a pH 3,0 (0,005 U/mg), a CPY a pH 5,6 (1,67 U/mg) e a CPA a pH 8,5 (10,83 U/mg). Estes pH foram considerados o pH óptimo de cada enzima. De uma forma geral, os enzimas

Protease A, Prolyve PAC, Pancreatin e CPY apresentaram actividades específicas bastante inferiores à CPA quando esta foi incubada a pH 8,5. A actividade específica mais elevada, se não forem considerados os ensaios realizados com CPA, foi detectada com a CPY a pH 5,6.

Tabela 3.3.1 Actividades registadas para Protease A, Prolyve PAC, Pancreatin, Carboxipeptidase Y e Carboxipeptidase A aos pH testados e a 37 °C

Enzima	Actividade específica (U/mg)							
	pH 3,0	pH 3,6	pH 4,6	pH 5,6	pH 6,6	pH 7,5	pH 8,5	pH 10,0
Protease A	0	-	-	0	-	0,157	0,016	0
Prolyve PAC	0,005	-	-	0	-	0	0	0
Pancreatin	0	-	-	0	-	0,031	0,008	0
Carboxipeptidase Y	-	0,22	0,61	1,67	0,67	-	-	-
Carboxipeptidase A	0	-	-	0,09	-	2,77	10,83	0

- ensaio não realizado

3.3.1.3 Efeito de inibidores na actividade hidrolítica dos enzimas comerciais

De forma a avaliar a natureza das actividades hidrolíticas detectadas, realizaram-se ensaios na presença de 10 mM de EDTA e 1 mM de PMSF, inibidores específicos, respectivamente, de metalo e serina proteases (Rao *et al.*, 1998). As concentrações de OTA e OT α detectadas nestes ensaios encontram-se listadas nas Tabelas A-3.10 e A-3.11 no anexo a este capítulo. Nas Figuras A-3.11 a A-3.18 do mesmo anexo encontram-se os respectivos cromatogramas.

Verificou-se que a Protease A e a Pancreatin, à semelhança do que aconteceu com a CPA, foram fortemente inibidas pelo EDTA mas muito pouco inibidas pelo PMSF. Concretamente, a actividade hidrolítica destes enzimas foi respectivamente inibida em 79,6; 90,2 e 96,2% quando em presença de EDTA e em 19,2; 0,6 e 15,1% quando em presença de PMSF (Tabela 3.3.2). Pelo contrário, verificou-se que o enzima Prolyve PAC foi inibido pelo PMSF em 68,3% mas não pelo EDTA (1,8%).

Tabela 3.3.2 Efeito dos inibidores EDTA e PMSF na actividade hidrolítica de Protease A, Prolyve PAC, Pancreatin e CPA a pH 7,5 e 37 °C

Enzima	Inibidor	Inibição (%)
Protease A	10 mM EDTA	79,6
	1 mM PMSF	19,2
Prolyve PAC	10 mM EDTA	1,8
	1 mM PMSF	68,3
Pancreatin	10 mM EDTA	90,2
	1 mM PMSF	0,6
Carboxipeptidase A	10 mM EDTA	96,2
	1 mM PMSF	15,1

A CPA é uma metalocarboxipeptidase cuja actividade depende de um ião zinco e cuja inibição pelo EDTA é bem conhecida (Koide *et al.*, 1981). Uma vez que a Protease A e a Pancreatin foram de igual forma inibidos pelo EDTA, os enzimas presentes nestes preparados proteolíticos e responsáveis pela hidrólise da OTA devem necessitar também eles de um ião metálico para poderem actuar, tratando-se muito provável de metalocarboxipeptidases semelhantes a CPA.

No caso de Prolyve PAC, e uma vez que a reacção foi inibida apenas pelo PMSF, o enzima presente neste preparado proteolítico e responsável pela hidrólise da OTA é muito provavelmente um enzima do tipo serina protease.

3.3.1.4 Avaliação da actividade hidrolítica a 50 °C

Os preparados enzimáticos que evidenciaram actividade e a CPA foram testados a uma temperatura mais elevada (50 °C). As concentrações de OTA e OT α detectadas nestes ensaios encontram-se listadas na Tabela A-3.12 no anexo a este capítulo e os respectivos cromatogramas nas Figuras A-3.19 a A-3.22. Esta informação encontra-se simplificada na Figura 3.3.6 onde se podem encontrar as cinéticas de degradação da OTA e de aparecimento de OT α registadas em cada ensaio.

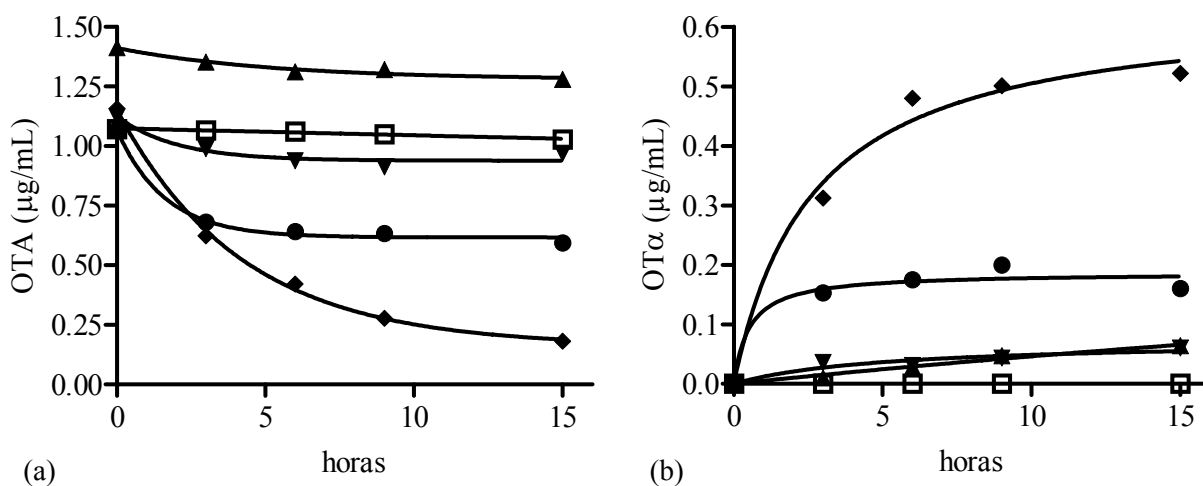


Figura 3.3.6 (a) Ocratoxina A e (b) ocratoxina α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de degradação realizados a 50 °C com: -□-, Branco; -◆-, Protease A a pH 7,5; -▲-, Prolyve PAC a pH 3,0; -▼-, Pancreatin a pH 7,5 e -●-, CPA a pH 7,5.

Verificou-se que a Prolyve PAC, a Pancreatin e a CPA foram total ou parcialmente inactivadas nestas condições, uma vez que as suas actividades específicas, que eram respectivamente de 0,005; 0,031 e 2,77 U/mg a 37 °C (Tabela 3.3.2), diminuíram para 0; 0,02 e 1,7 U/mg quando incubadas a 50 °C (Tabela 3.3.3). Pelo contrário, a Protease A evidenciou

maior actividade específica a 50 °C (0,178 U/mg). No entanto, a concentração de OTA registada ao fim de 15 horas a 50 °C (0,522 µg/mL) é bastante inferior à registada no ensaio realizado a 37 °C (0,768 µg/mL) indicando que o enzima é inactivado pela temperatura.

Tabela 3.3.3 Actividade específica registada para Protease A, Prolyve PAC, Pancreatin e Carboxipeptidase A a 50 °C

Enzima	pH	Actividade específica (U/mg)
Protease A	7,5	0,178
Prolyve PAC	3,0	-
Pancreatin	7,5	0,02
Carboxipeptidase A	7,5	1,7

- actividade não detectada

3.3.2 Degradação da ocratoxina A por acção de um enzima isolado a partir de *Aspergillus niger* MUM 03.58

3.3.2.1 Quantificação da proteína dos extractos enzimáticos

A proteína presente nos filtrados e extractos enzimáticos produzidos foi quantificada utilizando a curva de calibração da Figura A-3.23 do anexo a este capítulo. As absorvências registadas e referentes a estes ensaios estão listadas na Tabela A-3.13.

A proteína presente nas diferentes amostras está registada na Tabela 3.3.4. A proteína total detectada nos filtrados produzidos a partir dos meios de cultura GT, GT-OTA e GT-niger foi respectivamente de 145,0; 165,9 e 165,1 mg. Nos extractos enzimáticos correspondentes (depois de precipitada a proteína com acetona) detectaram-se 75,16; 48,68 e 56,05 mg.

Tabela 3.3.4 Proteína detectada nos extractos enzimáticos produzidos a partir de GT, GT-OTA e GT-niger

Amostra	Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
GT	1,450	145,0
Filtrado de	GT-OTA	1,659
	GT-niger	1,651
	GT	7,516
Extracto enzimático de	GT-OTA	4,868
	GT-niger	5,605
	GT-niger	5,605

3.3.2.2 Detecção da actividade hidrolítica sobre a OTA

As concentrações de OTA e OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios realizados encontram-se listadas nas Tabelas A-3.14 a A-3.18 no anexo a este capítulo. Os cromatogramas referentes aos ensaios onde se detectou actividade hidrolítica sobre a OTA estão apresentados nas Figuras A-3.24 a A-3.30 do mesmo anexo.

Nestes ensaios verificou-se que os três extractos produzidos foram capazes de hidrolisar a OTA muito embora se tenha detectado uma reduzida actividade com o extracto enzimático produzido a partir do meio de cultura GT. As actividades mais elevadas foram detectadas nos ensaios realizados a pH 7,5; tendo-se obtido 3,1 U/mL com o extracto de GT, 162,5 U/mL com extracto de GT-OTA e 185,3 U/mL com extracto de GT-niger (Tabela 3.3.5). O pH 7,5 foi, por isso, considerado o pH óptimo da reacção de hidrólise da OTA, tendo sido utilizado nos ensaios seguintes sempre que foi necessário determinar a actividade do enzima de *A. niger*. Detectou-se, também, actividade hidrolítica a pH 5,6 e a pH 8,5. Nos ensaios realizados a pH 5,6 obtiveram-se actividades de 13,6 U/mL com extracto de GT-OTA e 3,1 U/mL com o extracto de GT-niger. Nos ensaios realizados a pH 8,5 obtiveram-se, com estes dois extractos, actividades de 44,4 e 82,5 U/mL, respectivamente.

Tabela 3.3.5 Actividade registada para os extractos enzimáticos produzidos a partir dos meios de cultura GT, GT-OTA e GT-niger a 37 °C

Extracto	Actividade (U/mL)				
	pH 3,0	pH 5,6	pH 7,5	pH 8,5	pH 10,0
GT	-	-	3,1	-	-
GT-OTA	-	13,6	162,5	44,4	-
GT-niger	-	3,1	185,3	82,5	-

- actividade não detectada

Na Figura 3.3.7 estão representadas as cinéticas de degradação da OTA e de aparecimento da OT α obtidas com os três extractos a pH 7,5 e 37 °C. Nela é também evidente que a actividade hidrolítica do extracto de GT é bastante inferior à dos extractos de GT-OTA e de GT-niger; e que a actividade destes últimos é muito semelhante.

A utilização destes três meios de cultura teve como objectivo verificar se a OTA era necessária para induzir a síntese do enzima hidrolítico em quantidades suficientes que permitissem a sua detecção e isolamento. Observou-se que a presença desta micotoxina não é

essencial uma vez que não se detectou um aumento significativo de actividade no extracto enzimático produzido a partir do meio de cultura GT-OTA. No entanto, verificou-se um claro benefício na modificação do meio GT com as estirpes de *A. alliaceus* e de *A. niger* de forma a produzir os meios de cultura GT-OTA e GT-niger, uma vez que as actividades hidrolíticas dos extractos produzidos a partir destes dois meios são bastante maiores do que a detectada com o extracto obtido a partir do meio GT. Este aumento pode ser explicado pelo facto de 20 a 30% do peso seco dos fungos ser constituído por proteína. O crescimento prévio das estirpes de *A. alliaceus* e de *A. niger* poderá ter suplementado o meio de cultura GT com proteína e esta ter induzido a síntese de proteases e peptidases, entre as quais, uma capaz de hidrolisar a OTA.

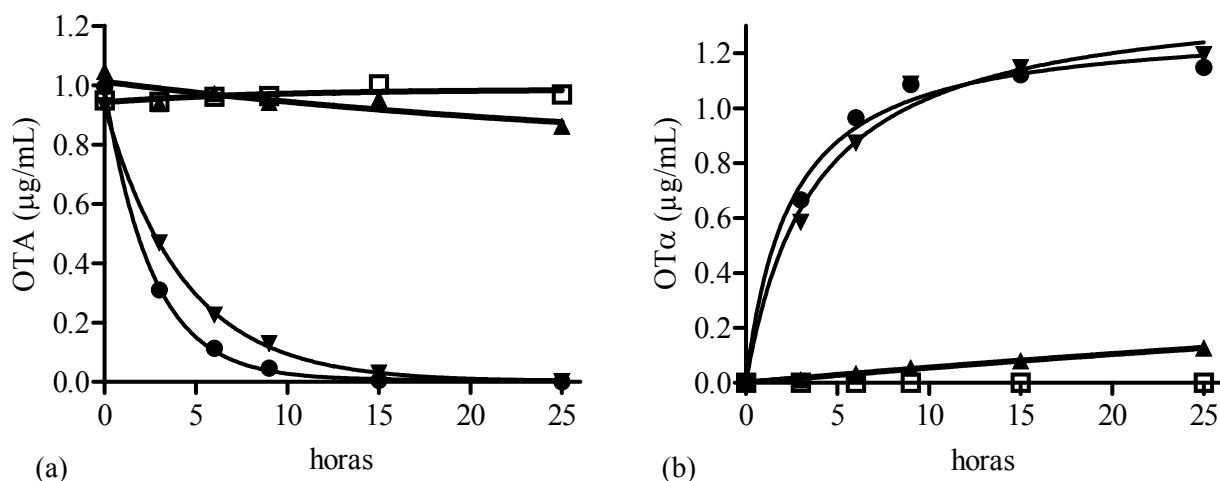


Figura 3.3.7 (a) Ocratoxina A e (b) ocratoxina α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de degradação realizados a pH 7,5 e 37 °C com: -□-, Branco; -▲-, GT; -▼-, GT-OTA e -●-, GT-niger.

3.3.2.3 Purificação por cromatografia de troca aniónica do extracto GT-OTA

O enzima hidrolítico da OTA foi parcialmente purificado a partir do filtrado do meio GT-OTA por precipitação com acetona e posteriormente separado por cromatografia de troca aniónica.

Após a separação cromatográfica detectaram-se predominantemente dois picos com tempos de retenção de 7,4 e 31,4 min (Figura 3.3.8).

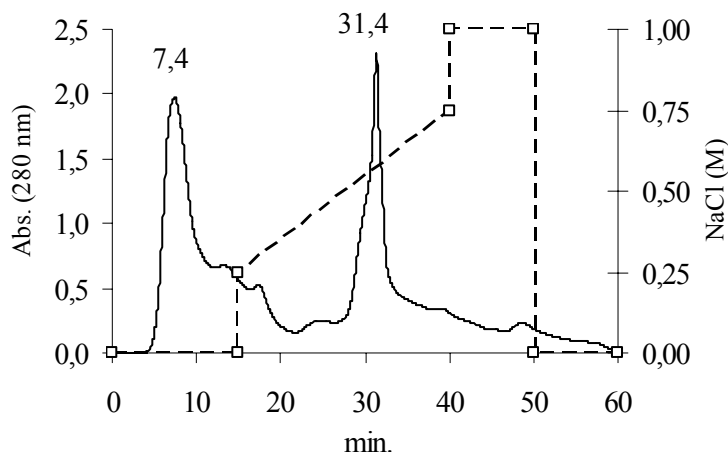


Figura 3.3.8 (—) Cromatograma de cromatografia aniónica do extracto enzimático de GT-OTA obtido por registo da absorvência a 280 nm e (----) gradiente salino utilizado na eluição do extracto.

Nas fracções de 1 mL recolhidas entre os 5 e os 8 min, que são referentes ao primeiro pico, detectou-se proteína mas não se detectou actividade hidrolítica (Figura 3.3.9). Nas fracções de 1 mL recolhidas entre os 27 e os 38 min, que são referentes ao segundo pico, detectou-se um maior conteúdo em proteína e actividade hidrolítica sobre a OTA (Figura 3.3.9). Os dados utilizados na elaboração destes gráficos estão apresentados na Tabela A-3.19 no anexo a este capítulo. A proteína presente em cada fracção foi quantificada utilizando a curva de calibração da Figura A-3.31 elaborada com os dados da Tabela A-3.20 e os cromatogramas obtidos, referentes aos ensaios em que se detectou actividade hidrolítica sobre a OTA, podem ser encontrados nas Figuras A-3.32 a A-3.37 no mesmo anexo.

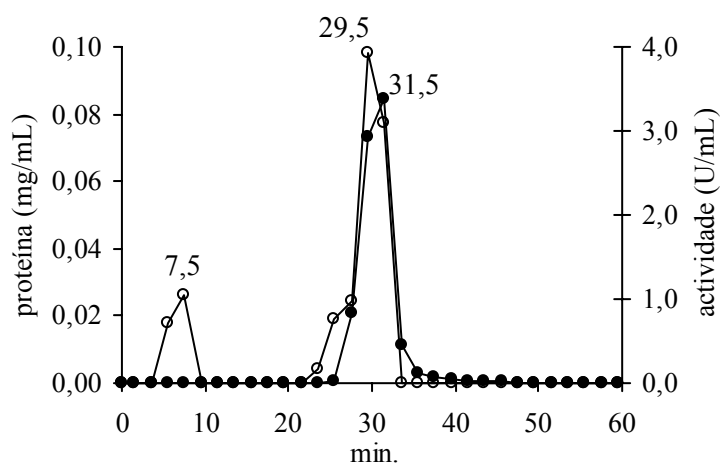


Figura 3.3.9 (o) Proteína quantificada pelo método de Bradford nas amostras recolhidas depois da cromatografia aniónica e (●) actividade hidrolítica detectada nas mesmas amostras a pH 7,5 e 37 °C.

Os resultados do processo de purificação estão resumidos na Tabela 3.3.6. Após a precipitação proteica com acetona, o extracto resultante apresentou uma actividade específica de 33,5 U/mg com um grau de purificação de 2,3 vezes e uma taxa de recuperação de 68,3%. Após a separação por cromatografia de troca aniónica, a actividade específica do preparado enzimático purificado foi quantificada em 35,8 U/mg com um grau de purificação de 2,5 vezes e uma taxa de recuperação de 67,9%.

Tabela 3.3.6 Resumo dos passos realizados para purificar o enzima hidrolítico de *A. niger*

Amostra	Proteína total (mg)	Actividade total (U)	Actividade específica (U/mg)	Taxa de recuperação (%)	Grado de Purificação
Filtrado	165,9	2389	14,4	100	1
Precipitação com acetona	48,7	1631	33,5	68,3	2,3
Cromatografia com Macro-Prep High Q	45,3	1622	35,8	67,9	2,5

3.3.2.4 Efeito de inibidores na actividade hidrolítica sobre a OTA

Avaliou-se a acção dos inibidores específicos EDTA e PMSF na actividade hidrolítica do extracto enzimático obtido a partir do meio de cultura GT-OTA. Desta forma pretendeu-se verificar que tipo de enzima poderia ser responsável por essa actividade uma vez que se sabe que o EDTA inibe metaloproteases e o PMSF, serina proteases. Utilizou-se também a CPA para efeitos comparativos. As concentrações de OTA e OT α detectadas nestes ensaios encontram-se listadas na Tabela A-3.21 no anexo a este capítulo e os cromatogramas nas Figuras A-3.38 a A-3.40.

Verificou-se que o extracto enzimático foi fortemente inibido pelo EDTA (99%) e praticamente não inibido pelo PMSF (3,1%) à semelhança do que se verificou com a CPA (Tabela 3.3.7). A CPA é uma metalocarboxipeptidase sendo, como já referido atrás, a sua actividade inibida pelo EDTA. Uma vez que a acção hidrolítica do extracto enzimático foi também inibida pelo EDTA, é provável que o enzima presente neste extracto seja também uma metalocarboxipeptidase.

Tabela 3.3.7 Efeito dos inibidores EDTA e PMSF na actividade hidrolítica do extracto de GT-OTA e da CPA a pH 7,5 e 37 °C

	Inibidor	Inibição (%)
Extracto de GT-OTA	10 mM EDTA	99,0
	1 mM PMSF	3,1
Carboxipeptidase A	10 mM EDTA	96,2
	1 mM PMSF	15,1

3.3.2.5 Determinação dos parâmetros cinéticos

As concentrações de OTA e OT α detectadas nos ensaios de reacção efectuados estão registadas nas Tabelas A-3.22 e A-3.23 do anexo a este capítulo. Com estes dados elaboraram-se os gráficos das Figuras 3.3.10 e 3.3.11 e obtiveram-se os valores de V_0 . Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} foram obtidos por ajuste não linear de curvas à representação hiperbólica de V_0 em função da concentração de OTA utilizando a equação de Michaelis-Menten (Figura 3.3.12) e pelos métodos de representação linear de Lineweaver-Burk (Figura 3.3.13) e de Hanes-Woolf (Figura 3.3.14). Nas Tabelas A-3.24 e A-3.25 do anexo a este capítulo podem-se encontrar os dados utilizados na elaboração dessas representações.

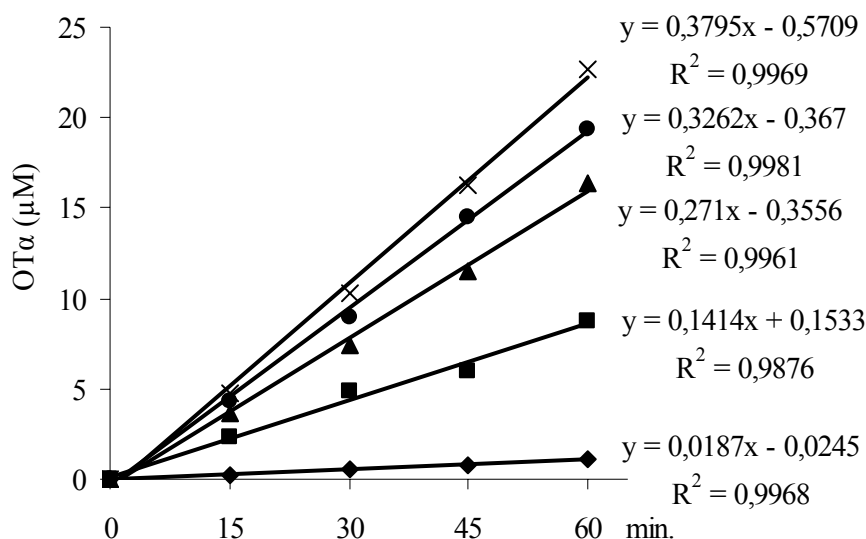


Figura 3.3.10 Representação gráfica da concentração de OT α em função do tempo para o extracto enzimático de GT-OTA e obtenção de V_0 por regressão linear dos dados. Ensaio realizado com -◆-, 0,01; -■-, 0,1; -▲-, 0,3; -●-, 0,6 e -×-, 1,3 mg/mL de OTA a pH 7,5 e 37 °C.

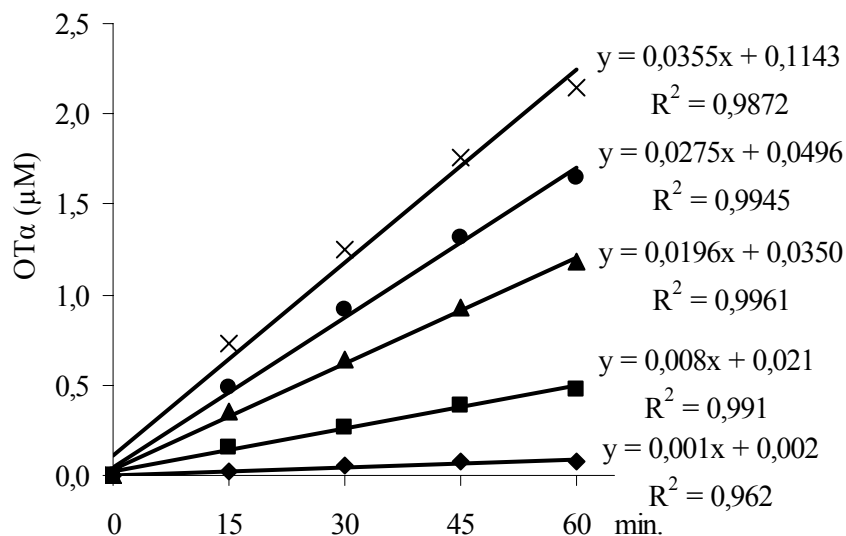


Figura 3.3.11 Representação gráfica da concentração de OTα em função do tempo para a CPA e obtenção de V_0 por regressão linear dos dados. Ensaios realizados com -◆-, 0,01; -■-, 0,1; -▲-, 0,3; -●-, 0,6 e -x-, 1,3 mg/mL de OTA a pH 7,5 e 37 °C.

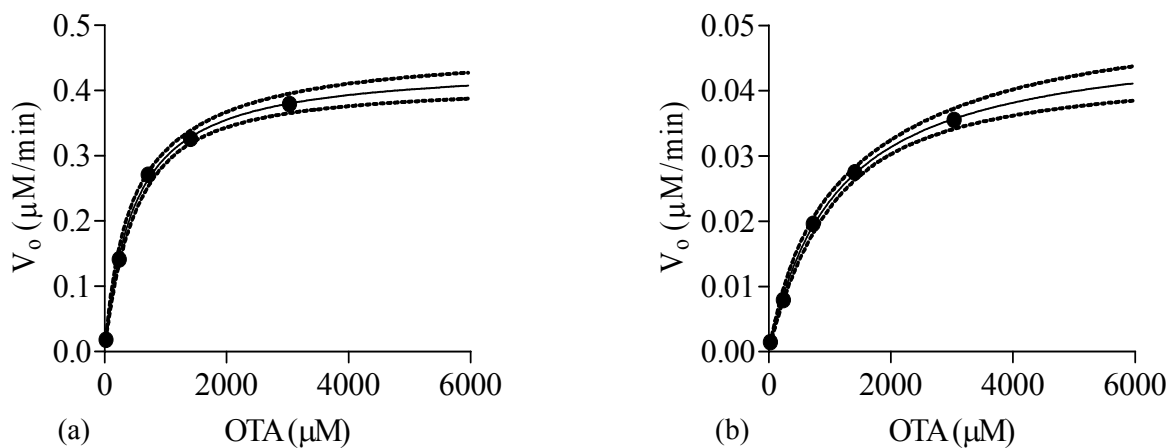


Figura 3.3.12 Representação hiperbólica da velocidade inicial (V_0) em função da concentração de substrato (OTA) e ajuste não linear dos dados ao modelo de Michaelis-Menten: a) para o extracto enzimático de GT-OTA e b) para a CPA. (●) dados experimentais, (—) curva ajustada pelo programa informático, (----) intervalo de confiança a 95%.

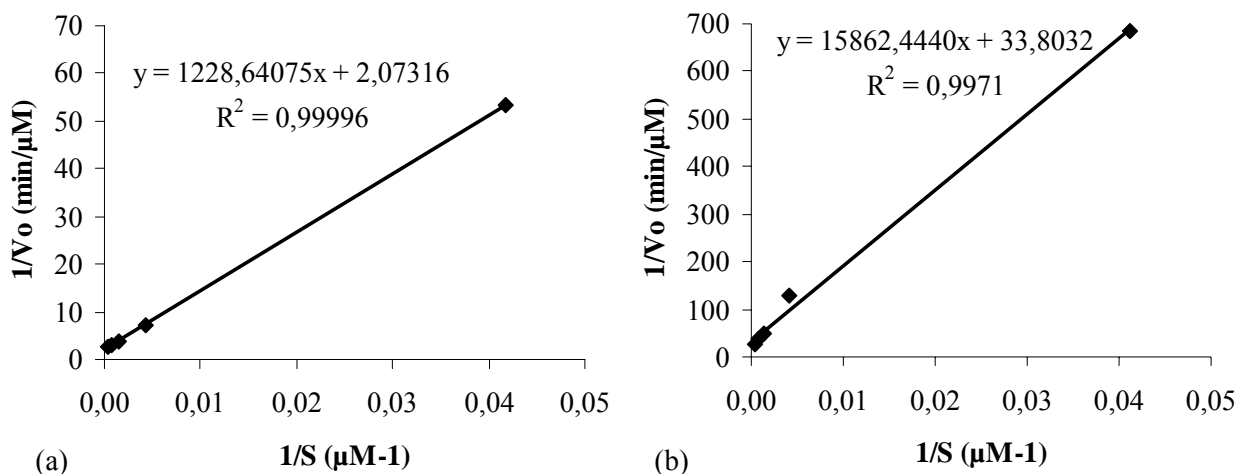


Figura 3.3.13 Representação linear de Lineweaver-Burk para o cálculo dos parâmetros cinéticos: a) do extracto enzimático de GT-OTA e b) da CPA.

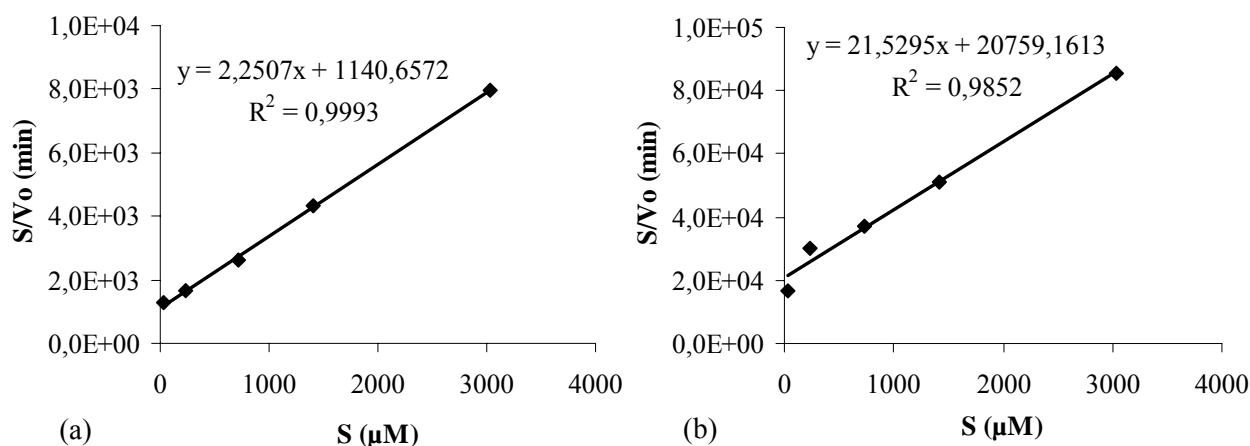


Figura 3.3.14 Representação linear de Hanes-Woolf para o cálculo dos parâmetros cinéticos: a) do extracto enzimático de GT-OTA e b) da CPA.

Na Tabela 3.3.8 podem-se comparar os valores de K_m e de V_{max} determinados pelos diferentes métodos utilizados. Com o método de regressão não linear obteve-se para o enzima hidrolítico presente no extracto enzimático um K_m de $476,3 \pm 30,77 \mu\text{M}$ e um V_{max} de $0,440 \pm 0,0085 \mu\text{M}/\text{min}$ e para a CPA um K_m de $1112,0 \pm 81,79 \mu\text{M}$ e um V_{max} de $0,049 \pm 0,0015 \mu\text{M}/\text{min}$. Com o método de Hanes-Woolf obtiveram-se valores de K_m e de V_{max} muito próximos dos obtidos com o método não linear. Pelo contrário, com o método de Lineweaver-Burk os parâmetros cinéticos obtidos, sobretudo para a CPA, revelaram-se mais afastados dos obtidos pelo método não linear.

Tabela 3.3.8 Parâmetros cinéticos do extracto enzimático de GT-OTA e da CPA determinados por regressão não linear, representação de Lineweaver-Burk e representação de Hanes-Woolf.

	Regressão não linear		Lineweaver-Burk		Hanes-Woolf	
	K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)
Extracto de GT-OTA	476,3 \pm 30,77	0,440 \pm 0,0085	592,6	0,482	506,8	0,444
Carboxipeptidase A	1112 \pm 81,79	0,049 \pm 0,0015	469,3	0,030	964,2	0,046

3.3.3 Degradação da ocratoxina A em mostos

A concentração média de OTA detectada nas fracções líquida e sólida dos mostos tratados com e sem enzimas pode ser visualizada nos gráficos da Figura 3.3.15. De uma forma geral, não se verificou diminuição dos níveis de OTA, relativamente ao controlo t_0 , nas fracções líquida e sólida dos mostos tratados com os enzimas. Esta não diminuição dos níveis de OTA já era de alguma forma esperada face aos resultados obtidos com estes enzimas nos ensaios *in vitro* previamente realizados. No entanto, comprova-se definitivamente, com os testes em mostos, que estes preparados enzimáticos não teriam utilidade na redução dos níveis de OTA em vinhos ou noutros produtos alimentares ácidos, como por exemplo, sumos de fruta.

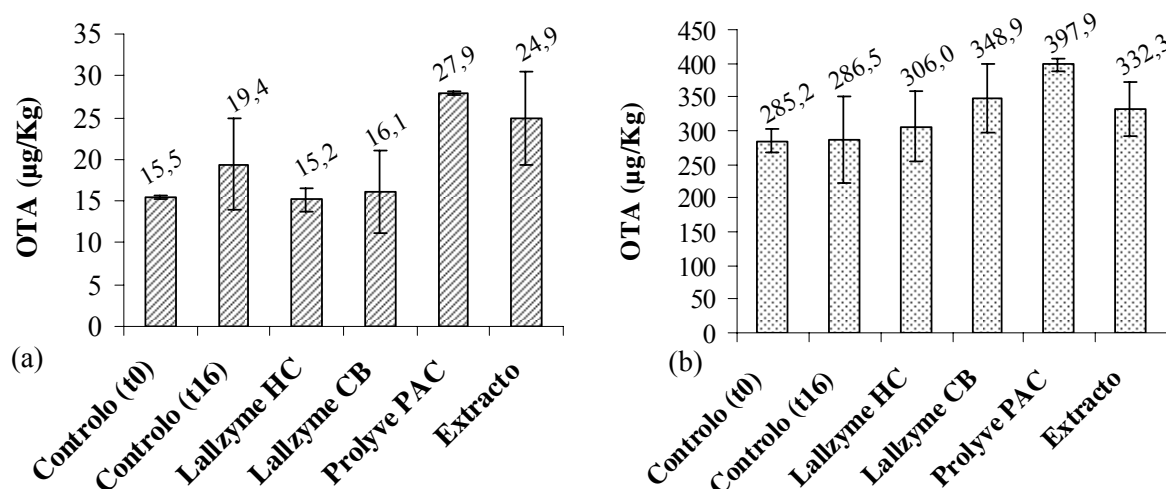


Figura 3.3.15 Concentração de OTA ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) detectada: a) na fracção líquida e b) na fracção sólida dos mostos após tratamento com os preparados enzimáticos. Os valores são a média de duas réplicas e as barras representam o desvio padrão.

Verificou-se, ainda, um aumento substancial da OTA total detectada nos mostos tratados com Prolyve PAC, mais 39% relativamente ao controlo t_{16} (Figura 3.3.16). Este aumento poderá dever-se à acção proteolítica deste preparado enzimático uma vez que é conhecido que a OTA é capaz de se ligar a certas proteínas (Schwerdt *et al.*, 1999) e que estas interferem muitas vezes nos métodos de detecção e quantificação da mesma (Uchiyama *et al.*, 1985). Sendo assim, o preparado enzimático Prolyve PAC, ao hidrolisar as proteínas presentes no mosto, poderá ter libertado OTA que se encontrava ligada a estas, contribuindo para o aumento observado relativamente ao controlo.

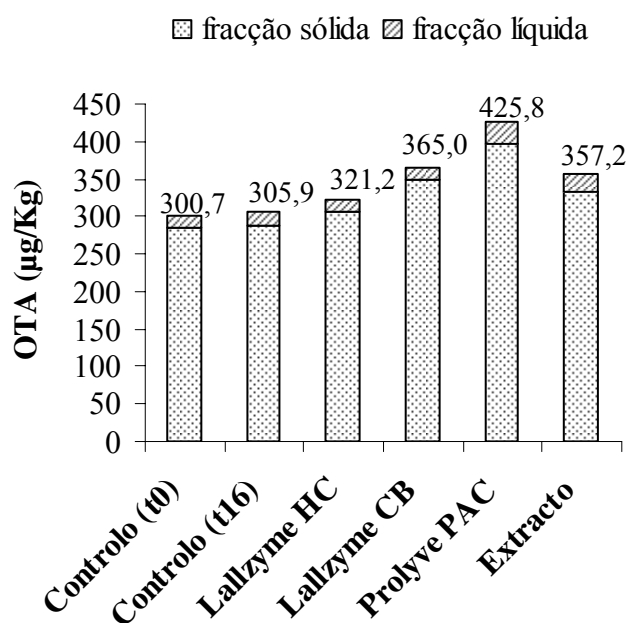


Figura 3.3.16 Ocratoxina A ($\mu\text{g/Kg}$) total detectada nos mostos após tratamento com os preparados enzimáticos.

Nas Tabelas A-3.26 e A-3.27 do anexo a este capítulo podem ser encontrados os volumes e os pesos referentes às diferentes fracções dos mostos analisados. A concentração de OTA, em $\mu\text{g/Kg}$, presente em cada fracção, bem como as médias das duas réplicas efectuadas e o respectivo desvio padrão, encontram-se na Tabela A-3.28 no mesmo anexo.

3.4 Discussão e Conclusão

Como foi referido na introdução deste capítulo, o objectivo deste trabalho foi o de encontrar um enzima que pudesse hidrolisar a OTA a pH ácido para ser utilizado no processo de fabrico de alguns alimentos contaminados com esta micotoxina, de forma a reduzir ou eliminar totalmente a sua presença.

Procuramos, inicialmente, verificar a capacidade degradativa de algumas proteases ácidas, como a Protease A, Protease II, Prolyve PAC e Papain, tendo os ensaios sido depois alargados a algumas proteases neutras, como a Prolyve BS, Prolyve NP e Pancreatin, e a uma protease alcalina, Prolyve 1000. Mais tarde, e tendo já por base os resultados obtidos com as proteases, quisemos verificar se outro tipo de preparados enzimáticos poderiam hidrolisar a OTA, muito embora não estivessem, à partida, incluídas enzimas proteolíticas na sua composição. Testaram-se, portanto, alguns preparados enzimáticos utilizados em enologia, essencialmente constituídos por pectinases. Finalmente, testaram-se três enzimas puros, as carboxipeptidases CPY, CPP e CPA: a CPY, por ser uma serina carboxipeptidase isolada a partir de *S. cerevisiae* capaz de remover aminoácidos C-terminais a valores de pH ligeiramente ácidos (pH óptimo: 6,7) (Jung *et al.*, 1999); a CPP, por ser uma carboxipeptidase isolada a partir de *P. janthinellum* capaz de remover aminoácidos C-terminais a valores de pH ácidos (pH óptimo: 3,7) (Lu *et al.*, 1988); e a CPA, para efeitos comparativos, uma vez que a sua acção hidrolítica sobre a OTA é bem conhecida (Pitout, 1969).

No rastreio levado a cabo, verificou-se que os preparados comerciais Protease A, Prolyve PAC e Pancreatin e o enzima CPY foram os únicos capazes de hidrolisar a OTA numa maior ou menor extensão. A Protease A apresentou actividade específica máxima a pH 7,5 (0,157 U/mg), a Prolyve PAC a pH 3,0 (0,005 U/mg), a Pancreatin a pH 7,5 (0,031 U/mg) e a CPY a pH 5,6 (1,67 U/mg), tendo-se verificado, no entanto, serem muito inferiores à actividade específica da CPA a pH 8,5 (10,83 U/mg).

As baixas actividades específicas registadas nos preparados comerciais indicam que a actividade hidrolítica sobre a OTA se deve, muito provavelmente, à presença de um enzima que não é o enzima responsável pela actividade proteolítica comercializada. Estes preparados são, normalmente, pouco puros, uma vez que os custos de purificação são muito elevados, e contêm, por isso, diversas actividades enzimáticas residuais (Kilcawley *et al.*, 2002).

Num estudo semelhante ao aqui apresentado, 23 preparados lipolíticos foram testados, tendo os autores detectado actividade hidrolítica sobre a OTA num preparado comercial (Lipase A, Amano Inc.) obtido a partir de uma estirpe de *A. niger* (Stander *et al.*, 2000). Estes verificaram ainda, utilizando SDS-PAGE, que este preparado apresentava cerca de 32 bandas proteicas e que a actividade sobre a OTA se devia a um enzima, em particular, que depois de purificado, utilizando cromatografia de troca aniónica, apresentou uma actividade específica de 2,32 U/mg.

O preparado proteolítico Protease A, por nós testado, e no qual detectamos actividade hidrolítica sobre a OTA, é também produzido pela Amano Inc. a partir de uma estirpe de *A. niger*. Ao que tudo indica, os processos de produção implementados por esta empresa levam a que um enzima capaz de hidrolisar a OTA esteja presente nalguns dos seus preparados comerciais produzidos a partir de *A. niger*. Esta constatação veio reforçar a possibilidade de podermos vir a isolar um enzima capaz de hidrolisar a OTA a partir de uma das estirpes de *A. niger* previamente testadas, como foi apresentado no capítulo 2.

Num outro preparado comercial, também produzido a partir de uma estirpe de *A. niger* (Prolyve PAC, Lyven), não foi detectada a actividade hidrolítica sobre a OTA a pH 7,5, encontrada no preparado Protease A. Neste caso, detectou-se uma actividade muito reduzida a pH 3,0 (0,005 U/mg) que sugere a presença de um outro enzima. Esta constatação veio a ser confirmada com a incubação destes preparados em presença de dois inibidores, o EDTA e o PMSF, que foram seleccionados por serem, respectivamente, inibidores específicos de metalo e serina proteases (North, 1982; Rao *et al.*, 1998). Nestes ensaios, verificou-se que a actividade hidrolítica da Protease A, Pancreatin e CPA foi significativamente inibida pelo EDTA (80, 90 e 96%, respectivamente), mas não pelo PMSF (19, 1 e 15%, respectivamente); e que a actividade da Prolyve PAC foi significativamente inibida pelo PMSF (68%), mas não pelo EDTA (2%). Sendo assim, pode-se concluir que os enzimas com actividade sobre a OTA, presentes nos preparados Protease A e Pancreatin, são metalocarboxipeptidases semelhantes a CAP e que o enzima presente no preparado Prolyve PAC é uma serina carboxipeptidase.

A actividade hidrolítica sobre a OTA presente no preparado Pancreatin, que é produzido a partir de pâncreas de suíno, pode, por seu lado, ser devida à presença de carboxipeptidase A, uma vez que esta pode ser isolada, também, a partir deste órgão animal (Koide *et al.*, 1981).

Quanto à CPY, esta apresentou uma actividade específica mais elevada que os preparados proteolíticos, provavelmente por se tratar de um enzima purificado. Verificou-se que é capaz

de hidrolisar a OTA em condições ácidas (entre pH 3,6 e 6,6 - com um máximo de actividade a pH 5,6). Verificou-se, ainda, que a degradação da OTA pela CPY a pH 5,6 é cerca de 7 vezes mais lenta que a degradação da OTA pela CPA a pH 8,5. No entanto, a CPY poderá ser responsável pela degradação da OTA, *in vivo*, pelas leveduras, como foi apresentado no capítulo 2, uma vez que é um conhecido enzima vacuolar produzido por diversas espécies de leveduras (Bart van den Hazel *et al.*, 1996). Contudo, outros enzimas poderão, também, estar envolvidos. Nomeadamente, Varga e co-autores (Peteri *et al.*, 2007) publicaram recentemente um trabalho onde descreveram a capacidade da levedura *Phaffia rhodozyma* para degradar a OTA, tendo a degradação sido atribuída à presença de uma metaloprotease, uma vez que a actividade detectada foi inibida pelo EDTA e pelo 1,10-fenantrolina.

Os preparados proteolíticos constituídos por proteases neutras e alcalinas, os preparados enológicos e a CPP não apresentaram actividade hidrolítica sobre a OTA.

Uma vez que as condições recomendadas pelos produtores dos preparados proteolíticos indicavam temperaturas óptimas entre os 40 e os 60 °C (Tabela 3.2.1), pretendeu-se, também, avaliar a actividade hidrolítica dos preparados, a 50 °C. Verificou-se que a Prolyve PAC, a Pancreatin e a CPA foram total ou parcialmente inactivadas quando incubadas a esta temperatura, uma vez que as suas actividades específicas diminuíram, respectivamente, para 0, 0,02 e 1,7 U/mg. Verificou-se, ainda, que a actividade específica da Protease A aumentou ligeiramente (0,178 U/mg) nestas condições. No entanto, a concentração de OT α registada ao fim de 15 horas a 50 °C (0,522 μ g/mL) foi inferior à registada no ensaio realizado a 37 °C (0,768 μ g/mL), indicando que o enzima com actividade hidrolítica sobre a OTA, presente na Protease A, é também inactivado a esta temperatura. A sua inactivação é, contudo, mais lenta que a dos enzimas detectados nos outros preparados enzimáticos.

Procurou-se, por outro lado, a partir de uma das estirpes de *A. niger* testadas no capítulo 2, isolar um enzima capaz de hidrolisar a OTA. Utilizaram-se, para tal, os meios de cultura GT, GT-OTA e GT-niger, de forma a verificar se a OTA seria necessária para induzir a produção do enzima em causa. Relembrando, o meio GT é constituído por gérmen de trigo dextrinado, o meio GT-OTA por gérmen de trigo dextrinado enriquecido com ocratoxina A e o meio GT-niger por gérmen de trigo dextrinado enriquecido com biomassa fúngica.

Depois de a estirpe de *A. niger* seleccionada ter crescido nos meios de cultura, estes foram extraídos com uma solução tampão suplementada com Triton X-100. Este detergente é utilizado com frequência para solubilizar proteínas presentes nas membranas celulares (Wilk, 2004), sendo utilizado nalguns processos de extracção de proteases (Tsujita & Endo, 1978).

Nos filtrados resultantes, avaliou-se a quantidade de proteína total, tendo-se detectado quantidades semelhantes nos filtrados obtidos a partir do meio GT-OTA e GT-niger (166 e 165 mg de proteína total, respectivamente), e uma quantidade ligeiramente inferior no filtrado obtido a partir do meio GT (145 mg de proteína total). Depois da precipitação da fracção proteica com acetona fria e da sua ressuspensão em tampão fosfato, voltou-se a avaliar a proteína total nos, agora denominados, extractos enzimáticos. Detectaram-se, neste caso, 75 mg de proteína no extracto obtido a partir do meio GT, 49 mg no extracto de GT-OTA e 56 mg no extracto de GT-niger. Avaliou-se, também, a actividade hidrolítica sobre a OTA destes extractos, tendo-se registado a pH 7,5, actividades de 3, 163 e 185 U/mL, respectivamente. Verificou-se, portanto, que o *A. niger* produziu uma quantidade bastante maior do enzima que hidrolisa a OTA quando foi crescido nos meios GT-OTA e GT-niger.

Como foi referido na secção dos materiais e métodos, estes meios de cultura foram preparados a partir do meio GT de forma a incluir na sua composição OTA ou biomassa fúngica e, com eles, verificar se a presença da OTA induzia a produção de maiores quantidades do enzima que a hidrolisa. Observou-se, no entanto, que a presença da micotoxina no substrato não induziu maior produção do enzima em causa, uma vez que se obteve uma actividade hidrolítica maior com o extracto enzimático obtido a partir do meio GT-niger (controlo) do que com o extracto enzimático obtido a partir do meio GT-OTA. Contudo, a pré-fermentação do meio GT com uma estirpe de *A. alliaceus* ou de *A. niger*, de forma a elaborar os meios GT-OTA e GT-niger, permitiu obter quantidades substancialmente maiores, cerca de 54 e 62 vezes mais, do enzima que hidrolisa a OTA. Uma possível explicação para este aumento pode estar relacionada com a intensa esporulação que o *A. niger* apresentou nos meios de cultura GT-OTA e GT-niger, ao contrário do que foi observado no meio GT. De facto, verificou-se que o *A. niger* iniciou a esporulação muito mais cedo, quando foi crescido nos meios de cultura GT-OTA e GT-niger, tendo, ao fim dos 16 dias de incubação, produzido uma quantidade muito maior de esporos nestes dois meios. É conhecido que a descarga conidial nos fungos filamentosos envolve uma intensa degradação proteica (Rao *et al.*, 1998), tendo sido demonstrado o envolvimento de proteases utilizando inibidores (Phadatare *et al.*, 1989) e sido demonstrado, em *A. niger*, que a produção de proteases correlaciona bem com a produção de conídios (Sanchez & Pilosof, 2000). Sendo assim, a intensa esporulação observada pode ter induzido uma maior produção de proteases, entre as quais, uma capaz de hidrolisar a OTA.

De forma a caracterizar melhor o enzima responsável pela actividade hidrolítica detectada, incubou-se o extracto de GT-OTA em presença dos inibidores EDTA e PMSF, tal como já havia sido efectuado com os preparados enzimáticos comerciais, tendo-se verificado que a actividade sobre a OTA foi inibida pelo EDTA (99%), mas não pelo PMSF (3,1%), à semelhança do que tinha sido observado com a CAP. Sendo assim, o enzima que hidrolisa a OTA necessita, como a CAP, de um ião metálico para exercer a sua actividade, tratando-se muito provavelmente de uma metalocarboxipeptidase semelhante a esta por ambos apresentarem, também, actividade peptídica sobre a OTA. Algumas carboxipeptidases têm sido isoladas a partir de *A. niger*, no entanto, todas elas são serina carboxipeptidases (Kumagai *et al.*, 1981; Krishnan & Vijayalakshmi, 1986; Dal Degan *et al.*, 1992).

Procurou-se, ainda, purificar o enzima responsável pela degradação da OTA presente no extracto enzimático obtido a partir de GT-OTA, tendo-se utilizado, para tal, uma resina de troca aniónica. Depois de purificado, o enzima apresentou, a pH 7,5, uma actividade específica de 35,8 U/mg de proteína, tendo-se obtido um factor de purificação final de 2,5 vezes com uma taxa de recuperação de 67,9%. Contudo, o aumento de purificação relativamente à precipitação com acetona foi bastante reduzido. Seria, por isso, aconselhável uma purificação adicional utilizando outro tipo de resina ou outro processo cromatográfico (*e.g.* exclusão molecular) para aumentar o grau de purificação. O enzima em causa apresentou um K_m de $476,3 \pm 30,77 \mu\text{M}$ e um V_{\max} de $0,440 \pm 0,0085 \mu\text{M}/\text{min}$ quando testado a pH 7,5 e 37 °C.

Finalmente, procurou-se avaliar se alguns dos preparados comerciais e o extracto isolado a partir de *A. niger* poderiam contribuir para a diminuição da OTA presente em mostos. Tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, apenas a Prolyve PAC poderia ser capaz de hidrolisar a OTA presente no mosto, uma vez que o pH desta matriz se situa, normalmente, entre os 3 e os 4 (Colagrande *et al.*, 1994). No entanto, testamos, também, 2 preparados enológicos e o extracto enzimático de GT-OTA. Verificamos que nenhum deles foi capaz de reduzir os conteúdos de OTA presentes no mosto, o que nos leva a concluir que não teriam qualquer utilidade na eliminação ou redução dos níveis de OTA em produtos alimentares ácidos como o vinho ou sumos de frutas.

Dado que o pH óptimo do enzima isolado a partir de *A. niger* é de 7,5, outro tipo de matrizes alimentares poderão ser mais apropriadas para uma possível aplicação. Por exemplo, produtos cárneos derivados de porco, como salsichas, patés, fiambres ou enchidos, uma vez que diversos produtos deste género se encontram, por vezes, contaminados com OTA

(Jiménez *et al.*, 2001; Monaci *et al.*, 2005; Pietri *et al.*, 2006) devido à presença de resíduos desta micotoxina em rins, fígado, sangue e carne de porco (Marquardt *et al.*, 1988; Jørgensen & Petersen, 2002; Monaci *et al.*, 2004). A aplicação do enzima durante o processamento de rações ou a sua utilização como aditivo na alimentação de porcos ou aves pode ser também uma possível aplicação a ser estudada, uma vez que a OTA provoca perdas na produtividade pecuária destes animais e na qualidade dos produtos processados obtidos a partir destes (Malagutti *et al.*, 2005).

É possível encontrar, na literatura disponível, algumas referências sobre enzimas que são capazes de destoxificar outras micotoxinas e sobre as suas respectivas aplicações. Nomeadamente, existe descrito o isolamento e purificação de um enzima, a partir do fungo *Armillariella tabescens*, que é capaz de destoxificar a aflatoxina B₁ (Liu *et al.*, 2001), no entanto, não existe qualquer aplicação deste enzima a nível prático, tanto quanto nos é conhecido. Existe descrito, também, o isolamento de dois enzimas, a partir dos fungos *Exophiala spinifera* e *Rhinochrysiella atrovirens* e a partir da bactéria ATCC 55552, que são capazes de destoxificar a fumonisina B₁ (Duvick *et al.*, 1998), tendo as sequências genéticas que codificam para estes enzimas sido utilizadas na produção de milho geneticamente modificado, que é capaz de destoxificar esta micotoxina (Duvick, 2001). Existe, ainda, descrito o isolamento e purificação de uma lactono-hidrolase a partir do fungo *Clonostachys rosea*, que é capaz de destoxificar a zearalenona (Takahashi-Ando *et al.*, 2002), tendo, também, a sequência genética que codifica para este enzima sido utilizada na produção de plantas transgênicas de arroz e de trigo com capacidade para destoxificar esta micotoxina (Higa *et al.*, 2003; Higa-Nishiyama *et al.*, 2005). Como já vimos na introdução geral desta dissertação, o desenvolvimento de plantas transgênicas constitui uma boa estratégia de prevenção para reduzir os níveis de micotoxinas em certas culturas (Wu, 2006). Deste ponto de vista, o isolamento do enzima capaz de hidrolisar a OTA a partir do fungo *A. niger* e apresentado nesta dissertação pode constituir, desde que se consiga identificar a sequência genética que o codifica, um recurso para grupos de trabalho que desenvolvem estas tecnologias. Neste caso, o trigo ou o centeio seriam as culturas alvo mais indicadas, dada a conhecida presença da OTA nestes produtos agrícolas e dado serem dos cereais que mais contribuem para o consumo diário de OTA por parte da população humana (EC, 2002a).

Outra situação que poderia ser explorada, tendo em conta alguns dos resultados que obtivemos, prende-se com a carboxipeptidase W do trigo. Esta é uma serina carboxipeptidase semelhante à CPY, que possui actividade óptima a pH 4,0 (Umetsu *et al.*, 1997) e seria

interessante avaliar a sua actividade sobre a OTA, uma vez que se verificou que a CPY foi capaz de degradar esta micotoxina. Seria, também, interessante testar outras serina carboxipeptidases de origem microbiana, nomeadamente, algumas produzidas pelo fungo *A. niger*, uma vez que a actividade hidrolítica detectada no preparado enzimático Prolyve PAC a pH 3,0 e inibida pelo PMSF pode, muito provavelmente, dever-se a uma carboxipeptidase deste tipo. No entanto, e tanto quanto sabemos, estas não são comercializadas, portanto qualquer estudo desta natureza teria de envolver a produção e purificação das mesmas.

Em conclusão, verificou-se que alguns preparados enzimáticos comerciais são capazes de hidrolisar a OTA. No entanto, estes apresentaram actividades específicas muito baixas, o que os torna muito pouco interessantes para aplicações em processos de descontaminação alimentar. Verificou-se, também, que o enzima CPY foi capaz de hidrolisar esta micotoxina, tendo este apresentando actividade máxima a pH 5,6 e uma actividade específica baixa quando comparado com a CPA. Conseguiu-se, para além disso, produzir, isolar e purificar um enzima que hidrolisa a OTA a partir de uma das estirpes de *A. niger* que foram testadas no capítulo 2. Este apresentou actividade máxima a pH 7,5 e uma actividade específica bastante elevada (35,8 U/mg), cerca de 13 vezes superior à da CPA ao mesmo pH. Verificou-se, ainda, que a sua aplicação para a descontaminação de produtos alimentares ácidos como o mosto de uvas não é viável.

Capítulo IV

Actividade biológica de novos compostos com potencial antifúngico e de Na₂EDTA em *Aspergillus* spp.

4.1 Introdução

A procura de novos compostos antifúngicos é uma necessidade constante, uma vez que existem cada vez mais pressões da sociedade no sentido de se utilizarem agentes químicos que possam ser aplicados em menores quantidades e que, ao mesmo tempo, possuam maior actividade antifúngica, menores impactos ambientais e baixa toxicidade para o ser humano e a vida selvagem. Existe, para além disso, a necessidade de compostos com novos modos de acção e uma eficiência melhorada de forma a combaterem fungos patogénicos resistentes ou com reduzida sensibilidade aos tratamentos actuais.

A utilização de fungicidas procura a inibição do crescimento fúngico de forma a evitar a deterioração dos produtos agrícolas no campo ou quando armazenados. No entanto, quando os fungos estão presentes, as micotoxinas são um tema que não pode ser, de todo, esquecido. Publicações recentes relacionam a aplicação de alguns fungicidas com o aumento da presença de algumas micotoxinas, como já foi referido no capítulo 1.

Com o trabalho apresentado neste capítulo procurou-se encontrar compostos que fossem capazes de inibir o crescimento fúngico de algumas espécies ocratoxigénicas isoladas a partir de uvas, e que fossem também capazes de reduzir a produção de OTA. Para tal:

- testaram-se uma série de novos compostos, sintetizados no Departamento de Química da Universidade do Minho, que evidenciavam potencial como antifúngicos dado as suas estruturas químicas;
- testou-se o composto Na₂EDTA, pois é muito utilizado na formulação de produtos agro-químicos sem que o seu efeito antifúngico seja claramente conhecido.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Actividade biológica de novos compostos com potencial antifúngico

4.2.1.1 Compostos químicos

Os compostos testados foram sintetizados, caracterizados quimicamente e gentilmente cedidos pelo grupo de investigação da Professora Doutora Fernanda Proença do Departamento de Química da Universidade do Minho. Inicialmente efectuou-se um rastreio a 20 compostos (Tabela 4.2.1); no entanto, atendendo aos resultados promissores obtidos com o composto **4a**, fez-se um rastreio adicional com os seus precursores sintéticos (Tabela 4.2.2). Todos eles foram dissolvidos em DMSO antes de serem adicionados aos meios de cultura na concentração adequada.

Tabela 4.2.1 Códigos, fórmula molecular e peso molecular dos compostos testados nos primeiros ensaios

Composto	Código Original	Fórmula molecular ^a	Peso Molecular
4a	FMA 719-5.2F	C ₂₀ H ₁₂ N ₄ O ₂	340,34
5	Mz 339	C ₁₅ H ₁₅ N ₅ O ₂	297,32
6	Mz 339-DB4	C ₁₅ H ₁₅ N ₅ O ₂	297,32
7	Mz 372	C ₁₈ H ₁₃ N ₅ O ₃	347,33
8	Mz 373	C ₁₈ H ₁₃ N ₅ O ₃	347,33
9	Mz 392	C ₁₉ H ₁₅ N ₅ O ₂	345,36
10	Mz 392-DB4	C ₁₉ H ₁₅ N ₅ O ₂	345,36
11	Mz 394	C ₁₉ H ₁₅ N ₅ O ₃	361,36
12	Mz 254	C ₁₉ H ₁₆ N ₆ O ₂	312,33
13	Mz 381	C ₁₆ H ₁₈ N ₆ O ₂	326,36
14	E 483	C ₁₁ H ₁₀ N ₄ O	214
15	E 482	C ₁₁ H ₁₀ N ₄ O	214
16	E 492	C ₁₁ H ₁₀ N ₄ O	214
17	R 484	C ₁₂ H ₁₂ N ₆ O ₂	272
18	R 182	C ₁₄ H ₁₄ N ₆ O ₂	298
19	R 99	C ₁₇ H ₂₀ N ₆ O ₂	340
20	CC 276	C ₁₉ H ₂₇ N ₅ O ₄	379
21	CC 278	C ₁₈ H ₁₄ N ₅ O ₃	348
22	CC 277	C ₁₉ H ₁₆ N ₅ O ₃	361,36
23	CC 229	C ₁₁ H ₁₀ N ₄ O ₂	230

^a determinadas por análise elementar com um instrumento LECO CHNS-932.

Tabela 4.2.2 Códigos, fórmula molecular e peso molecular dos derivados de cromeno testados nos ensaios subsequentes

Composto	Código Original	Fórmula Química ^a	Peso Molecular
2a	FMA 718	C ₁₃ H ₈ N ₄ O	236,23
2b	M 66	C ₁₄ H ₁₀ N ₄ O ₂	266,26
3a	M 92-R2	C ₁₀ H ₆ NO	170,17
3b	M 121	C ₁₁ H ₈ N ₂ O ₂	200,20
4a	FMA 719-5.2F	C ₂₀ H ₁₂ N ₄ O ₂	340,34
4b	M 31	C ₂₂ H ₁₆ N ₄ O ₄	400,40

^adeterminadas por análise elementar com um instrumento LECO CHNS-932.

Na Figura 4.2.1 estão representadas as vias de síntese do composto **4a**, da estrutura análoga **4b** e dos seus precursores **2** e **3**. Na Tabela 4.2.3 referem-se algumas propriedades físicas adicionais destes compostos. É importante realçar que as espécies **a** e **b** diferem apenas no substituinte que possuem em C8 do anel de cromeno e que os compostos **4** correspondem a novas estruturas diméricas.

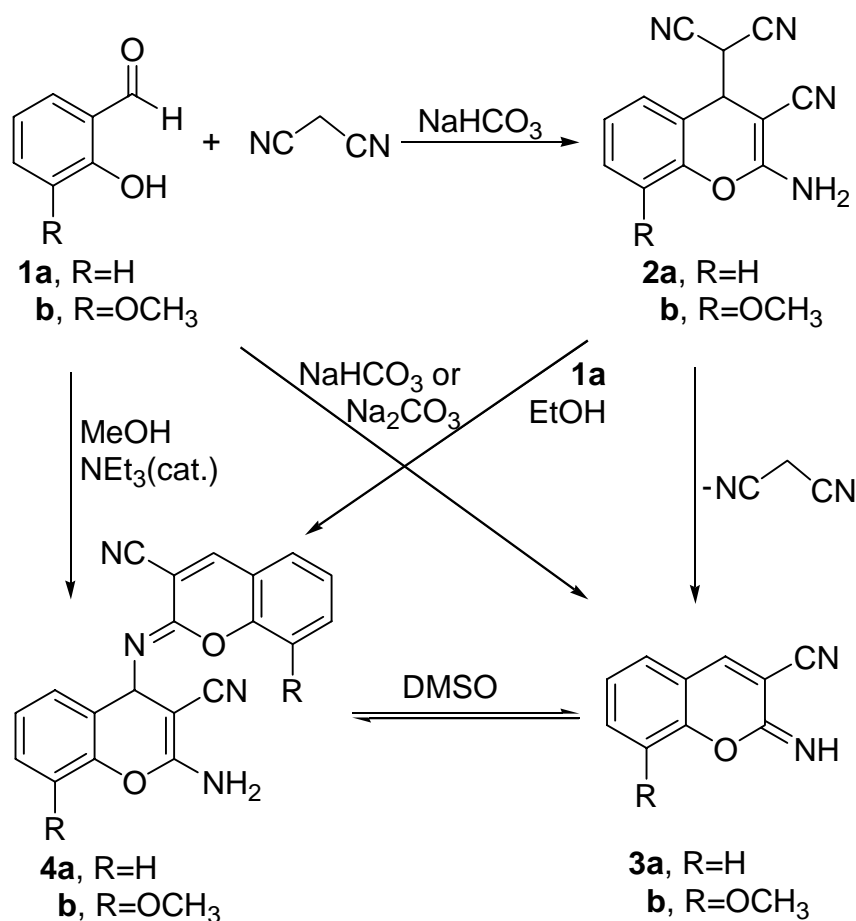


Figura 4.2.1 Vias de síntese dos compostos **2**, **3** e **4**.

Tabela 4.2.3 Propriedades físicas e análise elementar dos compostos **2, 3 e 4**

Comp	R	Pf (°C) ^a	IR (cm ⁻¹) ^b	Fórmula ^c	Análise elementar (%) ^c (valores calculados) [valores obtidos]		
					C	H	N
2a	H	152-153	2195(i), 2144(f), 1644(i), 1615(f), 1603(m), 1576(i)	C ₁₃ H ₈ N ₄ O.0,1H ₂ O	(66,1) [66,0]	(3,4) [3,5]	(23,7) [23,7]
2b	OCH ₃	168-169	2253(f), 2192(i) 1642(i), 1614(i), 1602(i), 1583(i)	C ₁₄ H ₁₀ N ₄ O ₂ .0,1H ₂ O	(63,2) [63,1]	(3,7) [3,8]	(21,1) [20,9]
3a	H	169-171	2232(m), 1654(m), 1609(m), 1601(m), 1567(f)	C ₁₀ H ₆ NO.0,1H ₂ O	(69,8) [70,1]	(3,5) [3,5]	(16,3) [16,1]
3b	OCH ₃	166-170	2229(m), 1650(m), 1609(m), 1574(f)	C ₁₁ H ₈ N ₂ O ₂ .0,1H ₂ O	(65,4) [65,5]	(4,0) [4,2]	(13,9) [13,8]
4a	H	165-168	2225(m), 2196(i) 1668(m), 1650(i), 1610(m), 1600(i), 1578(m)	C ₂₀ H ₁₂ N ₄ O ₂ .0,1H ₂ O	(70,2) [70,2]	(3,6) [3,6]	(16,4) [16,6]
4b	OCH ₃	150-152	2227(m), 2189(i) 1642(i), 1602(m), 1585(m)	C ₂₂ H ₁₆ N ₄ O ₄ .C ₂ H ₆ SO . 0,5H ₂ O	(59,14) [59,18]	(4,72) [5,03]	(11,50) [11,74]

^a determinado com um instrumento Gallenkamp, valores não corrigidos.

^b determinado com um espectrofotómetro FT-IR Bomem-MB104, mull de Nujol em células de NaCl.

^c determinado com um instrumento LECO CHNS-932.

Banda: (i) – intensa; (m) – média; (f) – fraca.

4.2.1.2 Material biológico

Utilizaram-se as estirpes produtoras de ocratoxina A, *Aspergillus alliaceus* MUM 03.55, *A. carbonarius* MUM 03.59 e *A. ochraceus* MUM 03.56. Utilizou-se também a estirpe não produtora de ocratoxina A, *Aspergillus niger* MUM 03.58. Estas estirpes foram isoladas a partir de uvas, identificadas e caracterizadas por Serra *et al.* (2003).

4.2.1.3 Preparação do inóculo

As estirpes utilizadas foram crescidas em placas de petri com o meio de cultura *Malt extract agar* (MEA) durante 7 dias a 25 °C no escuro. A partir destas, prepararam-se suspensões de esporos com $2,5 \times 10^6$ esporos/mL em agar semi sólido (0,2% de agar e 0,05% de Tween 80), tendo sido utilizada uma câmara de NeuBauer para o efeito.

MEA	Extracto de Malte	20 g/L
(formulação de Blakeslee)	Glucose	20 g/L
	Peptona	1 g/L
	Agar (Oxoid N° 3)	20 g/L

4.2.1.4 Inibição do crescimento radial de *Aspergillus* spp. em placa de petri

A actividade antifúngica dos compostos foi avaliada pelo método de diluição em agar (Mares *et al.*, 2004) utilizando os meios de cultura *Yeast extract sucrose* (YES), um meio rico em sacarose utilizado para induzir a síntese de metabolitos secundários, e *Synthetic nutrient medium* (SNM), um meio de cultura sintético que simula a composição das uvas.

Para tal, YES e SNM foram preparados, autoclavados a 121 °C durante 15 min e arrefecidos até atingirem os 50 °C. De seguida, os compostos foram adicionados de forma a obter meios de cultura com 50, 100 ou 200 µM e fracções de 20 mL foram plaqueadas em placas de petri de 9 cm de diâmetro. Como controlos, YES e SNM suplementados com igual volume de DMSO foram preparados da mesma forma.

As placas de petri foram centralmente inoculadas com 10 µL de suspensão de esporos ($2,5 \times 10^4$ esporos) e incubadas a 25 °C no escuro. Para cada composto e cada concentração *versus* cada estirpe realizaram-se três réplicas.

YES	Extracto de levedura (Difco)	20 g/L
	Sacarose	150 g/L
	Agar (Oxoid N° 3)	20 g/L
SNM	D(+)-glucose	70 g/L
	D(-)-fructose	30 g/L
	L(+)-tartaric acid	7 g/L
	L(-)-malic acid	10 g/L
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,67 g/L
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,67 g/L
	KH ₂ PO ₄	1,5 g/L
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,75 g/L
	NaCl	0,15 g/L
	CaCl ₂	0,15 g/L
	CuCl ₂	0,0015 g/L
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,021 g/L
	ZnSO ₄	0,0075 g/L
	(+) catechin	0,05 g/L
	Agar (Oxoid N° 3)	20 g/L
pH acertado a 4,2 com KOH (2 N)		

O diâmetro das colónias foi medido diariamente com uma régua ao longo de 6 dias. A média das três réplicas foi calculada e a representação gráfica do diâmetro das colónias em função dos dias foi efectuada. A taxa de crescimento radial foi obtida por regressão linear utilizando os dados que correspondem à fase exponencial de crescimento. A concentração de composto activo para a qual existe uma sobrevivência de 50% (EC₅₀) foi determinada por

ajuste dos dados experimentais à equação de Hill (função sigmoidal) utilizando o programa informático Prism 4, GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA (Motulsky & Christopoulos, 2003).

4.2.1.5 Inibição do crescimento de *Aspergillus* spp. pelo composto **4a** em microplaca

Com este procedimento pretendeu-se determinar a concentração mínima do composto **4a** necessária para inibir por completo a germinação dos fungos testados. Para tal, ensaios com concentrações de 0, 25, 50, 100, 200, 500, 1000 e 2000 μM de **4a** em meio YES líquido foram preparados da seguinte forma. Elaboraram-se soluções *stock* do composto **4a** com 0,5, 1, 2, 4, 10, 20 e 40 mM em DMSO e, para cada estirpe, inocularam-se 5 mL de meio YES líquido com $12,5 \times 10^4$ esporos/mL. Numa microplaca de 96 poços e em duplicado, misturaram-se 10 μL de DMSO (controlo) ou 10 μL de cada uma das soluções *stock* com 190 μL de meio YES líquido inoculado. Colocaram-se, também, 200 μL de meio YES líquido estéril em 8 poços da microplaca de forma a servirem de branco. A microplaca foi incubada a 25 °C no escuro durante 6 dias, tendo-se registado diariamente o aparecimento de micélio. De forma a avaliar e quantificar esse aparecimento atribuíram-se diferentes valores: 1 quando o poço se apresentou totalmente coberto por micélio, 0,5 quando metade do poço se apresentou coberto por micélio e 0,25 quando $\frac{1}{4}$ do poço se apresentou coberto por micélio.

YES (líquido)	Extracto de levedura (Difco)	20 g/L
	Sacarose	150 g/L

4.2.1.6 Inibição da produção de ocratoxina A em meio sólido

As placas de petri preparadas no ponto 4.2.1.4 com 50, 100 e 200 μM de **4a** e 200 μM de **2a**, **2b**, **3a**, **3b** e **4b** que foram inoculadas com as estirpes ocratoxigénicas *A. alliaceus*, *A. carbonarius* e *A. ochraceus* foram extraídas, depois de 6 dias a 25 °C no escuro, da seguinte forma.

O conteúdo de cada placa de petri (micélio e meio de cultura) foi cortado em pequenas porções com a ajuda de um bisturi estéril e transferido para um tubo de Greiner de 50 mL. De seguida, adicionaram-se 20 mL de metanol (Merck) a cada um dos tubos, agitou-se vigorosamente utilizando um vortex durante 1 min e deixou-se em repouso durante a noite. Na manhã seguinte, filtraram-se 3 mL de extracto por um filtro de seringa de PTFE com 0,45 μm de porosidade (Teknokroma) e evaporou-se 1 mL desse filtrado a 50 °C com a ajuda de uma ligeira corrente de azoto num frasco de vidro limpo. O resíduo seco foi ressuscitado em 1 mL de fase móvel, diluído quando necessário e analisado por HPLC para quantificar a

OTA. Utilizou-se, para tal, um sistema equipado por uma bomba Varian 9002, um detector de fluorescência Jasco FP-920 ($\lambda_{\text{ex}}= 333 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}}= 460 \text{ nm}$), um amostrador automático Marathon Basic e uma coluna C_{18} de fase reversa YMC-Pack ODS-AQ (250 x 4,6 mm e 5 μm) protegida por uma pré-coluna com o mesmo enchimento e mantida a 30 °C. A fase móvel, acetonitrilo/ H_2O /ácido acético (99:99:2, v/v/v), foi filtrada utilizando um filtro de 0,2 μm (GHP, Gelman) e desgaseificada. Utilizou-se um caudal de 0,8 mL/min e um volume de injeção de 100 μL . Elaboraram-se, regularmente, curvas de calibração utilizando padrões de OTA (Sigma) como descrito no capítulo 2.

4.2.1.7 Inibição da produção de ocratoxina A em meio líquido

Preparou-se meio YES e SNM líquidos, suplementados com 50, 100 e 200 μM de composto **4a** e colocaram-se porções de 5 mL em tubos de vidro universais esterilizados. Como controlos, prepararam-se tubos com 5 mL de YES suplementado com igual volume de DMSO. Para cada concentração de **4a**, inocularam-se 3 tubos com 10 μL de solução de esporos do *A. alliaceus* MUM 03.55 preparada como descrito atrás. Os tubos foram incubados inclinados, de forma a aumentar a superfície de crescimento, a 25 °C no escuro. Após 6 dias de incubação, a OTA foi extraída utilizando o procedimento que se segue.

Em cada um dos tubos de vidro adicionou-se 1 mL de HCl (2 N) e extraiu-se o meio de cultura juntamente com o micélio utilizando clorofórmio (por três vezes utilizando 5 mL e por duas utilizando 3 mL). De cada vez e depois de adicionado o clorofórmio, os tubos foram fortemente agitados durante 1 min utilizando o vortex e de seguida centrifugados a 4000 RCF durante 2 min a 4 °C (Megafuge 1.0R, Heraeus) de forma a permitir uma boa separação das fases. O clorofórmio foi recolhido e evaporado a 50 °C com a ajuda de uma ligeira corrente de azoto num frasco de vidro limpo. O resíduo seco foi ressuspendido em 1 mL de fase móvel, filtrado por um filtro de seringa de 0,45 μm (Teknokroma), diluído quando necessário e analisado por HPLC para quantificar a OTA utilizando o procedimento descrito no ponto anterior.

4.2.1.8 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância e as médias comparadas, *a posteriori*, pelos testes de Dunnett e de Ducan utilizando o programa informático SPSS (*Statistic Package for Social Sciences* vrs. 15.0 para Windows).

4.2.2 Actividade biológica de Na₂EDTA

4.2.2.1 Composto químico

Ácido etilenodiaminotetraacético na forma de sal dissódico comercializado como Titriplex III (Merck).

4.2.2.2 Material biológico

Utilizaram-se as estirpes produtoras de ocratoxina A, *A. carbonarius* MUM 03.59 e *A. niger* MUM 03.57. Utilizaram-se também as estirpes não produtoras de ocratoxina A, *A. ibericus* MUM 03.49 e *Aspergillus niger* MUM 03.58. Estas estirpes foram isoladas a partir de uvas, identificadas e caracterizadas por Serra *et al.* (2003).

4.2.2.3 Preparação do inóculo

As estirpes utilizadas foram crescidas em placas de petri com o meio de cultura MEA durante 7 dias a 25 °C no escuro. A partir destas, prepararam-se suspensões de esporos com $2,5 \times 10^6$ esporos/mL em agar semi sólido (0,2% de agar e 0,05% de Tween 80), tendo sido utilizada uma câmara de Neubauer para o efeito.

4.2.2.4 Inibição do crescimento de *Aspergillus* spp. pelo Na₂EDTA

A actividade antifúngica do Na₂EDTA foi avaliada pelo método de diluição em agar (Mares *et al.*, 2004) utilizando o meio de cultura *Czapek yeast autolysate* (CYA). Preparou-se meio de cultura sem Na₂EDTA (CYA) e com 1 e 10 mM de Na₂EDTA (respectivamente, CYA+1mM e CYA+10mM), autoclavaram-se a 121 °C durante 15 min e plaquearam-se fracções de 20 mL em placas de petri de 9 cm de diâmetro. As placas foram centralmente inoculadas com 10 µL de suspensão de esporos ($2,5 \times 10^4$ esporos) e incubadas a 25 °C no escuro. Para cada concentração de Na₂EDTA *versus* cada estirpe realizaram-se três réplicas.

CYA	Sacarose	30 g/L
	Extracto de levedura	5 g/L
	Solução K ₂ HPO ₄	50 mL/L
	Concentrado de Czapek	10 mL/L
	Solução de metais traço	1 mL/L
	Agar (Oxoid N°3)	15 g/L
	pH 6,7	
Solução de K ₂ HPO ₄	K ₂ HPO ₄	20 g
	H ₂ O	1000 mL
Solução de metais traço	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1 g
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,5 g
	H ₂ O	100 mL

Concentrado de Czapek	NaNO ₃	30 g
	KCl	5 g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	5 g
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
	H ₂ O	100 mL

O diâmetro das colónias foi medido diariamente com uma régua ao longo de 8 dias. A média das três réplicas foi calculada e a representação gráfica do diâmetro das colónias em função dos dias foi efectuada. A taxa de crescimento radial foi obtida por regressão linear dos dados que correspondem à fase logarítmica de crescimento. A concentração de Na₂EDTA para a qual existe uma sobrevivência de 50% (EC₅₀) foi determinada por ajuste dos dados experimentais à equação de Hill (função sigmoideal) utilizando o programa informático Prism 4, GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA (Motulsky & Christopoulos, 2003).

4.2.2.5 Inibição da produção de ocratoxina A em meio sólido

Acompanhou-se a produção de OTA pelo *A. carbonarius* MUM 03.59 e pelo *A. niger* MUM 03.57 na presença de Na₂EDTA e ao longo do tempo. Para tal, como já descrito, prepararam-se placas de petri com CYA, CYA+1mM e CYA+10mM, inocularam-se 15 réplicas para cada estirpe *versus* cada concentração de Na₂EDTA e incubaram-se a 25 °C no escuro. Ao fim de 0, 2, 4, 6 e 8 dias de incubação, extraíram-se 3 das 15 réplicas e quantificou-se a OTA por HPLC seguindo o procedimento descrito em 4.2.1.6.

4.2.2.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância e as médias comparadas, *a posteriori*, pelo teste de Duncan utilizando o programa informático SPSS (*Statistic Package for Social Sciences* vrs. 15.0 para *Windows*).

4.3 Resultados

4.3.1 Actividade biológica de novos compostos com potencial antifúngico

4.3.1.1 Inibição do crescimento radial de *Aspergillus* spp. em placa de petri

Numa primeira abordagem e de forma a seleccionar os compostos mais activos, efectuaram-se ensaios com o composto **4a** e os compostos **5** a **23** utilizando apenas o meio YES. Na Tabela 4.3.1 podem-se encontrar as taxas de crescimento radial das estirpes *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. alliaceus* e *A. ochraceus* quando crescidas na presença de 50 µM desses compostos. Essas taxas foram comparadas com os respectivos controlos utilizando o teste de Dunett ($P < 0,001$) de forma a determinar reduções significativas do crescimento.

Tabela 4.3.1 Taxa de crescimento radial das estirpes em YES com 50 µM dos compostos testados

Composto	Taxa de crescimento radial (cm/dia)			
	<i>A. niger</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. alliaceus</i>	<i>A. ochraceus</i>
Controlo	1,71 ±0,02	2,19 ±0,02	1,98 ±0,02	1,32 ±0,01
4a	1,21 ±0,002*	2,18 ±0,01	1,19 ±0,01*	1,25 ±0,02*
5	1,81 ±0,03	2,14 ±0,01	1,95 ±0,03	1,26 ±0,02*
6	1,79 ±0,05	2,15 ±0,02	1,93 ±0,01	1,26 ±0,003*
7	1,73 ±0,04	2,13 ±0,02	1,87 ±0,03*	1,25 ±0,02*
8	1,59 ±0,02*	2,07 ±0,02*	1,91 ±0,03*	1,24 ±0,01*
9	1,65 ±0,02	2,20 ±0,03	1,91 ±0,01*	1,28 ±0,003
10	1,60 ±0,04*	2,16 ±0,02	1,92 ±0,02	1,27 ±0,004*
11	1,68 ±0,02	2,21 ±0,03	1,92 ±0,02	1,28 ±0,01
12	1,61 ±0,02*	2,17 ±0,03	1,97 ±0,02	1,32 ±0,01
13	1,63 ±0,003	2,18 ±0,003	1,96 ±0,003	1,32 ±0,01
14	1,62 ±0,03	2,18 ±0,02	1,97 ±0,02	1,33 ±0,002
15	1,60 ±0,01*	2,16 ±0,02	1,93 ±0,01	1,33 ±0,02
16	1,63 ±0,04	2,16 ±0,02	1,90 ±0,03*	1,33 ±0,003
17	1,81 ±0,03	2,24 ±0,04	1,98 ±0,04	1,34 ±0,01
18	1,65 ±0,02	2,17 ±0,03	1,95 ±0,02	1,32 ±0,02
19	1,67 ±0,05	2,14 ±0,02	2,01 ±0,02	1,30 ±0,01
20	1,62 ±0,01	2,21 ±0,01	1,92 ±0,02	1,34 ±0,003
21	1,65 ±0,003	2,15 ±0,02	1,93 ±0,01	1,31 ±0,02
22	1,65 ±0,003	2,19 ±0,01	1,94 ±0,01	1,34 ±0,02
23	1,64 ±0,02	2,19 ±0,02	1,95 ±0,01	1,37 ±0,02

Os valores apresentados são a média de três réplicas ± desvio padrão.

* Diferentes do respectivo controlo para $P < 0,001$ segundo o teste de Dunett.

Verificou-se que alguns compostos inibiram significativamente a taxa de crescimento radial dos diferentes fungos testados e que o maior efeito foi verificado com o composto **4a**. O *A. alliaceus* foi o mais sensível ao composto **4a**, tendo o seu crescimento radial sido reduzido de 1,98 para 1,19 cm/dia. O crescimento do *A. niger* foi reduzido de 1,71 para 1,21 cm/dia e o do *A. ochraceus* de 1,32 para 1,25 cm/dia. O crescimento do *A. carbonarius* não foi significativamente afectado por este composto. Em termos percentuais, o composto **4a** reduziu a taxa de crescimento radial do *A. niger* em 29,2%, do *A. alliaceus* em 39,9% e do *A. ochraceus* em 5,3% (Tabela 4.3.2). Quanto aos outros compostos, inibições do crescimento de algumas estirpes, não superiores a 7%, foram observadas.

As medições diárias dos diâmetros das colónias referentes a estes ensaios podem ser consultadas nas Tabela A-4.1 a A-4.21 no anexo a este capítulo.

Tabela 4.3.2 Inibição da taxa de crescimento radial relativamente aos controlos

Composto	(μM)	Inibição da taxa de crescimento radial (%)			
		<i>A. niger</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. alliaceus</i>	<i>A. ochraceus</i>
4a	50	29,2	-	39,9	5,3
5	50	-	-	-	4,5
6	50	-	-	-	4,5
7	50	-	-	5,6	5,3
8	50	7,0	5,5	3,5	6,1
9	50	-	-	3,5	-
10	50	6,4	-	-	3,8
12	50	5,8	-	-	-
15	50	6,4	-	-	-
16	50	-	-	4,0	-

- sem inibição significativa do crescimento.

Dado os resultados obtidos com o composto **4a** procurou-se, numa segunda fase, avaliar o efeito de concentrações mais elevadas deste composto e o efeito dos seus precursores sintéticos **2a** e **3a**. Testou-se também o composto **4b**, um análogo estrutural de **4a** que difere apenas deste por possuir o grupo metoxi (OCH₃) em C8 e seus precursores sintéticos **2b** e **3b**. Estes foram testados utilizando os meios YES e SNM.

Na Tabela 4.3.3 podem-se encontrar as taxas de crescimento radial dos fungos testados quando crescidos no meio YES suplementado com 50, 100 e 200 μM de cada um destes compostos. Neste caso, utilizou-se o teste de Ducan (P<0,001) para verificar as diferenças significativas entre os dados obtidos. Este teste permitiu comparar as diferentes taxas de crescimento não apenas com os respectivos controlos mas também entre si, possibilitando

assim, verificar se existiam diferenças significativas entre as 3 concentrações utilizadas. As medições diárias dos diâmetros das colónias referentes a estes ensaios podem ser consultadas nas Tabela A-4.22 a A-4.42 no anexo a este capítulo.

Tabela 4.3.3 Taxa de crescimento radial das estirpes testadas em YES suplementado com 50, 100 e 200 μM dos compostos **2a**, **3a**, **4a**, **2b**, **3b** e **4b**

Composto	(μM)	Taxa de crescimento radial (cm/dia)			
		<i>A. niger</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. alliaceus</i>	<i>A. ochraceus</i>
Controlo		2,13 \pm 0,05 ^a	2,22 \pm 0,03 ^a	2,05 \pm 0,02 ^a	1,45 \pm 0,02 ^a
4a	50	1,28 \pm 0,02 ^d	2,18 \pm 0,03 ^b	1,14 \pm 0,003 ^c	1,33 \pm 0,02 ^b
	100	1,13 \pm 0,02 ^e	1,98 \pm 0,04 ^c	1,01 \pm 0,02 ^c	1,26 \pm 0,02 ^c
	200	1,04 \pm 0,02 ^e	1,70 \pm 0,02 ^d	0,80 \pm 0,02 ^d	1,08 \pm 0,02 ^d
3a	50	2,11 \pm 0,02 ^a	2,21 \pm 0,01 ^{a,b}	1,97 \pm 0,02 ^{a,b}	1,41 \pm 0,02 ^a
	100	2,12 \pm 0,02 ^a	2,21 \pm 0,02 ^{a,b}	1,94 \pm 0,02 ^b	1,43 \pm 0,01 ^a
	200	2,06 \pm 0,02 ^{a,b}	2,21 \pm 0,02 ^{a,b}	1,91 \pm 0,04 ^b	1,44 \pm 0,01 ^a
2a	50	1,98 \pm 0,06 ^b	2,27 \pm 0,02 ^a	1,98 \pm 0,03 ^{a,b}	1,44 \pm 0,01 ^a
	100	1,94 \pm 0,02 ^b	2,27 \pm 0,02 ^a	1,98 \pm 0,01 ^{a,b}	1,44 \pm 0,01 ^a
	200	1,80 \pm 0,03 ^c	2,21 \pm 0,02 ^{a,b}	1,86 \pm 0,02 ^b	1,41 \pm 0,01 ^a
4b	50	2,03 \pm 0,02 ^{a,b}	2,17 \pm 0,02 ^b	2,00 \pm 0,02 ^{a,b}	1,41 \pm 0,02 ^a
	100	2,00 \pm 0,02 ^{a,b}	2,22 \pm 0,04 ^a	1,98 \pm 0,01 ^{a,b}	1,40 \pm 0,03 ^a
	200	1,83 \pm 0,05 ^{b,c}	2,14 \pm 0,02 ^b	2,02 \pm 0,04 ^{a,b}	1,33 \pm 0,05 ^b
3b	50	2,03 \pm 0,04 ^{a,b}	2,21 \pm 0,02 ^{a,b}	2,04 \pm 0,03 ^a	1,45 \pm 0,03 ^a
	100	2,09 \pm 0,01 ^{a,b}	2,21 \pm 0,02 ^{a,b}	2,06 \pm 0,02 ^a	1,44 \pm 0,01 ^a
	200	1,93 \pm 0,03 ^b	2,14 \pm 0,02 ^b	2,03 \pm 0,04 ^{a,b}	1,41 \pm 0,03 ^a
2b	50	2,14 \pm 0,03 ^a	2,21 \pm 0,02 ^{a,b}	2,06 \pm 0,02 ^a	1,42 \pm 0,02 ^a
	100	2,10 \pm 0,08 ^{a,b}	2,20 \pm 0,02 ^{a,b}	2,09 \pm 0,02 ^a	1,44 \pm 0,02 ^a
	200	2,04 \pm 0,02 ^{a,b}	2,19 \pm 0,01 ^b	2,11 \pm 0,06 ^a	1,38 \pm 0,03 ^{a,b}

Os valores apresentados são a média de três réplicas \pm desvio padrão. Em cada coluna, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para $P < 0,001$ segundo o teste de Duncan.

Verificou-se, novamente, que as maiores reduções no crescimento das colónias foram produzidas pelo composto **4a**. A estirpe de *A. alliaceus* foi a mais sensível a este composto, tendo a sua taxa de crescimento radial sido reduzida de 2,05 cm/dia para 1,14, 1,01 e 0,80 cm/dia na presença, respectivamente de 50, 100 e 200 μM de **4a**. A estirpe de *A. carbonarius* foi a menos sensível, tendo-se verificado reduções da sua taxa de crescimento de 2,22 cm/dia para 2,18, 1,98 e 1,70 cm/dia na presença, respectivamente de 50, 100 e 200 μM deste composto. Os compostos **3a**, **2a**, **3b** e **2b** apenas produziram uma ligeira diminuição das taxas de crescimento de algumas das estirpes testadas.

Na Tabela 4.3.4 apresenta-se, em percentagem, a inibição da taxa de crescimento radial de forma a comparar e compreender melhor o efeito antifúngico de cada composto. Como se pode observar, o composto **4a** apresentou de facto um efeito bastante superior ao dos outros compostos. Este inibiu o crescimento da estirpe de *A. niger* em 51,2%, de *A. carbonarius* em 23,4%, de *A. alliaceus* em 61% e de *A. ochraceus* em 25,5% quando utilizado na concentração de 200 μM . Por outro lado, o composto **4b** apresentou um efeito antifúngico bastante menor. Este inibiu o crescimento da estirpe de *A. niger* em apenas 14,1%, de *A. carbonarius* em 3,6% e de *A. ochraceus* em 8,3% quando também utilizado na concentração de 200 μM . O composto **4b** é um análogo de **4a** que difere deste porque possui o grupo metoxi (OCH_3) em C8. As diferenças de actividade antifúngica detectadas entre estes dois análogos podem ser devidas a esse grupo funcional. No entanto, é também possível que os resultados obtidos com **4b** estejam subavaliados, uma vez que estudos posteriores feitos no Departamento de Química demonstraram que o composto **4b** é pouco estável em DMSO. Este perde muito rapidamente a sua conformação dimérica quando é solubilizado neste solvente e converte-se em **3b**. Uma vez que se dissolveram os compostos em DMSO antes de terem sido adicionados aos meios de cultura, a actividade antifúngica de **4b** pode ser efectivamente maior do que a observada.

Tabela 4.3.4 Inibição da taxa de crescimento radial relativamente aos controlos em YES

Composto	(μM)	Inibição da taxa de crescimento radial (%)			
		<i>A. niger</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. alliaceus</i>	<i>A. ochraceus</i>
4a	50	39,9	1,8	44,4	8,3
	100	46,9	10,8	50,7	13,1
	200	51,2	23,4	61,0	25,5
3a	50	-	-	-	-
	100	-	-	5,4	-
	200	-	-	6,8	-
2a	50	7,0	-	-	-
	100	8,9	-	-	-
	200	15,5	-	9,3	-
4b	50	-	2,3	-	-
	100	-	-	-	-
	200	14,1	3,6	-	8,3
3b	50	-	-	-	-
	100	-	-	-	-
	200	9,4	3,6	-	-
2b	50	-	-	-	-
	100	-	-	-	-
	200	-	1,4	-	-

- sem inibição significativa do crescimento.

De entre os outros compostos, a inibição mais significativa foi observada com o composto **2a**. 200 μM inibiram o crescimento da estirpe de *A. niger* em 15,5% e de *A. alliaceus* em 9,3%. A mesma concentração de **3a** inibiu a estirpe de *A. alliaceus* em apenas 6,8%. A reduzida actividade antifúngica dos compostos **2a** e **3a** sugere que a estrutura dimérica de **4a** é fundamental para o efeito produzido por este composto. Os compostos **3b** e **2b** não produziram inibições de crescimento acima dos 9%.

A inibição do crescimento radial das colónias pelo composto **4a**, ao fim de 4 dias de incubação a 25 °C no escuro, pode ser visualizado na Figura 4.3.1.

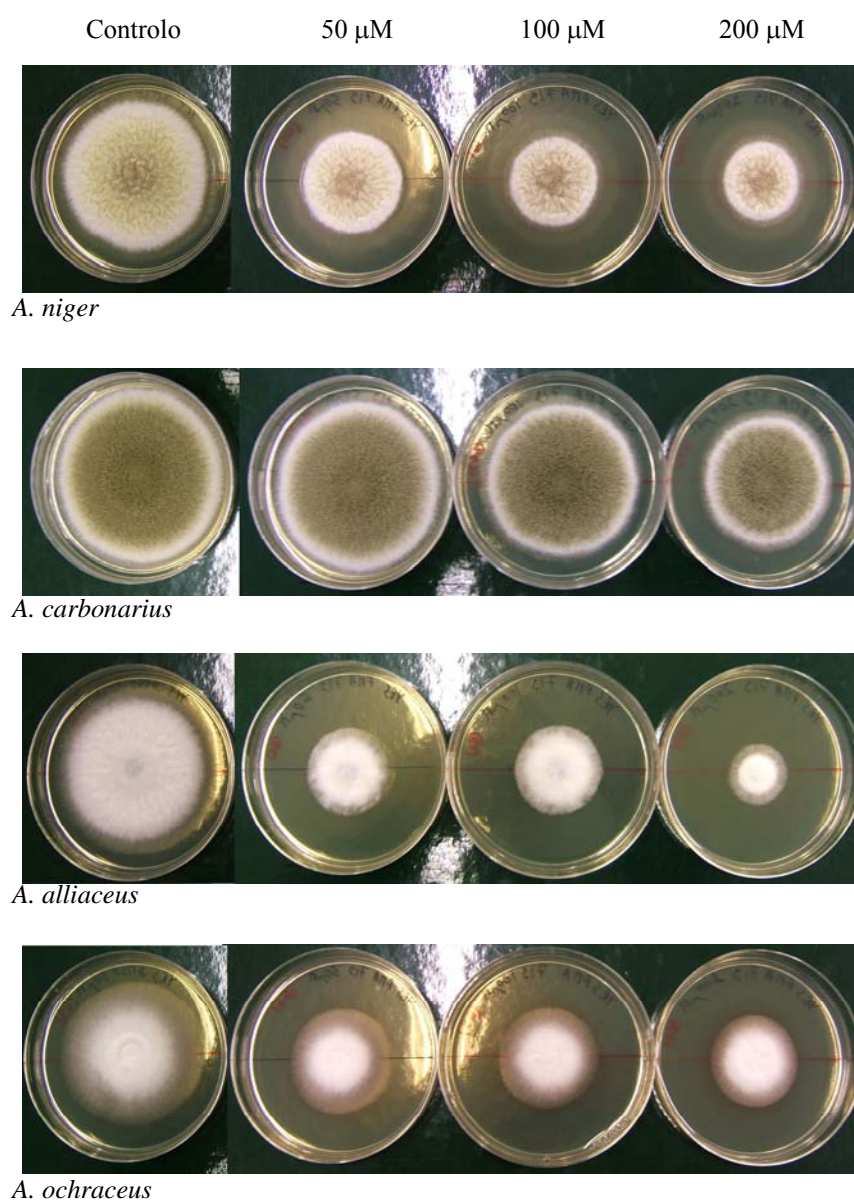


Figura 4.3.1 Efeito de 50, 100 e 200 μM do composto **4a** no crescimento radial dos fungos testados após 4 dias a 25 °C no escuro.

O EC₅₀ do composto **4a** para cada uma das estirpes testadas foi calculado e é de 136,5 µM para *A. niger*, de 416,4 µM para *A. carbonarius*, de 89,1 µM para *A. alliaceus* e de 559,1 µM para *A. ochraceus* (Tabela 4.3.5).

Tabela 4.3.5 EC₅₀ do composto **4a** para os diferentes *Aspergillus* spp. testados

	EC ₅₀ ^a (µM)	IC 95% ^b (µM)	R ² ^c
<i>A. niger</i>	136,5	104,6 a 178,0	0,9579
<i>A. carbonarius</i>	416,4	349,6 a 495,8	0,9781
<i>A. alliaceus</i>	89,1	75,2 a 105,7	0,9790
<i>A. ochraceus</i>	559,1	437,0 a 715,4	0,9784

^a EC₅₀ = concentração de composto activo (µM) para a qual existe uma sobrevivência de 50% determinada por ajuste dos dados experimentais à equação de Hill utilizando o programa informático Prism 4, GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA.

^b Intervalo de confiança de 95% para o valor de EC₅₀ obtido.

^c Coeficiente de correlação da curva ajustada.

A actividade antifúngica dos compostos **2a**, **3a**, **4a**, **2b**, **3b** e **4b** foi também avaliada utilizando o meio de cultura SNM. As taxas de crescimento radial obtidas na presença de 50, 100 e 200 µM de cada um dos compostos encontram-se na Tabela 4.3.6. Utilizou-se novamente, o teste de Ducan (P<0,001) para encontrar diferenças significativas entre as várias taxas de crescimento. As medições diárias dos diâmetros das colónias referentes a estes ensaios podem ser consultadas nas Tabela A-4.43 a A-4.63 no anexo a este capítulo.

Verificou-se, com este meio de cultura, que o composto **4a** apenas inibiu significativamente as taxas de crescimento de *A. carbonarius* e de *A. alliaceus* e que essas inibições foram inferiores às detectadas com meio YES. O crescimento de *A. carbonarius* foi inibido em 10% e o de *A. alliaceus* em 28,2% quando em presença de 200 µM de **4a** (Tabela 4.3.7). O crescimento de *A. niger* e de *A. ochraceus* não foi inibido significativamente por este composto. O composto **3a** inibiu significativamente o crescimento de *A. alliaceus* em 13 e 17,6% quando utilizado na concentração de 100 e 200 µM. Os outros compostos apresentaram efeitos pontuais no crescimento das colónias que não foram além dos 9% de inibição.

Como já vimos atrás, a estrutura dimérica de **4a** parece ser fundamental para a sua actividade antifúngica, podendo esta explicar o reduzido efeito deste composto no meio SNM. Ou seja, é possível que **4a** tenha perdido a sua conformação dimérica ao ter sido solubilizado no meio de cultura SNM (devido por exemplo ao seu pH ácido) justificando assim o seu reduzido efeito no crescimento das colónias.

Tabela 4.3.6 Taxa de crescimento radial das estirpes testadas em SNM suplementado com 50, 100 e 200 µM dos compostos **2a**, **3a**, **4a**, **2b**, **3b** e **4b**

Composto	(µM)	Taxa de crescimento radial (cm/dia)			
		<i>A. niger</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. alliaceus</i>	<i>A. ochraceus</i>
Controlo		1,20 ±0,02 ^a	1,1 ±0,02 ^a	1,31 ±0,04 ^a	1,06 ±0,02 ^a
4a	50	1,26 ±0,02 ^{a,b}	1,08 ±0,01 ^a	1,01 ±0,03 ^b	0,99 ±0,06 ^{a,b}
	100	1,28 ±0,02 ^b	1,10 ±0,04 ^a	1,02 ±0,06 ^b	1,01 ±0,03 ^{a,b}
	200	1,26 ±0,02 ^{a,b}	0,99 ±0,02 ^b	0,94 ±0,02 ^c	1,00 ±0,02 ^{a,b}
3a	50	1,25 ±0,03 ^{a,b}	1,11 ±0,02 ^a	1,22 ±0,04 ^a	1,06 ±0,03 ^a
	100	1,25 ±0,02 ^{a,b}	1,08 ±0,01 ^a	1,14 ±0,01 ^{b,d}	1,07 ±0,01 ^a
	200	1,24 ±0,01 ^{a,b}	1,04 ±0,02 ^a	1,08 ±0,01 ^d	1,01 ±0,03 ^{a,b}
2a	50	1,21 ±0,03 ^{a,b}	1,12 ±0,01 ^{a,c}	1,29 ±0,02 ^a	1,03 ±0,01 ^{a,b}
	100	1,23 ±0,03 ^{a,b}	1,12 ±0,01 ^{a,c}	1,28 ±0,03 ^a	1,01 ±0,04 ^{a,b}
	200	1,24 ±0,01 ^{a,b}	1,08 ±0,02 ^a	1,24 ±0,03 ^a	0,99 ±0,04 ^{a,b}
4b	50	1,19 ±0,02 ^a	1,12 ±0,01 ^{a,c}	1,30 ±0,01 ^a	1,07 ±0,04 ^a
	100	1,18 ±0,01 ^a	1,10 ±0,02 ^a	1,28 ±0,01 ^a	0,97 ±0,01 ^b
	200	1,22 ±0,01 ^{a,b}	1,17 ±0,01 ^c	1,27 ±0,01 ^a	0,98 ±0,02 ^{a,b}
3b	50	1,19 ±0,01 ^a	1,12 ±0,03 ^{a,c}	1,35 ±0,04 ^a	1,00 ±0,01 ^{a,b}
	100	1,22 ±0,02 ^{a,b}	1,07 ±0,01 ^a	1,31 ±0,02 ^a	1,00 ±0,02 ^{a,b}
	200	1,25 ±0,01 ^{a,b}	1,11 ±0,01 ^a	1,31 ±0,02 ^a	1,06 ±0,02 ^a
2b	50	1,23 ±0,01 ^{a,b}	1,08 ±0,02 ^a	1,29 ±0,003 ^a	1,01 ±0,02 ^{a,b}
	100	1,16 ±0,02 ^a	1,05 ±0,01 ^a	1,33 ±0,01 ^a	1,03 ±0,02 ^{a,b}
	200	1,24 ±0,03 ^{a,b}	1,08 ±0,01 ^a	1,35 ±0,02 ^a	0,98 ±0,003 ^{a,b}

Os valores apresentados são a média de três réplicas ± desvio padrão. Em cada coluna, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para P<0,001 segundo o teste de Duncan.

Tabela 4.3.7 Inibição da taxa de crescimento radial relativamente aos controlos em SNM

Composto	(µM)	Inibição da taxa de crescimento radial (%)			
		<i>A. niger</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. alliaceus</i>	<i>A. ochraceus</i>
4a	50	-	-	22,9	-
	100	-	-	22,1	-
	200	-	10,0	28,2	-
3a	50	-	-	-	-
	100	-	-	13,0	-
	200	-	-	17,6	-
2a	50	-	-	-	-
	100	-	-	-	-
	200	-	-	9,3	-
4b	50	-	2,3	-	-
	100	-	-	-	8,5
	200	-	3,6	-	-
3b	50	-	-	-	-
	100	-	-	-	-
	200	-	3,6	-	-
2b	50	-	-	-	-
	100	-	-	-	-
	200	-	1,4	-	-

- sem inibição significativa do crescimento.

4.3.1.2 Inibição do crescimento de *Aspergillus* spp pelo composto **4a** em microplaca

De forma a avaliar a concentração de **4a** necessária para inibir totalmente a germinação dos esporos dos *Aspergillus* spp. testados anteriormente, procedeu-se à elaboração de um ensaio em microplaca utilizando o meio YES na sua forma líquida. Esta técnica permitiu crescer as estirpes em presença de concentrações mais elevadas de **4a**, tendo sido testadas concentrações entre os 25 e os 2000 μM .

De forma a interpretar melhor os resultados obtidos com este ensaio elaboraram-se os gráficos da Figura 4.3.2. Estes representam o aparecimento de micélio na superfície dos poços da microplaca ao longo do tempo de incubação e para cada concentração de **4a**. É importante lembrar que se atribuiu o valor 1 quando os poços estavam totalmente cobertos por micélio, o valor 0,5 quando metade do poço estava coberto por micélio e o valor 0,25 quando $\frac{1}{4}$ do poço estava coberto por micélio.

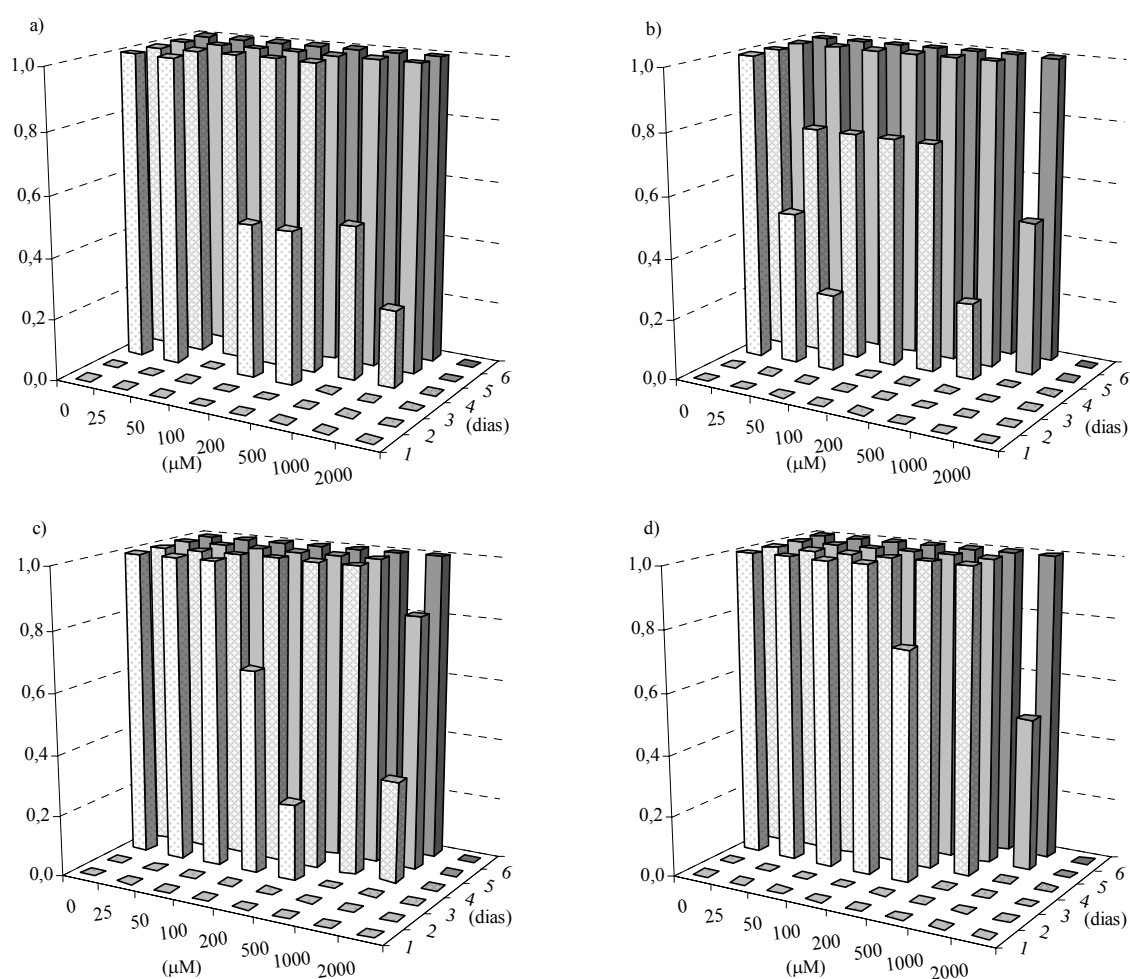


Figura 4.3.2 Presença visível de micélio no ensaio realizado em microplaca com diferentes concentrações de **4a**. a) *A. niger*, b) *A. carbonarius*, c) *A. alliaceus* e d) *A. ochraceus*.

Verificou-se que 2000 μM de **4a** foram capazes de inibir totalmente a germinação dos esporos de todos os *Aspergillus* testados uma vez que nenhum micélio foi visualizado nos respectivos poços. Verificou-se também, que na presença de 500 e 1000 μM de **4a** o crescimento das estirpes foi mais lento uma vez que ao 4º e 5º dia de incubação alguns poços não se apresentavam totalmente cobertos por micélio.

Estas situações podem ser também visualizadas na Figura 4.3.3 onde se apresentam fotografias da microplaca tiradas ao fim de 4 e 5 dias de incubação. Estas confirmam que não existe micélio a cobrir os poços onde foram adicionados 2000 μM de **4a** e que alguns dos poços com 500 e 1000 μM não estão totalmente cobertos por micélio ao fim do 4º ou mesmo do 5º dia de incubação.

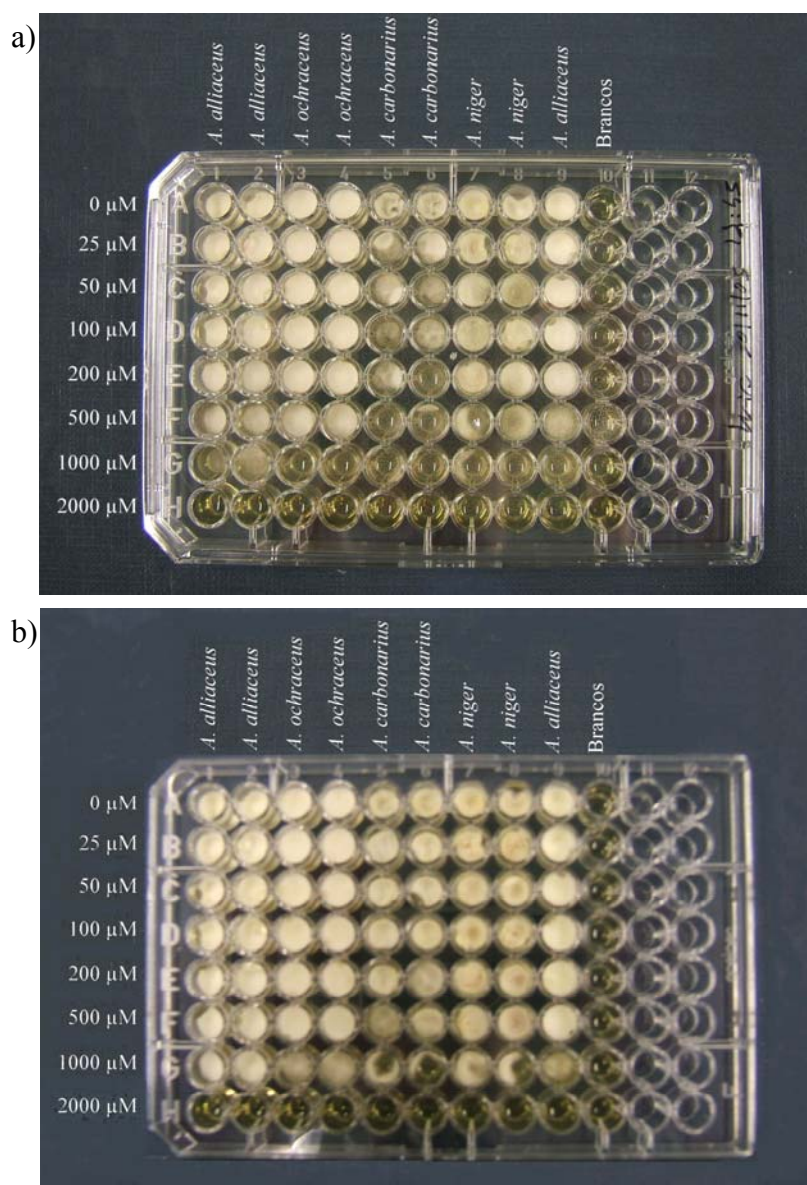


Figura 4.3.3 Ensaio em microplaca com o composto **4a** após a) 4 dias e b) 5 dias a 25 °C no escuro.

4.3.1.3 Inibição da produção de ocratoxina A em meio sólido

O efeito dos compostos **2a**, **2b**, **3a**, **3b**, **4a** e **4b** na produção de ocratoxina A por *A. carbonarius*, *A. alliaceus* e *A. ochraceus* foi também avaliado. A OTA produzida por estas estirpes no meio YES em presença de 0, 50, 100 ou 200 µM destes compostos foi quantificada e as médias comparadas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$) de forma a encontrar diferenças significativas entre elas (Tabela 4.3.8).

Verificaram-se reduções significativas da produção de OTA relativamente ao respectivo controlo quando *A. alliaceus* foi crescido na presença de 50, 100 e 200 µM de **4a** e 200 µM de **4b**. Verificou-se também, uma redução significativa da produção de OTA quando *A. carbonarius* foi crescido na presença de 200 µM de **4b**. Para as outras situações não se observaram reduções significativas na produção de OTA. Na Tabela 4.3.9 as diferenças de OTA relativamente ao controlo estão expressas em percentagem.

Na presença de 50, 100 e 200 µM de **4a** a estirpe de *A. alliaceus* produziu 290,1, 229,9 e 25,4 µg OTA/placa; respectivamente, menos 32, 46 e 94% que o controlo (427,04 µg OTA/placa). Na presença de 200 µM de **4b** a estirpe de *A. alliaceus* produziu 222,73 µg OTA/placa, menos 48% que o controlo. O composto **4b** também influenciou a produção de OTA por *A. carbonarius*. Na presença de 200 µM deste composto a estirpe de *A. carbonarius* produziu 6,38 µg OTA/placa, menos 61% que o controlo (16,43 µg OTA/placa).

Tabela 4.3.8 Produção de ocratoxina A por *A. carbonarius*, *A. alliaceus* e *A. ochraceus* quando crescidos em YES suplementado com 50, 100 ou 200 µM de **2a**, **2b**, **3a**, **3b**, **4a** e **4b**

Compostos	(µM)	Ocratoxina A (µg/placa)		
		<i>A. carbonarius</i>	<i>A. alliaceus</i>	<i>A. ochraceus</i>
Controlo		16,43 ±4,38 ^{a,b}	427,04 ±83,02 ^b	38,29 ±13,90 ^a
4a	50	21,40 ±2,26 ^a	290,13 ±37,99 ^c	45,05 ±6,52 ^a
	100	22,14 ±1,44 ^a	229,87 ±24,62 ^d	53,71 ±4,86 ^a
	200	19,72 ±3,84 ^a	25,40 ±15,68 ^e	43,96 ±11,19 ^a
3a	200	17,80 ±6,13 ^{a,b}	562,55 ±15,62 ^a	45,66 ±15,30 ^a
2a	200	25,45 ±5,31 ^a	427,64 ±12,24 ^b	33,69 ±8,12 ^a
4b	200	6,38 ±3,49 ^c	222,73 ±34,86 ^d	48,76 ±3,09 ^a
3b	200	11,75 ±3,20 ^{b,c}	543,51 ±32,84 ^a	39,23 ±1,26 ^a
2b	200	19,04 ±5,06 ^{a,b}	501,37 ±6,31 ^a	43,36 ±12,22 ^a

Os valores apresentados são a média de três réplicas ± desvio padrão. Em cada coluna, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para $P < 0,05$ segundo o teste de Duncan.

Tabela 4.3.9 Inibição da produção de ocratoxina A no meio de cultura YES

Compostos	(μM)	Inibição da produção de ocratoxina A (%)		
		<i>A. carbonarius</i>	<i>A. alliaceus</i>	<i>A. ochraceus</i>
4a	50	-	32,1	-
	100	-	46,2	-
	200	-	94,1	-
3a	200	-	-	-
2a	200	-	-	-
4b	200	61,2	47,8	-
3b	200	-	-	-
2b	200	-	-	-

- sem redução significativa da produção de OTA.

Da mesma forma, avaliou-se a OTA produzida por estas estirpes no meio SNM suplementado com estes compostos. Verificaram-se reduções significativas na produção de OTA quando: *A. carbonarius* cresceu na presença de 100 e 200 μM de **4a** e 200 μM de **3a**; e ainda, quando *A. ochraceus* cresceu na presença de 200 μM de **2a** ou de **4b** (Tabela 4.3.10). Nas outras situações, não se observaram reduções significativas na produção de OTA.

Quando na presença de 100 e 200 μM de **4a**, *A. carbonarius* produziu 0,235 e 0,108 μg OTA/placa; respectivamente, menos 32,1 e 68,8% que o controlo (0,346 μg OTA/placa). Quando na presença de 200 μM de **3a**, esta mesma estirpe produziu 0,200 μg OTA/placa; respectivamente, menos 42,2% que o controlo. Quando *A. ochraceus* cresceu na presença de 200 μM de **2a** ou de **4b** produziu respectivamente, 0,413 e 1,390 μg OTA/placa, ou seja, menos 82,6 e 41,5% que o controlo (2,376 μg OTA/placa). A inibição da produção de OTA expressa em percentagem pode ser encontrada na Tabela 4.3.11.

Tabela 4.3.10 Produção de ocratoxina A por *A. carbonarius*, *A. alliaceus* e *A. ochraceus* quando crescidos em SNM suplementado com 50, 100 e 200 μM de **2a**, **2b**, **3a**, **3b**, **4a** e **4b**

Compostos	(μM)	Ocratoxina A (μg/placa)		
		<i>A. carbonarius</i>	<i>A. alliaceus</i>	<i>A. ochraceus</i>
Controlo		0,346 ±0,07 ^a	1,396 ±0,39 ^{a,b}	2,376 ±0,76 ^a
4a	50	0,348 ±0,08 ^a	1,869 ±0,17 ^c	2,357 ±0,37 ^a
	100	0,235 ±0,07 ^b	2,100 ±0,07 ^c	2,088 ±0,50 ^{a,b}
	200	0,108 ±0,03 ^c	1,702 ±0,03 ^{b,c}	1,854 ±0,09 ^{a,b}
3a	200	0,200 ±0,02 ^{b,c}	1,708 ±0,04 ^{b,c}	2,344 ±0,35 ^a
2a	200	0,306 ±0,05 ^{a,b}	1,086 ±0,07 ^a	0,413 ±0,19 ^c
4b	200	0,382 ±0,02 ^a	1,444 ±0,12 ^{a,b}	1,390 ±0,36 ^b
3b	200	0,269 ±0,07 ^{a,b}	1,205 ±0,13 ^a	1,808 ±0,19 ^{a,b}
2b	200	0,629 ±0,09 ^d	1,248 ±0,02 ^a	2,549 ±0,51 ^a

Os valores apresentados são a média de três réplicas ± desvio padrão. Em cada coluna, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para P<0,05 segundo o teste de Duncan.

Tabela 4.3.11 Inibição da produção de ocratoxina A no meio de cultura SNM

Compostos	(μM)	Inibição da produção de ocratoxina A (%)		
		<i>A. carbonarius</i>	<i>A. alliaceus</i>	<i>A. ochraceus</i>
4a	50	-	-	-
	100	32,1	-	-
	200	68,8	-	-
3a	200	42,2	-	-
2a	200	-	-	82,6
4b	200	-	-	41,5
3b	200	-	-	-
2b	200	-	-	-

- sem redução significativa da produção de OTA.

4.3.1.4 Inibição da produção de ocratoxina A em meio líquido

O efeito do composto **4a** na produção de OTA por *A. alliaceus* nos meios YES e SNM líquidos foi também avaliado. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.3.12 e 4.3.13.

No meio YES, verificou-se que a produção de OTA por *A. alliaceus* diminuiu significativamente com o composto **4a**. Em presença de 50, 100 e 200 μM deste composto a estirpe de *A. alliaceus* produziu respectivamente 160,4, 75,2 e 22,1 μg de OTA, o que corresponde a uma inibição da sua produção relativamente ao controlo de 21,8, 63,3 e 92,7%.

No meio SNM, não se verificou nenhuma inibição significativa na produção de OTA por *A. alliaceus*. Muito pelo contrário, detectou-se um aumento quando 50 e 100 μM de **4a** foram utilizados.

Tabela 4.3.12 Produção de ocratoxina A por *A. alliaceus* em YES líquido suplementado com 50, 100 ou 200 μM de **4a**

Compostos	(μM)	Ocratoxina A (μg)	Inibição da produção de OTA (%)
		<i>A. alliaceus</i>	<i>A. alliaceus</i>
Controlo		205,1 ±32,2 ^a	-
4a	50	160,4 ±41,9 ^b	21,8
	100	75,2 ±7,5 ^c	63,3
	200	22,1 ±9,2 ^d	92,7

Os valores apresentados são a média de três réplicas ± desvio padrão. Em cada coluna, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para P<0,05 segundo o teste de Duncan.

Tabela 4.3.13 Produção de ocratoxina A por *A. alliaceus* em SNM líquido suplementado com 50, 100 ou 200 μM de **4a**

Compostos	(μM)	Ocratoxina A	Inibição da produção de OTA
		(μg)	(%)
		<i>A. alliaceus</i>	<i>A. alliaceus</i>
Controlo		9,4 \pm 1,3 ^a	-
	50	19,5 \pm 1,9 ^b	107,1
4a	100	25,0 \pm 4,5 ^b	165,7
	200	9,1 \pm 3,3 ^a	3,1

Os valores apresentados são a média de três réplicas \pm desvio padrão. Em cada coluna, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para $P < 0,05$ segundo o teste de Duncan.

4.3.2 Actividade biológica de Na_2EDTA

4.3.2.1 Inibição do crescimento de *Aspergillus* spp. pelo Na_2EDTA

Verificou-se que o Na_2EDTA produziu uma diminuição significativa nas taxas de crescimento das estirpes testadas (Tabela 4.3.14). No meio CYA, as taxas de crescimento de *A. carbonarius*, *A. ibericus*, *A. niger* MUM 03.57 e *A. niger* MUM 03.58 foram respectivamente de 1,66, 1,88, 1,72 e 1,38 cm/dia. Em presença de 1 mM de Na_2EDTA , estas diminuíram para 1,25, 0,90, 1,18 e 1,27 cm/dia e, em presença 10 mM de Na_2EDTA , para 0,15, 0,15, 0,26 e 0,24 cm/dia, respectivamente. O crescimento radial e diário das colónias nestes meios de cultura pode ser observado e comparado nos gráficos da Figura 4.3.4. As medições diárias dos diâmetros das colónias referentes a estes ensaios podem ser consultadas nas Tabela A-4.64 a A-4.66 no anexo a este capítulo.

Tabela 4.3.14 Taxa de crescimento radial dos *Aspergillus* spp. nos meios de cultura CYA, CYA+1mM e CYA+10mM

Meio	Taxa de crescimento radial (cm/dia)			
	<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	<i>A. ibericus</i> MUM 03.49	<i>A. niger</i> MUM 03.57	<i>A. niger</i> MUM 03.58
CYA	1,66 \pm 0,02 ^a	1,88 \pm 0,01 ^a	1,72 \pm 0,01 ^a	1,38 \pm 0,01 ^a
CYA+1mM	1,25 \pm 0,01 ^b	0,90 \pm 0,01 ^b	1,18 \pm 0,01 ^b	1,27 \pm 0,01 ^b
CYA+10mM	0,15 \pm 0,02 ^c	0,15 \pm 0,01 ^c	0,26 \pm 0,02 ^c	0,24 \pm 0,02 ^c

Os valores apresentados são a média de três réplicas \pm desvio padrão. Em cada coluna, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para $P < 0,05$ segundo o teste de Duncan.

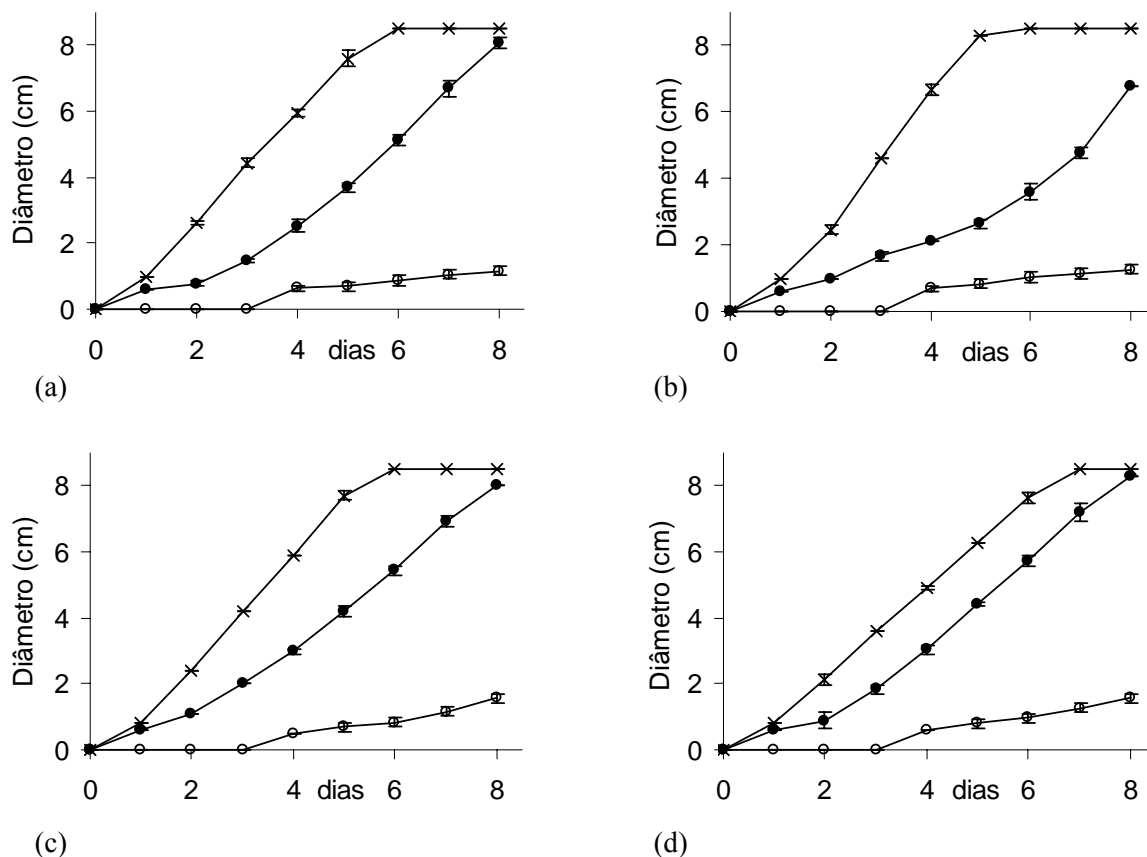


Figura 4.3.4 Crescimento radial do (a) *A. carbonarius* MUM 03.59, (b) *A. ibericus* MUM 03.49, (c) *A. niger* MUM 03.57 e (d) *A. niger* MUM 03.58 em: -x- CYA; -●- CYA+1mM e -○- CYA+10mM. Os valores apresentados são a media de três réplicas e as barras o respectivo desvio padrão.

O EC₅₀ do Na₂EDTA para cada uma das estirpes testadas foi calculado e é de 2,1 mM para *A. carbonarius*, de 0,9 mM para *A. ibericus*, de 2,0 mM para *A. niger* MUM 03.57 e de 4,1 mM para *A. niger* MUM 03.58 (Tabela 4.3.15).

Tabela 4.3.15 EC₅₀ do composto Na₂EDTA para os diferentes *Aspergillus* spp. testados

	EC ₅₀ ^a (mM)	IC 95% ^b (mM)	R ² ^c
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	2,1	1,99 a 2,23	0,9993
<i>A. ibericus</i> MUM 03.49	0,9	0,92 a 0,95	0,9999
<i>A. niger</i> MUM 03.57	2,0	1,98 a 2,10	0,9998
<i>A. niger</i> MUM 03.58	4,1	3,88 a 4,31	0,9995

^a EC₅₀ = concentração de Na₂EDTA (mM) para a qual existe uma sobrevivência de 50% determinada por ajuste dos dados experimentais à equação de Hill utilizando o programa informático Prism 4, GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA.

^b Intervalo de confiança de 95% para o valor de EC₅₀ obtido.

^c Coeficiente de correlação da curva ajustada.

4.3.2.2 Inibição da produção de ocratoxina A em meio sólido

O efeito do Na₂EDTA na produção de OTA pelo *A. carbonarius* MUM 03.59 e pelo *A. niger* MUM 03.57 foi também avaliado. Na Tabela 4.3.16 podem-se encontrar os dados obtidos. Os valores foram comparados entre si pelo teste de Duncan (P<0,05) de forma a determinar diferenças significativas entre eles.

Verificou-se que as estirpes demoraram mais tempo para iniciar a produção de OTA quando crescidas em presença de Na₂EDTA. A produção de OTA foi detectada apenas ao fim de 4 dias de incubação quando as estirpes cresceram em 1 mM de Na₂EDTA e apenas ao fim de 8 dias de incubação quando estas cresceram em 10 mM de Na₂EDTA. Quando cresceram em CYA sem Na₂EDTA a produção de OTA iniciou-se logo ao 2º dia de incubação.

Verificou-se também que o *A. niger* MUM 03.57 produziu significativamente menos OTA em presença de Na₂EDTA. Com 1 mM deste composto detectaram-se no 4º, 6º e 8º dias, respectivamente, 0,30, 1,68 e 7,50 µg de OTA/placa. Estes valores, quando comparados com os seus controlos, traduzem-se em diminuições na produção de OTA de 82, 83 e 36%, respectivamente. Com 10 mM deste composto, detectaram-se 0,20 µg de OTA/placa no 8º dia, o que corresponde a uma diminuição na produção de OTA de 98% relativamente ao seu controlo. Verificou-se, ainda, que o *A. carbonarius* MUM 03.59 apenas produziu significativamente menos OTA em presença de 10 mM de Na₂EDTA. Nestas condições esta estirpe produziu 0,08 µg de OTA/placa, o que corresponde a uma diminuição na produção de OTA de 99,9% relativamente ao seu controlo.

Tabela 4.3.16 Produção ao longo do tempo de ocratoxina A pelo *A. carbonarius* MUM 03.59 e pelo *A. niger* MUM 03.57 em CYA, CYA+1mM e CYA+10mM

Estirpe	OTA (µg/placa)			
	Meio Dias	CYA	CYA+1mM	CYA+10mM
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	0	nd	nd	nd
	2	1,49 ±0,29 ^a	nd	nd
	4	14,59 ±3,39 ^b	19,42 ±1,44 ^b	nd
	6	48,35 ±4,83 ^d	39,12 ±1,54 ^c	nd
	8	68,61 ±5,62 ^e	82,37 ±9,53 ^f	0,08 ±0,11 ^a
<i>A. niger</i> MUM 03.57	0	nd	nd	nd
	2	0,12 ±0,02 ^a	nd	nd
	4	1,69 ±0,28 ^b	0,30 ±0,04 ^a	nd
	6	10,01 ±0,58 ^d	1,68 ±0,06 ^b	nd
	8	11,81 ±0,59 ^e	7,50 ±0,39 ^c	0,20 ±0,07 ^a

Os valores apresentados são a média de três réplicas ± desvio padrão. Para cada estirpe, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para P<0,05 segundo o teste de Duncan.

nd - não detectado

4.4 Discussão e Conclusão

Uma das medidas que contribui para prevenir o aparecimento de micotoxinas nos produtos agrícolas é a utilização de fungicidas adequados e a sua aplicação sempre que as condições ambientais podem favorecer o desenvolvimento de fungos. Para tal, existem no mercado uma grande diversidade de produtos com eficiência confirmada. No entanto, o desenvolvimento de novos compostos com acção antifúngica é uma necessidade constante devido, por exemplo, ao aparecimento de fungos resistentes a certos fungicidas ou, ainda, devido à necessidade de produtos com menor impacto ambiental (Knight *et al.*, 1997). Nesse sentido, procurou-se, com o trabalho apresentado neste capítulo, avaliar a capacidade antifúngica de alguns compostos sintetizados no Departamento de Química da Universidade do Minho e do composto quelante Na₂EDTA, uma vez que é bastante utilizado em produtos agro-químicos. Além do mais, como vimos na introdução geral, por vezes, alguns fungicidas podem contribuir directa ou indirectamente para o aumento da presença de certas micotoxinas ao, por exemplo, eliminarem espécies não toxigénicas que competem com outras que o são (Simpson *et al.*, 2001), ou ao perturbarem o normal metabolismo das estirpes levando-as a que produzam maiores quantidades de micotoxinas (D'Mello *et al.*, 1998). Sendo assim, procurou-se determinar, também, a quantidade de OTA que as estirpes ocratoxigénicas produziam na presença de alguns desses compostos de forma a verificar se influenciavam a sua produção.

Numa primeira fase, testaram-se 20 compostos diferentes à concentração de 50 µM, utilizando a técnica de diluição em agar. Observou-se, nestes ensaios, que o composto **4a** foi o mais activo, tendo-se verificado que este inibiu o crescimento de *A. alliaceus* em 39,9%, de *A. niger* em 29,2% e de *A. ochraceus* em 5,3%. Por outro lado, verificou-se que os outros compostos não inibiram o crescimento das diferentes estirpes testadas em mais de 7%. Sendo assim, numa segunda fase, procurou-se caracterizar melhor a acção antifúngica do composto **4a**. Utilizando a mesma técnica, testaram-se concentrações mais elevadas deste composto (100 e 200 µM) e repetiram-se os ensaios com 50 µM. Em simultâneo, testaram-se, também, o composto **4b** (um análogo de **4a**) e os respectivos precursores sintéticos (os compostos **2a**, **3a**, **2b** e **3b**). Nestes ensaios, verificou-se, mais uma vez, que o composto **4a** foi o mais activo, tendo-se verificado, de uma forma geral, que concentrações maiores de composto produziram maiores percentagens de inibição no crescimento das estirpes. Quando foram

utilizados 200 μM de **4a**, o crescimento de *A. alliaceus* foi inibido em 61%, de *A. niger* em 51,2%, de *A. ochraceus* em 25,5% e de *A. carbonarius* em 23,4%. Com os dados obtidos calculou-se o EC_{50} do composto **4a**, ou seja, a concentração para a qual o crescimento das estirpes foi inibido em 50%. O valor obtido para *A. alliaceus* foi de 89,1 μM , para *A. niger* de 136,5 μM , para *A. ochraceus* de 559,1 μM e para *A. carbonarius* de 416,4 μM . Verificou-se, ainda, que os precursores de **4a** não inibiram significativamente o crescimento das estirpes, indicando que a conformação dimérica deste composto é fundamental para a sua acção antifúngica. Os compostos **4b**, **3b** e **2b** também não apresentaram um efeito relevante no crescimento das estirpes. A falta de acção antifúngica do composto **4b**, quando comparado com **4a**, pode dever-se ao radical OCH_3 presente em C8 ou ao facto deste composto ser pouco solúvel em DMSO. A repetição dos ensaios com este composto, utilizando um solvente mais apropriado, seria necessária para esclarecer esta situação. Determinou-se, adicionalmente, a concentração de **4a** necessária para inibir, na totalidade, a germinação dos esporos das diferentes estirpes testadas. Realizaram-se, para tal, ensaios numa microplaca de 96 poços, uma vez que as quantidades disponíveis de **4a** não nos permitiram realizar ensaios em placa de petri com concentrações acima dos 200 μM . Verificou-se que concentrações de 2 mM de **4a**, ou seja, 0,68 g/L de composto, foram suficientes para inibir a germinação dos esporos de todas as estirpes testadas. Num estudo semelhante, o crescimento de estirpes de *A. carbonarius* foi, também, avaliado na presença de diferentes fungicidas comerciais (Bellí *et al.*, 2006). Dependendo do composto em causa e segundo as recomendações dos fabricantes, concentrações entre 0,035 e 4,0 g/L foram utilizadas nesse estudo. Os autores concluíram que apenas metade dos compostos foram capazes de inibir totalmente o crescimento das estirpes testadas, tendo 9 deles sido utilizados em concentrações superiores a 0,68 g/L. Como vimos, esta concentração de **4a** foi suficiente para inibir, totalmente, o crescimento da estirpe de *A. carbonarius* utilizada. Sendo assim, a acção antifúngica do composto **4a** pode ser considerada semelhante à de alguns produtos comerciais testados por Bellí e co-autores (2006). Os efeitos antifúngicos do composto **4a**, que acabamos de descrever, foram observados quando se realizaram os ensaios com o meio de cultura YES. Contudo, a mesma acção antifúngica não foi observada quando se utilizou o meio de cultura SNM. Esta perda de actividade biológica poderá dever-se à própria composição do meio de cultura (*e.g.* à sua acidez) que pode ter induzido a perda da conformação dimérica do composto **4a**, que, como vimos anteriormente, parece ser essencial para a sua acção antifúngica. Seria, portanto,

importante confirmar os efeitos antifúngicos de **4a** utilizando um outro meio de cultura, por exemplo o meio CYA, adequado, também, para determinar a produção de OTA.

Relativamente ao efeito sobre a produção de OTA, verificou-se que as maiores reduções foram observadas com a estirpe de *A. alliaceus* quando foi crescida na presença de **4a**. Na presença de 50, 100 e 200 μM deste composto esta estirpe produziu, nos ensaios realizados em meio sólido, respectivamente, menos 32, 46 e 94% de OTA que o seu controlo e, nos ensaios realizados em meio líquido, respectivamente, menos 22, 63 e 93%. A produção de menos OTA na presença de **4a** em meio sólido e líquido é consistente e deve-se, muito provavelmente, ao efeito que este composto tem sobre o crescimento das estirpes, mais do que a uma possível capacidade para inibir a via metabólica da mesma, uma vez que o mesmo efeito não foi detectado com estirpes de *A. carbonarius* e *A. ochraceus*. O composto **4b** apresentou, também, alguma actividade sobre a produção de OTA, tendo-se verificado que *A. alliaceus* e *A. carbonarius* produziram menos 48 e 61% de OTA quando foram crescidos na presença de 200 μM deste composto. É importante relembrar que nenhum efeito sobre o crescimento das estirpes foi observado com este composto, podendo, à partida, as reduções de OTA serem devidas à inibição da sua síntese. No entanto, como já discutimos atrás, o composto **4b** apresenta problemas de solubilidade em DMSO que podem ter influenciado os resultados obtidos. Seria, por isso, aconselhável, em estudos futuros, repetir os ensaios com este composto. Adicionalmente, verificou-se que o composto **4a** não produziu os mesmos efeitos sobre a produção de OTA quando se utilizou o meio de cultura SNM. Este facto vem reforçar a ideia de que este composto é instável quando dissolvido neste meio de cultura, o que leva a que perca a sua actividade biológica.

Da mesma forma, testou-se, também, o efeito antifúngico do Na_2EDTA em estirpes de *Aspergillus* negros uma vez que é conhecido que este composto tem efeitos antifúngicos sobre algumas leveduras (Sen *et al.*, 2000; Siqueira & Sen, 2004; Kubo *et al.*, 2005) e sobre *Aspergillus fumigatus* (Hachem *et al.*, 2006). Nestes ensaios verificou-se que o Na_2EDTA foi capaz de inibir significativamente o crescimento das estirpes testadas. Nomeadamente, quando 1 mM foi utilizado, o crescimento de *A. carbonarius*, *A. ibericus*, *A. niger* ocratoxigénico e *A. niger* não ocratoxigénico foi inibido, respectivamente, em 32, 56, 36 e 16% enquanto que 10 mM de Na_2EDTA inibiram o crescimento das mesmas estirpes em 88, 89, 87 e 82%, respectivamente. Os EC_{50} calculados foram de cerca de 2 mM para as estirpes ocratoxigénicas e de 0,9 e 4,1 mM para *A. ibericus* e *A. niger* não ocratoxigénico, respectivamente. Adicionalmente, verificou-se que o Na_2EDTA influenciou, nalgumas

situações, a produção de OTA pelas estirpes ocratoxigénicas. Nomeadamente, verificou-se, quando 1 e 10 mM de Na₂EDTA foram utilizados, que esta micotoxina foi apenas detectada ao fim de, respectivamente, 4 e 8 dias de incubação apesar de, nos controlos, esta ter sido detectada ao fim de 2 dias. Além do mais, verificou-se, quando 10 mM de Na₂EDTA foram utilizados, que *A. carbonarius* e *A. niger* ocratoxigénico produziram ao fim de 8 dias de incubação, respectivamente, menos 98 e 99,9% de OTA que os respectivos controlos. O efeito no crescimento das estirpes deve-se, muito provavelmente, à conhecida capacidade do Na₂EDTA para quelar os iões de zinco que são necessários para uma correcta construção da parede celular tal como é sugerido por Brul *et al.* (1997) no seu estudo com leveduras. A redução na produção de OTA resulta, provavelmente, do efeito sobre o crescimento das estirpes mais do que da inibição da via metabólica desta micotoxina.

Em conclusão, o trabalho aqui apresentado demonstra que na concentração de 200 µM o composto **4a** é capaz de controlar, sobretudo, o crescimento de *A. alliaceus* e os níveis de OTA que este produz, e que na concentração de 2 mM é capaz de inibir, totalmente, o crescimento das diferentes estirpes testadas. A sua utilização como fungicida poderia ter interesse para controlar a presença destes fungos nos produtos agrícolas onde são frequentemente encontrados e nos quais são responsáveis pela presença de OTA. Por exemplo, nos figos, nas uvas ou nos grãos de café, uma vez que a presença desta micotoxina se deve, na sua maioria e respectivamente, ao *A. alliaceus* (Bayman *et al.*, 2002), ao *A. carbonarius* (Serra *et al.*, 2003; Bellí *et al.*, 2004) e ao *A. ochraceus* (Magnani *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2003). No entanto, para que o composto **4a** possa vir a ser utilizado como fungicida são, de certo, necessários estudos mais aprofundados sobre a sua acção antifúngica, o seu modo de actuação, a sua estabilidade química ou sobre potenciais efeitos tóxicos para o ser humano, animais ou mesmo plantas. No que diz respeito ao Na₂EDTA, verificamos, de uma forma geral, que 10 mM deste composto são capazes de controlar, significativamente, o crescimento dos aspergilli negros testados e os níveis de OTA que as estirpes ocratoxigénicas produzem. Como já vimos, este composto é um conhecido agente quelante que é bastante utilizado na agricultura para estabilizar as formulações de certos produtos químicos ou para fornecer micronutrientes às plantas (Oviedo & Rodriguez, 2003). Seria, portanto, interessante verificar, em ensaios de campo, se produtos que contenham Na₂EDTA podem de facto contribuir para controlar a presença de fungos ocratoxigénicos e a respectiva presença de OTA. Além do mais, este composto é capaz de potenciar o efeito de outros agentes antimicrobianos, uma vez que destabiliza a integridade das membranas celulares (Oita, 2003).

Sendo assim, seria, também, interessante avaliar o seu efeito quando utilizado em conjunto com outros fungicidas comerciais ou mesmo com o composto **4a**, aqui estudado.

Para terminar, é importante realçar que a abordagem laboratorial utilizada para desenvolver este estudo se revelou bastante limitativa à realização de mais ensaios de forma a se poderem testar, por exemplo, maior número de concentrações de composto activo, maior número de réplicas, outros meios de cultura, outras estirpes ou mesmo outras espécies de fungos filamentosos. Além do mais, o facto de se utilizar, com esta metodologia, grandes volumes de meio de cultura implica, à partida, a disponibilidade de maiores quantidades dos compostos a estudar, o que nem sempre é possível quando se trata de compostos produzidos à escala laboratorial. Seria, portanto, importante, para estudos futuros, implementar e validar um método em microplaca que pode ser desenvolvido tendo por base alguns já publicados (Pujol *et al.*, 1996; EspinelIngroff *et al.*, 1997; Llop *et al.*, 2000; Yamaguchi *et al.*, 2002; NCCLS, 2002), o que possibilitaria, com certeza, testar maior número de compostos a uma gama mais alargada de concentrações, consumindo menos reagentes e menos tempo. Com tal método, penso que ficará facilitado o teste de novos compostos ou de modificações dos compostos já testados e que demonstraram possuir alguma actividade, aprofundando-se, assim, esta colaboração com a Professora Doutora Fernanda Proença.

Considerações finais

O reino *Fungi* engloba um número elevado de organismos bastante diversificados, sendo muitas espécies utilizadas em variadíssimas aplicações biotecnológicas com proveito para o ser humano. No entanto, muitas outras são também responsáveis por uma grande variedade de efeitos nefastos, sendo as micotoxinas uma das problemáticas mais relevantes no que diz respeito aos fungos. A sua importância é tal que são consideradas, a nível de segurança dietética, o factor de risco crónico mais importante, superando os contaminantes sintéticos, as fitotoxinas, os aditivos alimentares e os resíduos de pesticidas.

O combate às micotoxinas é sem dúvida uma tarefa que não é fácil de levar a cabo. A sua erradicação total é de todo impossível, a sua prevenção muitas vezes infrutífera, o seu controlo dispendioso, a sua remediação imperfeita. No entanto, são anualmente gastas quantias elevadas de dinheiro de forma a minimizar o seu impacto na saúde humana e animal. Neste combate às micotoxinas e aos fungos que as produzem vimos que são utilizadas as mais variadas estratégias, podendo estas ser implementadas numa perspectiva de prevenção ou de remediação do problema.

Os trabalhos laboratoriais desenvolvidos no âmbito desta dissertação procuraram, tendo em consideração estas duas perspectivas, desenvolver formas inovadoras para combater a presença de uma micotoxina em particular, a ocratoxina A. Tendo em conta este objectivo conseguiu-se, nomeadamente:

- identificar diversas leveduras, fungos filamentosos e alguns preparados proteolíticos comerciais com capacidade para degradar a OTA;
- produzir, isolar e purificar um enzima capaz de degradar a OTA a partir de *A. niger*;
- identificar um novo cromeno com actividade antifúngica sobre estirpes ocratoxigénicas;
- demonstrar que o Na₂EDTA possui actividade antifúngica sobre estirpes ocratoxigénicas.

Estes resultados abrem, assim, o caminho a novos estudos dentro deste área de investigação. Por exemplo, poderá ser testada a aplicação do enzima isolado a partir de *A. niger* em alguns alimentos ou rações animais desde que as condições óptimas para a sua actividade hidrolítica sobre a OTA sejam garantidas, ou ser avaliada a sua possível utilização como suplemento alimentar para animais, como porcos e aves, uma vez que estes são os mais susceptíveis a esta micotoxina. Ademais, vimos que este enzima não possui actividade sobre a OTA a pH ácidos, o que inviabiliza a sua aplicação em mostos de uvas ou sumos de fruta, no entanto, conseguiu-se detectar no preparado proteolítico Prolyve PAC actividade hidrolítica sobre a OTA a pH 3,0. Esta é sem dúvida muito residual, mas a sua detecção demonstra que pode ser possível isolar um enzima com actividade sobre a OTA nesta gama de pH. Além do mais, a reforçar esta hipótese, está a detectada actividade hidrolítica da CPY sobre a OTA entre o pH 3,6 e 6,6 com óptimo a pH 5,6, pois demonstra, também, que é possível degradar enzimaticamente esta micotoxina a pH ácidos. A CPY pode, aliás, ser ela própria utilizada em estudos futuros que visem reduzir a presença de OTA em certos alimentos. No entanto, a sua actividade específica reduzida e os seus custos elevados podem constituir um entrave económico à sua aplicação. Neste sentido, a utilização directa de leveduras que produzem a CPY pode ser mais viável. A selecção de estirpes com maior capacidade degradativa que possam vir a ser utilizadas em processos de fermentação e assim reduzir ou eliminar a presença da OTA em produtos como o vinho ou a cerveja pode ser, também, um trabalho futuro a ter em conta. Para tal, o rastreio apresentado nesta dissertação constitui uma primeira abordagem mas, ao mesmo tempo, no que diz respeito aos fungos filamentosos, constitui um recurso que pode e deve ser mais explorado para encontrar enzimas mais interessantes do ponto de vista de degradação da OTA.

A actividade antifúngica do cromeno **4a** sobre fungos ocratoxigénicas e a sua capacidade para reduzir, significativamente, a produção de OTA por *A. alliaceus* é relevante, mas necessita de mais estudos no que diz respeito, essencialmente, à estabilidade do composto, uma vez que no meio de cultura SNM não foram detectados os mesmos efeitos biológicos. Adicionalmente, a constatação de que o Na₂EDTA é, também, capaz de inibir o crescimento de fungos ocratoxigénicas e de retardar a produção de OTA constitui um dado relevante, pois este composto é utilizado com frequência em certos produtos químicos utilizados para controlos fitosanitários. Outros possíveis estudos podem também ser efectuados no sentido de avaliar os efeitos biológicos da combinação destes dois compostos, uma vez que o Na₂EDTA aumenta a permeabilidade celular podendo potenciar a actividade do cromeno **4a**.

Bibliografia

- Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Castellá, G. & Cabañes, F. J. (1994). Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60 (7); 2650-2652.
- Abid, S., Hassen, W., Achour, A., Skhiri, H., Maaroufi, K., Ellouz, F., Creppy, E. E. & Bacha, H. (2003). Ochratoxin A and human chronic nephropathy in Tunisia: Is the situation endemic? *Human and Experimental Toxicology*. 22 (2); 77-84.
- Agarwal, S. K., Verma, S., Singh, S. S., Tripathi, A. K., Khan, Z. K. & Kumar, S. (2000). Antifeedant and antifungal activity of chromene compounds isolated from *Blepharispermum subsessile*. *Journal of Ethnopharmacology*. 71 (1-2); 231-234.
- Amezqueta, S., González-Peñas, E., Murillo, M. & De Cerain, A. L. (2004). Validation of a high-performance liquid chromatography analytical method for ochratoxin A quantification in cocoa beans. *Food Additives and Contaminants*. 21 (11); 1096-1106.
- Aresta, A., Vatinno, R., Palmisano, F. & Zambonin, C. G. (2006). Determination of ochratoxin A in wine at sub ng/ml levels by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. 1115 (1-2); 196-201.
- Atoui, A., Dao, H. P., Mathieu, F. & Lebrihi, A. (2006). Amplification and diversity analysis of ketosynthase domains of putative polyketide synthase genes in *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* producers of ochratoxin A. *Molecular Nutrition & Food Research*. 50 (6); 488-493.
- Avantaggiato, G., Havenaar, R. & Visconti, A. (2004). Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an *in vitro* gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. *Food and Chemical Toxicology*. 42 (5); 817-824.
- Baggiani, C., Giraudi, G. & Vanni, A. (2001). A molecular imprinted polymer with recognition properties towards the carcinogenic mycotoxin ochratoxin A. *Bioseparation*. 10 (6); 389-394.
- Bakan, B., Melcion, D., Richard-Molard, D. & Cahagnier, B. (2002). Fungal growth and *Fusarium* mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetically modified maize grown in France and Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (4); 728-731.
- Bandara, B. M. R., Hewage, C. M., Karunaratne, V., Wannigama, G. P. & Adikaram, N. K. B. (1992). An antifungal chromene from *Eupatorium riparium*. *Phytochemistry*. 31 (6); 1983-1985.
- Bart van den Hazel, H., Kielland-Brandt, M. C. & Winther, J. R. (1996). Review: Biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. *Yeast*. 12 (1); 1-16.

-
- Basilico, M. Z. & Basilico, J. C. (1999). Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. *Letters in Applied Microbiology*. 29 (4); 238-241.
 - Battilani, P., Logrieco, A., Giorni, P., Cozzi, G., Bertuzzi, T. & Pietri, A. (2004). Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84 (13); 1736-1740.
 - Baxter, E. D., Slaiding, I. R. & Kelly, B. (2001). Behavior of ochratoxin A in brewing. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 59 (3); 98-100.
 - Bayman, P., Baker, J. L., Doster, M. A., Michailides, T. J. & Mahoney, N. E. (2002). Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (5); 2326-2329.
 - Bejaoui, H., Mathieu, F., Lebrihi, A. & Taillandier, P. (2004). Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of Applied Microbiology*. 97 (5); 1038-1044.
 - Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P. & Lebrihi, A. (2006). Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. *FEMS Microbiology Letters*. 255 (2); 203-208.
 - Belli, N., Marín, S., Sanchis, V. & Ramos, A. J. (2006). Impact of fungicides on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on synthetic grape-like medium and on grapes. *Food Additives and Contaminants*. 23 (10); 1021-1029.
 - Belli, N., Pardo, E., Marín, S., Farre, G., Ramos, A. J. & Sanchis, V. (2004). Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84 (6); 541-546.
 - Bennett, J. W. & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 16 (3); 497-516.
 - Betina, V. (1985). Thin-layer chromatography of mycotoxins. *Journal of Chromatography A*. 334 (3); 211-276.
 - Betina, V. (1989). Ochratoxins and related dihydroisocoumarins. *In* Betina, V. (Ed.), *Mycotoxins: Chemical, biological and environmental aspects*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. pp 151-173.
 - Betina, V. (1993). Thin-layer chromatography of mycotoxins. *In* Betina, V. (Ed.), *Chromatography of mycotoxins: Techniques and applications*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. pp 141-251.
 - Binder, E. M. (2007). Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology*. 133 (1-2); 149-166.
 - Blackwell, B. A., Gilliam, J. T., Savard, M. E., Miller, J. D. & Duvick, J. P. (1999). Oxidative deamination of hydrolyzed fumonisin B₁ (AP₁) by cultures of *Exophiala spinifera*. *Natural Toxins*. 7 (1); 31-38.
 - Bondy, G. S. & Pestka, J. J. (2000). Immunomodulation by fungal toxins. *Journal of Toxicology and Environmental Health: Part B*. 3 (2); 109-143.

-
- Borges, F., Roleira, F., Milhazes, N., Santana, L. & Uriarte, E. (2005). Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: Occurrence, synthesis and biological activity. *Current Medicinal Chemistry*. 12 (8); 887-916.
 - Boudra, H., Le Bars, P. & Le Bars, J. (1995). Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (3); 1156-1158.
 - Bradford, M. M. (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72 (1-2); 248-254.
 - Brera, C., Grossi, S. & Miraglia, M. (2005). Interlaboratory study for ochratoxin A determination in cocoa powder samples. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 28 (1); 35-61.
 - Bruinink, A., Rasonyi, T. & Sidler, C. (1998). Differences in neurotoxic effects of ochratoxin A, ochracin and ochratoxin *α* *in vitro*. *Natural Toxins*. 6 (5); 173-177.
 - Brul, S., Stratford, M., van der Vaart, J. M., Dielbandhosing, S. K., Steels, H., Klis, F. M. & Verrips, C. T. (1997). The antifungal action of 1,10-o-phenanthroline and EDTA is mediated through zinc chelation and involves cell wall construction. *Food Technology and Biotechnology*. 35 (4); 267-274.
 - Burdaspal, P., Legarda, T. M. & Gilbert, J. (2001). Determination of ochratoxin A in baby food by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: Interlaboratory Study. *Journal of AOAC International*. 84 (5); 1445-1452.
 - Cabañes, F. J., Accensi, F., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Castellá, G., Minguez, S. & Pons, A. (2002). What is the source of ochratoxin A in wine? *International Journal of Food Microbiology*. 79 (3); 213-215.
 - Caridi, A. (2006a). Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*. 89 (3-4); 417-422.
 - Caridi, A., Galvano, F., Tafuri, A. & Ritieni, A. (2006b). *In vitro* screening of *Saccharomyces* strains for ochratoxin A removal from liquid medium. *Annals of Microbiology*. 56 (2); 135-137.
 - Caridi, A., Galvano, F., Tafuri, A. & Ritieni, A. (2006c). Ochratoxin A removal during winemaking. *Enzyme and Microbial Technology*. 40 (1); 122-126.
 - Castegnaro, M., Barek, J., Fremy, J.M., Lafontaine, M., Miraglia, M., Sansone, E.B. & Telling, G.M. (1991). Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory wastes: some mycotoxins. *International Agency for Research on Cancer, Lyon, France*.
 - Castegnaro, M., Tozlovanu, M., Wild, C., Molinie, A., Sylla, A. & Pfohl-Leszkowicz, A. (2006). Advantages and drawbacks of immunoaffinity columns in analysis of mycotoxins in food. *Molecular Nutrition & Food Research*. 50 (6); 480-487.
 - Castellari, M., Versari, A., Fabiani, A., Parpinello, G. P. & Galassi, S. (2001). Removal of ochratoxin A in red wines by means of adsorption treatments with commercial fining agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49 (8); 3917-3921.
 - Cecchini, F., Morassut, M., Garcia Moruno, E. & Di Stefano, R. (2006). Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. *Food Microbiology*. 23 (5); 411-417.

-
- Chelkowski, J., Szebiotko, K., Golinski, P., Buchowski, M., Godlewska, B. Radomyska, W. & Wiewiorowska, M. (1982). Mycotoxins in cereal grain. Part 5. Changes of cereal grain biological value after ammoniation and mycotoxins (ochratoxins) inactivation. *Nahrung-Food*. 26 (1); 1-7.
 - Chimenti, F., Bizzarri, B., Bolasco, A., Secci, D., Chimenti, P., Carradori, S., Granese, A., Rivanera, D., Lilli, D., Scaltrito, M. M. & Brenciaglia, M. I. (2006). Synthesis and *in vitro* selective anti-*Helicobacter pylori* activity of N-substituted-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxamides. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 41 (2); 208-212.
 - Chu, F. S. (1974a). A comparative study of the interaction of ochratoxins with bovine serum albumin. *Biochemical Pharmacology*. 23 (6); 1105-1113.
 - Chu, F. S. (1974b). Studies on ochratoxins. *CRC Critical Reviews in Toxicology*. 2 (4); 499-524.
 - Ciegler, A. (1972). Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group. *Canadian Journal of Microbiology*. 18 (5); 631-636.
 - Ciegler, A., Fennell, D. I., Sansing, G. A., Detroy, R. W. & Bennett, G. A. (1973). Mycotoxin-producing strains of *Penicillium viridicatum*: Classification into subgroups. *Applied Microbiology*. 26 (3); 271-278.
 - Colagrande, O., Silva, A. & Fumi, M. D. (1994). Recent applications of biotechnology in wine production. *Biotechnology Progress*. 10 (1); 2-18.
 - Cole, R. J., Jarvis, B. B. & Schweikert, M. A. (2003). Ochratoxins and related metabolites. *Handbook of secondary fungal metabolites*. Academic Press, San Diego, California, USA. pp 615-624.
 - Comité Européen de Normalization (CEN) (2001). Foodstuffs - Determination of ochratoxin A in wine and beer - HPLC method with clean-up on a immunoaffinity column. European Standard, Draft prEN 14133:2001. Brussels.
 - Council for Agriculture Science and Technology (CAST) (2003). Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems. Task Force Report n° 139. Ames, Iowa, USA.
 - Creppy, E. E., Stormer, F. C., Kern, D., Rosenthaler, R. & Dirheimer, G. (1983a). Effects of ochratoxin A metabolites on yeast phenylalanyl-tRNA synthetase and on the growth and *in vivo* protein synthesis of hepatoma cells. *Chemico-Biological Interactions*. 47 (2); 239-247.
 - Creppy, E. E., Stormer, F. C., Rosenthaler, R. & Dirheimer, G. (1983b). Effects of two metabolites of ochratoxin A, (4R)-4-hydroxyochratoxin A and ochratoxin α , on immune response in mice. *Infection and Immunity*. 39 (3); 1015-1018.
 - Curini, M., Cravotto, G., Epifano, F. & Giannone, G. (2006). Chemistry and biological activity of natural and synthetic prenyloxycoumarins. *Current Medicinal Chemistry*. 13 (2); 199-222.
 - Dalcero, A., Magnoli, C., Hallak, C., Chiacchiera, S. M., Palacio, G. & Rosa, C. A. d. R. (2002). Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section *Nigri* in Argentina. *Food Additives and Contaminants*. 19 (11); 1065-1072.
 - Dal Degan, F., Ribadeau-Dumas, B. & Breddman, K. (1992). Purification and characterization of two serine carboxypeptidases from *Aspergillus niger* and their use in C-terminal sequencing of proteins and peptide synthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 58 (7); 2144-2152.

-
- de Groene, E. M., Jahn, A., Horbach, G. J. & Fink-Gremmels, J. (1996). Mutagenicity and genotoxicity of the mycotoxin ochratoxin A. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 1 (1); 21-26.
 - Dietrich, D. R., Heussner, A. H. & O'Brien, E. (2005). Ochratoxin A: Comparative pharmacokinetics and toxicological implications (experimental and domestic animals and humans). *Toxicological Sciences*. 22 (1); 45-52.
 - Dirheimer, G. & Creppy, E. E. (1991). Mechanism of action of ochratoxin A. IARC Science Publication. 115; 171-186.
 - Dohlman, E. (2003). Mycotoxin hazards and regulations: Impacts on food and animal feed crop trade. *In* Buzby, J. C. (Ed.), *International trade and food safety: Economic theory and case studies*. Agricultural Economic Report n° (AER828). pp 97-108.
 - Domijan, A.-M., Peraica, M., Zlender, V., Cvjetkovic, B., Jurjevic, Z., Topolovec-Pintaric, S. & Ivic, D. (2005). Seed-borne fungi and ochratoxin A contamination of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Republic of Croatia. *Food and Chemical Toxicology*. 43 (3); 427-432.
 - Duvick, J. (2001). Prospects for reducing fumonisin contamination of maize through genetic modification. *Environmental Health Perspectives*. 109 (S2); 337-342.
 - Duvick, J., Maddox, J. R., Rood, T. A., Wang, X., Bowen, B. A., & Gilliam, J. T. (2003). Fumonisin detoxification compositions and methods. Patent US 6670189.
 - Duvick, J., Rood, T., & Wang, X. (1998). Fumonisin detoxification enzymes. Patent US 5716820.
 - D'Mello, J. P. F., Macdonald, A. M. C., Postel, D., Dijkema, W. T. P., Dujardin, A. & Placinta, C. M. (1998). Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. *European Journal of Plant Pathology*. 104 (8); 741-751.
 - Ehret, D. L., Menzies, J. G., Bogdanoff, C., Utkhede, R. S. & Frey, B. (2002). Foliar applications of fertilizer salts inhibit powdery mildew on tomato. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 24 (4); 437-444.
 - El Agrody, A. M., El-Latif, M. S. A., El-Hady, N. A., Fakery, A. H. & Bedair, A. H. (2001). Heteroaromatization with 4-hydroxycoumarin. Part II: Synthesis of some new pyrano[2,3-d]pyrimidines, [1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidines and Pyrimido[1,6-b]-[1,2,4]triazine derivatives. *Molecules*. 6 (6); 519-527.
 - EspinellIngroff, A., Bartlett, M., Bowden, R., Chin, N. X., Cooper, C., Fothergill, A., McGinnis, M. R., Menezes, P., Messer, S. A., Nelson, P. W., Odds, F. C., Pasarell, L., Peter, J., Pfaller, M. A., Rex, J. H., Rinaldi, M. G., Shankland, G. S., Walsh, T. J. & Weitzman, I. (1997). Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *Journal of Clinical Microbiology*. 35 (1); 139-143.
 - Esteban, A., Abarca, M. L., Bragulat, M. R. & Cabañes, F. J. (2004). Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. *Research in Microbiology*. 155 (10); 861-866.
 - European Commission (EC) (1999). Opinion on the relationship between the use of plant protection products on food plants and the occurrence of mycotoxins in foods (opinion adopted by the Scientific Committee on Plants on 24 September 1999). SCP/RESI/063-Final. Health & Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Plants, Brussels.

-
- European Commission (EC) (2002a). Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states. SCOOP Task 3.2.7. Report on Tasks for Scientific Cooperation, Directorate-General Health and Consumer Protection, Brussels.
 - European Commission (EC) (2002b). Commission Directive 2002/26/EC. Laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels of ochratoxin A in foodstuffs. Official Journal of the European Communities. L75/38-L75/43.
 - European Commission (EC) (2005). Commission Directive 2005/5/EC- Amending Directive 2002/26/EC as regards sampling methods and methods of analysis for the official control of the levels of ochratoxin A in certain foodstuffs. Official Journal of the European Communities. L27/38-L27/40.
 - European Commission (EC) (2006). Commission Regulation n° 1881/2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Communities. L364/5-L364/24.
 - Färber, P. & Geisen, R. (2004). Analysis of differentially-expressed ochratoxin A biosynthesis genes of *Penicillium nordicum*. European Journal of Plant Pathology. 110 (5-6); 661-669.
 - Fernandes, A., Ratola, N., Cerdeira, A., Alves, A. & Venancio, A. (2007). Changes in ochratoxin A concentration during winemaking. American Journal of Enology and Viticulture. 58 (1); 92-96.
 - Ferreira, N. P. & Pitout, M. J. (1969). Biogenesis of ochratoxin. Journal of the South African Chemical Institute. 22; (S1).
 - Food and Agriculture Organization of the United Nation/International Atomic Energy Agency (FAO/IAEA) (2001). Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control. *In* Food and nutrition paper. Vol: 73. Food and Nutrition Division (FAO), Rome, Italy.
 - Food and Agriculture Organization of the United Nation/International Atomic Energy Agency (FAO/IAEA) (2004). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. *In* Food and nutrition paper. Vol: 81. Food and Nutrition Division (FAO), Rome, Italy.
 - Fringuelli, F., Piermatti, O. & Pizzo, F. (2003). One-pot synthesis of 3-carboxycoumarins via consecutive Knoevenagel and Pinner reactions in water. Synthesis. (15); 2331-2334.
 - Frisvad, J. C., Frank, J. M., Houbraken, J. A. M. P., Kuijpers, A. F. A. & Samson, R. A. (2004). New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. Studies in Mycology. 50; 23-43.
 - Frisvad, J. C. & Thrane, U. (1993). Liquid column chromatography of mycotoxins. *In* Betina, V. (Ed.), Chromatography of mycotoxins: Techniques and applications. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. pp 253-372.
 - Frisvad, J. C., Thrane, U., Samson, R. A. & Pitt, J. I. (2006). Important mycotoxins and the fungi which produce them. *In* Hocking, A. D., Samson, R. A., Pitt J. I. & Thrane, U. (Eds.), Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol: 571. Advances in Food Mycology. Springer, USA. pp 3-31.
 - Fuchs, E., Binder, E. M., Heidler, D. & Krska, R. (2002). Structural characterization of metabolites after the microbial degradation of type A trichothecenes by the bacterial strain BBSH 797. Food Additives and Contaminants. 19 (4); 379-386.
 - Fuchs, R., Hult, K., Peraica, M., Radic, B. & Plestina, R. (1984). Conversion of ochratoxin C into ochratoxin A *in vivo*. Applied and Environmental Microbiology. 48 (1); 41-42.

-
- Galvano, F., Piva, A., Ritieni, A. & Galvano, G. (2001). Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: A review. *Journal of Food Protection*. 64 (1); 120-131.
 - Gilbert, J. & Anklam, E. (2002). Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 21 (6-7); 468-486.
 - Gonzalez, L., Juan, C., Soriano, J. M., Molto, J. C. & Manes, J. (2006). Occurrence and daily intake of ochratoxin A of organic and non-organic rice and rice products. *International Journal of Food Microbiology*. 107 (2); 223-227.
 - Gullino, M. L., Leroux, P. & Smith, C. M. (2000). Uses and challenges of novel compounds for plant disease control. *Crop Protection*. 19 (1); 1-11.
 - Hachem, R., Bahna, P., Hanna, H., Stephens, L. C. & Raad, I. (2006). EDTA as an adjunct antifungal agent for invasive pulmonary aspergillosis in a rodent model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50 (5); 1823-1827.
 - Heimbach, J., Rieth, S., Mohamedshah, F., Slesinski, R., Samuel-Fernando, P., Sheehan, T., Dickmann, R. & Borzelleca, J. (2000). Safety assessment of iron EDTA [sodium iron (Fe³⁺) ethylenediaminetetraacetic acid]: Summary of toxicological, fortification and exposure data. *Food and Chemical Toxicology*. 38 (1); 99-111.
 - Hernandez, M. J., Garcia-Moreno, M. V., Duran, E., Guillen, D. & Barroso, C. G. (2006). Validation of two analytical methods for the determination of ochratoxin A by reversed-phased high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection in musts and sweet wines from Andalusia. *Analytica Chimica Acta*. 566 (1); 117-121.
 - Hesseltine, C. W., Vandegrift, E. E., Fennell, D. I., Smith, M. L. & Shotwell, O. L. (1972). *Aspergilli* as ochratoxin producers. *Mycologia*. 64 (3); 539-550.
 - Higa, A., Kimura, M., Mimori, K., Ochiai-Fukuda, T., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Nishiuchi, T., Igawa, T., Fujimura, M., Hamamoto, H., Usami, R. & Yamaguchi, I. (2003). Expression in cereal plants of genes that inactivate *Fusarium* mycotoxins. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 67 (4); 914-918.
 - Higa-Nishiyama, A., Takahashi-Ando, N., Shimizu, T., Kudo, T., Yamaguchi, I. & Kimura, M. (2005). A model transgenic cereal plant with detoxification activity for the estrogenic mycotoxin zearalenone. *Transgenic Research*. 14 (5); 713-717.
 - Hofstetter, U., Schatzmayr, D., Schatzmayr, G. & Binder, E. M. (2006). Successful detoxification of ochratoxin A in weaning piglets. *Journal of Animal Science*. 84 (S1); 308.
 - Horie, Y. (1995). Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*. *Nippon Kingakkai Kaiho*. 36; 73-76.
 - Hormisch, D., Hormisch, D., Brost, I., Kohring, G. W., Giffhorn, F., Kroppenstedt, R. M., Stackebradt, E., Farber, P. & Holzapfel, W. H. (2004). *Mycobacterium fluoranthenvivorans* sp. nov., a fluoranthene and aflatoxin B₁ degrading bacterium from contaminated soil of a former coal gas plant. *Systematic and Applied Microbiology*. 27 (6); 653-660.
 - Huff, J. E. (1991). Carcinogenicity of ochratoxin A in experimental animals. IARC Science Publication. 115; 229-244.

-
- Hutchison, R. D., Steyn, P. S. & Thompson, D. L. (1971). The isolation and structure of 4-hydroxyochratoxin A and 7-carboxy-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methylisocoumarin from *Penicillium viridicatum*. *Tetrahedron Letters*. 12 (43); 4033-4036.
 - Huwig, A., Freimund, S., Kappeli, O. & Dutler, H. (2001). Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*. 122 (2); 179-188.
 - Hwang, C. A. & Draughon, F. A. (1994). Degradation of ochratoxin A by *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Food Protection*. 57 (5); 410-414.
 - Iamanaka, B. T., Taniwaki, M. H., Menezes, H. C., Vicente, E. & Fungaro, M. H. P. (2005). Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. *Food Additives and Contaminants*. 22 (12); 1258-1263.
 - Ichishima, E., Yamane, A., Nitta, T., Kinoshit, M., Nikkuni, S., Oka, T. & Yokoyama, S. (1973). Production of a new type of acid carboxypeptidase of molds of *Aspergillus niger* group. *Applied Microbiology*. 26 (3); 327-331.
 - International Agency for Research on Cancer (IARC). (1993). Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *In* IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to Humans. Vol: 56. World Health Organization, Lyon, France.
 - Jaimez, J., Fente, C. A., Franco, C. M., Cepeda, A. & Vazquez, B. I. (2004). A survey of the fungal contamination and presence of ochratoxin A and zearalenone on Spanish feed and raw materials. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84 (8); 832-840.
 - Jiménez, A. M., López de Cerain, A., González-Peñas, E. & Bello, J. (2001). Determination of ochratoxin A in pig liver-derived pâtés by high-performance liquid chromatography. *Food Additives and Contaminants*. 18 (6); 559-563.
 - Jørgensen, K. & Petersen, A. (2002). Content of ochratoxin A in paired kidney and meat samples from healthy danish slaughter pigs. *Food Additives and Contaminants*. 19 (6); 562-567.
 - Juglal, S., Govinden, R. & Odhav, B. (2002). Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. *Journal of Food Protection*. 65 (4); 683-687.
 - Jung, G. M., Ueno, H. & Hayashi, R. (1999). Carboxypeptidase Y: Structural basis for protein sorting and catalytic triad. *Journal of Biochemistry*. 126 (1); 1-6.
 - Kabak, B., Dobson, A. D. W. & Var, I. (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 46 (8); 593-619.
 - Karlovsky, P. (1999). Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Natural Toxins*. 7 (1); 1-23.
 - Karolewicz, A. & Geisen, R. (2005). Cloning a part of the ochratoxin A biosynthetic gene cluster of *Penicillium nordicum* and characterization of the ochratoxin polyketide synthase gene. *Systematic and Applied Microbiology*. 28 (7); 588-595.

-
- Khan, K. M., Saify, Z. S., Khan, M. Z., Zia-Ullah, Choudhary, M. I., Atta-ur-Rahman, Perveen, S., Chohan, Z. H. & Supuran, C. T. (2004). Synthesis of coumarin derivatives with cytotoxic, antibacterial and antifungal activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 19 (4); 373-379.
 - Khan, S., Martin, M., Bartsch, H. & Rahimtula, A. D. (1989). Perturbation of liver microsomal calcium homeostasis by ochratoxin A. *Biochemical Pharmacology*. 38 (1); 67-72.
 - Kilcawley, K. N., Wilkinson, M. G. & Fox, P. F. (2002). Determination of key enzyme activities in commercial peptidase and lipase preparations from microbial or animal sources. *Enzyme and Microbial Technology*. 31 (3); 310-320.
 - Knight, S. C., Anthony, V. M., Brady, A. M., Greenland, A. J., Heaney, S. P., Murray, D. C., Powell, K. A., Schulz, M. A., Spinks, C. A., Worthington, P. A. & Youle, D. (1997). Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Annual Review of Phytopathology*. 35; 349-372.
 - Koide, A., Yoshizawa, M. & Kurachi, K. (1981). Crystallization and properties of carboxypeptidase A gamma from porcine pancreas. *FEBS Journal*. 117 (2); 383-388.
 - Kozakiewicz, Z., Battilani, P., Cabañes, F. J., Venâncio, A., Mulè, G., Tjamos, E. C., Lichter, A., Magan, N., Sanchís, V., Lebríhi, A., Zinzani, G. & Mínguez, S. (2003). Making wine safer: The case of ochratoxin. *In* Barug, D., van Egmond, H., López-García, R., van Osenbruggen, T. & Visconti, A. (Eds.), *Meeting the mycotoxin menace*. Wageningen Academic Publishers, Netherlands. pp 133-142.
 - Krishnan, S. & Vijayalakshmi, M. A. (1986). Purification and some properties of 3 Serine carboxypeptidases from *Aspergillus niger*. *Journal of Chromatography*. 370 (2); 315-326.
 - Krogh, P. (1979). Ochratoxins: Occurrence, biological effects and causal role in diseases. *Toxicon*. 17 (S1); 95.
 - Krogh, P. (1992). Role of ochratoxin in disease causation. *Food and Chemical Toxicology*. 30 (3); 213-224.
 - Kubo, I., Lee, S. H. & Ha, T. J. (2005). Effect of EDTA alone and in combination with polygodial on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (5); 1818-1822.
 - Kulkarni, M. V., Kulkarni, G. M., Lin, C. H. & Sun, C. M. (2006). Recent advances in coumarins and 1-azacoumarins as versatile biodynamic agents. *Current Medicinal Chemistry*. 13 (23); 2795-2818.
 - Kumagai, S. (1985). Ochratoxin A: plasma concentration and excretion into bile and urine in albumin-deficient rats. *Food and Chemical Toxicology*. 23 (10); 941-943.
 - Kumagai, I., Yamasaki, M. & Ui, N. (1981). Isolation, purification and some chemical-properties of an acid carboxypeptidase from *Aspergillus niger* var *macrosporus*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 659 (2); 334-343.
 - Larsen, T. O., Svendsen, A. & Smedsgaard, J. (2001). Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (8); 3630-3635.
 - Li, S., Marquardt, R. R., Frohlich, A. A., Vitti, T. G. & Crow, G. (1997). Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 145 (1); 82-90.
 - Liazid, A., Palma, M., Brigui, J. & Barroso, C. G. (2007). Investigation on ochratoxin A stability using different extraction techniques. *Talanta*. 71 (2); 976-980.

-
- Liu, D.-L., Yao, D.-S., Liang, Y.-Q., Zhou, T.-H., Song, Y.-P., Zhao, L. & Ma, L. (2001). Production, purification, and characterization of an intracellular aflatoxin-detoxifying enzyme from *Armillariella tabescens* (E20). *Food and Chemical Toxicology*. 39 (5); 461-466.
 - Llop, C., Pujol, I., Aguilar, C., Sala, J., Riba, D. & Guarro, J. (2000). Comparison of three methods of determining MICs for filamentous fungi using different end point criteria and incubation periods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44 (2); 239-242.
 - Lombaert, G. A., Pellaers, P., Roscoe, V., Mankotia, M., Neil, R. & Scott, P. M. (2003). Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. *Food Additives and Contaminants*. 20 (5); 494-504.
 - Lu, H. S., Klein, M. L. & Lai, P. H. (1988). Narrow-bore high-performance liquid chromatography of phenylthiocarbamyl amino acids and carboxypeptidase P digestion for protein C-terminal sequence analysis. *Journal of Chromatography*. 447 (2); 351-364.
 - Lund, F. & Frisvad, J. C. (2003). *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology*. 95 (5); 1117-1123.
 - MacDonald, S., Wilson, P., Barnes, K., Damant, A., Massey, R., Mortby, E. & Shepherd, M. J. (1999). Ochratoxin A in dried vine fruit: Method development and survey. *Food Additives and Contaminants*. 16 (6); 253-260.
 - MacDonald, S. J., Anderson, S., Brereton, P. & Wood, R. (2003). Determination of ochratoxin A in currants, raisins, sultanas, mixed dried fruit, and dried figs by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: Interlaboratory study. *Journal of AOAC International*. 86 (6); 1164-1171.
 - Magan, N., Hope, R., Cairns, V. & Aldred, D. (2003). Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology*. 109 (7); 723-730.
 - Magnani, M., Fernandes, T., Prete, C. S. E. C., Homechim, M., Ono, E. Y. S., Vilas-Boas, L. A., Sartori, D., Furlaneto, M. C. & Fungaro, M. H. P. (2005). Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. *Scientia Agricola*. 62 (1); 45-49.
 - Malagutti, L., Zannotti, M., Scampini, A. & Sciaraffia, F. (2005). Effects of ochratoxin A on heavy pig production. *Animal Research*. 54 (3); 179-184.
 - Mally, A. & Dekant, W. (2005). DNA adduct formation by ochratoxin A: Review of the available evidence. *Food Additives and Contaminants*. 22 (1); 65-74.
 - Mares, D., Romagnoli, C., Andreotti, E., Manfrini, M. & Vicentini, C. B. (2004). Synthesis and antifungal action of new tricyclazole analogues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52; 2003-2009.
 - Marquardt, R. R., Frohlich, A. A., Sreemannarayana, O., Abramson, D. & Bernatsky, A. (1988). Ochratoxin A in blood from slaughter pigs in western Canada. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 52 (2); 186-190.
 - Martins, M. L., Martins, H. M. & Gimeno, A. (2003). Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*). *Food Additives and Contaminants*. 20 (12); 1127-1131.
 - Mayura, K., Reddy, R. V., Hayes, A. W. & Berndt, W. O. (1982). Embryocidal, fetotoxic and teratogenic effects of ochratoxin A in rats. *Toxicology*. 25 (2-3); 175-185.

-
- McKenzie, K. S., Sarr, A. B., Mayura, K., Bailey, R. H., Miller, D. R., Rogers, T. D., Norred, W. P., Voss, K. A., Plattner, R. D., Kubena, L. F. & Phillips, T. D. (1997). Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food and Chemical Toxicology*. 35 (8); 807-820.
 - Micco, C., Miraglia, M., Brera, C., Corneli, S. & Ambruzzi, A. (1995). Evaluation of ochratoxin A level in human milk in Italy. *Food Additives and Contaminants*. 12 (3); 351-354.
 - Mills, J. T., Seifert, K. A., Frisvad, J. C. & Abramson, D. (1995). Nephrotoxicogenic *Penicillium* species occurring on farm-stored cereal grains in western Canada. *Mycopathologia*. 130 (1); 23-28.
 - Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D. & Magan, N. (2004). Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology*. 97 (2); 439-445.
 - Molinié, A., Faucet, V., Castegnaro, M. & Pfohl-Leszkowicz, A. (2005). Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B₁: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. *Food Chemistry*. 92 (3); 391-400.
 - Molnar, O., Schatzmayr, G., Fuchs, E. & Prillinger, H. (2004). *Trichosporon mycotoxinivorans* sp nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. *Systematic and Applied Microbiology*. 27 (6); 661-671.
 - Monaci, L. & Palmisano, F. (2004). Determination of ochratoxin A in foods: State-of-the-art and analytical challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 378 (1); 96-103.
 - Monaci, L., Palmisano, F., Matrella, R. & Tantillo, G. (2005). Determination of ochratoxin A at part-per-trillion level in Italian salami by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. 1090 (1-2); 184-187.
 - Monaci, L., Tantillo, G. & Palmisano, F. (2004). Determination of ochratoxin A in pig tissues by liquid-liquid extraction and clean-up and high-performance liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 378 (7); 1777-1782.
 - Moruno, E. G., Sanlorenzo, C., Boccaccino, B. & Di Stefano, R. (2005). Treatment with yeast to reduce the concentration of ochratoxin A in red wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 56 (1); 73-76.
 - Motomura, M., Toyomasu, T., Mizuno, K. & Shinozawa, T. (2003). Purification and characterization of an aflatoxin degradation enzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Microbiological Research*. 158 (3); 237-242.
 - Motulsky, H. J. & Christopoulos, A. (2003). Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting. GraphPad Software Inc., San Diego CA, www.graphpad.com.
 - Muller, G., Rosner, H., Rohrmann, B., Erler, W., Geschwend, G., Grafe, U., Burkert, B., Moller, U., Diller, R., Sachse, K. & Kohler, H. (2003). Effects of the mycotoxin ochratoxin A and some of its metabolites on the human cell line THP-1. *Toxicology*. 184 (1); 69-82.
 - National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: Approved standard. NCCLS document M38-A. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

-
- North, M. J. (1982). Comparative biochemistry of the proteinases of eukaryotic microorganisms. *Microbiological Reviews*. 46 (3); 308-340.
 - Northolt, M. D., Vanegmond, H. P. & Paulsch, W. E. (1979). Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *Journal of Food Protection*. 42 (6); 485-490.
 - O'Brien, E. & Dietrich, D. R. (2005). Ochratoxin A: The continuing enigma. *Critical Reviews in Toxicology*. 35 (1); 33-60.
 - O'Callaghan, C. N., McMurry, T. B. H. & O'Brien, J. E. (1995). Synthetic reactions of 2-(2-amino-3-cyano-4H-[1]benzopyran-4-yl)propane-1,3-dinitrile with reactive methylene compounds. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. 4; 417-420.
 - O'Callaghan, J., Caddick, M. X. & Dobson, A. D. W. (2003). A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology*. 149 (12); 3485-3491.
 - Oita, S. (2003). Synergistic bactericidal effect of α -Purothionin and chelating agents for gram-negative food-poisoning bacteria. *Bulletin of the National Agriculture Research Center*. 2; 59-66.
 - Osborne, B. G., Ibe, F., Brown, G. L., Petagine, F., Scudamore, K. A., Banks, J. N., Hetmanski, M. T. & Leonard, C. T. (1996). The effects of milling and processing on wheat contaminated with ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*. 13 (2); 141-153.
 - Oviedo, C. & Rodriguez, J. (2003). EDTA: The chelating agent under environmental scrutiny. *Quimica Nova*. 26 (6); 901-905.
 - Paranagama, P. A., Abeysekera, K. H. T., Abeywickrama, K. & Nugaliyadde, L. (2003). Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. *Letters in Applied Microbiology*. 37 (1); 86-90.
 - Perry, J. L., Christensen, T., Goldsmith, M. R., Toone, E. J., Beratan, D. N. & Simon, J. D. (2003). Binding of ochratoxin A to human serum albumin stabilized by a protein-ligand ion pair. *Journal of Physical Chemistry B*. 107 (31); 7884-7888.
 - Peteri, Z., Teren, J., Vagvolgyi, C. & Varga, J. (2007). Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiology*. 24 (3); 205-210.
 - Petzinger, E. & Weidenbach, A. (2002). Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livestock Production Science*. 76 (3); 245-250.
 - Pfohl-Leszkowicz, A. & Manderville, R. A. (2007). Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research*. 51 (1); 61-99.
 - Pfohl-Leszkowicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I. N. & Castegnaro, M. (2002). Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: A review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*. 19 (3); 282-302.
 - Phadatare, S., Srinivasan, M. C. & Deshpande, M. (1989). Evidence for the involvement of serine protease in the conidial discharge of *Conidiobolus coronatus*. *Archives of Microbiology*. 153 (1); 47-49.
 - Pietri, A., Bertuzzi, T., Gualla, A. & Piva, G. (2006). Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscles and in pork products from northern Italy. *Italian Journal of Food Science*. 18 (1); 99-106.

-
- Piotrowska, M. & Zakowska, Z. (2000). The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. *In* Bielecki, S., Tramper, J. & Polak, J. (Eds.), *Food Biotechnology*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. pp 307-310.
 - Piotrowska, M. & Zakowska, Z. (2005). The elimination of ochratoxin A by lactic acid bacteria strains. *Polish Journal of Microbiology*. 54 (4); 279-286.
 - Pitout, M. J. (1969). The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes. *Biochemical Pharmacology*. 18 (2); 485-491.
 - Pitt, J. I. (1987). *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology*. 53 (2); 266-269.
 - Pitt, J. I., Basílico, J. C., Abarca, M. L. & Lopez, C. (2000). Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology*. 38 (S1); 41-46.
 - Pitt, J. I. & Hocking, A. D. (1997). *Fungi and food spoilage*. Blackie Academic & Professional, London.
 - Pitt, J. I., Taniwaki, M. H., Teixeira, A. A. & Iamanaka, B. T. (2001). Distribution of *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* and *A. carbonarius* in coffee in four regions of Brazil. 19^o Colóquio Científico Internacional do Café. Trieste, Italy.
 - Plank, G., Bauer, J., Grunkemeier, A., Fischer, S., Gedek, B. & Berner, H. (1990). The protective effect of adsorbents against ochratoxin A in swine. *Tierärztliche Praxis*. 18 (5); 483-489.
 - Politis, I., Fegeros, K., Nitsch, S., Schatzmayr, G. & Kantas, D. (2005). Use of *Trichosporon mycotoxinivorans* to suppress the effects of ochratoxicosis on the immune system of broiler chicks. *British Poultry Science*. 46 (1); 58-65.
 - Pujol, I., Guarro, J., Llop, C., Soler, L. & FernandezBallart, J. (1996). Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests for the filamentous fungi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40 (9); 2106-2110.
 - Ramos, A. J., Labernia, N., Marin, S., Sanchís, V. & Magan, N. (1998). Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. *International Journal of Food Microbiology*. 44 (1-2); 133-140.
 - Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62 (3); 597-635.
 - Riley, R. T. & Norred, W. P. (1999). Mycotoxin prevention and decontamination: A case study on maize. *Food, Nutrition and Agriculture*. 23; 25-32.
 - Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y. J. & Larondelle, Y. (2006). Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions*. 159 (1); 18-46.
 - Ringot, D., Lerzy, B., Bonhoure, J. P., Auclair, E., Oriol, E. & Larondelle, Y. (2005). Effect of temperature on *in vitro* ochratoxin A biosorption onto yeast cell wall derivatives. *Process Biochemistry*. 40 (9); 3008-3016.
 - Ringot, D., Lerzy, B., Chaplain, K., Bonhoure, J. P., Auclair, E. & Larondelle, Y. (2007). *In vitro* biosorption of ochratoxin A on the yeast industry by-products: Comparison of isotherm models. *Bioresource Technology*. 98 (9); 1812-1821.

-
- Robinson, R. K., Batt, C. A. & Patel, P. D. (2000). Encyclopedia of food microbiology. Academic Press, San Diego.
 - Romani, S., Sacchetti, G., Chaves Lopez, C., Pinnavaia, G. G. & Dalla Rosa, M. (2000). Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48 (8); 3616-3619.
 - Rousseau, J. & Blateyron, L. (2002). Ochratoxine A dans les vins: pas de solution curative sur vin, priorité à la maîtrise sanitaire au vignoble. Revue Des Oenologues. 104; 14-16.
 - Ruhland, M., Engelhardt, G. & Wallnofer, P. R. (1996). Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in plants. 2. Time course and rates of degradation and metabolite production in cell-suspension cultures of different crop plants. Mycopathologia. 134 (2); 97-102.
 - Saga Kitamura, R. O., Romoff, P., Young, M. C., Kato, M. J. & Lago, J. H. (2006). Chromenes from *Peperomia serpens* (Sw.) Loudon (Piperaceae). Phytochemistry. 67 (21); 2398-2402.
 - Sakurai, A., Motomura, Y. & Midorikawa, H. (1972). Substituted benzopyranopyridopyrimidine ring syntheses by the ternary condensation of malononitrile, salicylaldehyde, and aromatic ketones in the presence of ammonium acetate. The Journal of Organic Chemistry. 37 (10); 1523-1526.
 - Samson, R. A., Houbraeken, J. A. M. P., Kuijpers, A. F. A., Frank, J. M. & Frisvad, J. C. (2004). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. Studies in Mycology. 50; 45-61.
 - Sanchez, V. E. & Pilosof, A. M. R. (2000). Protease-conidia relationships of *Aspergillus niger* grown in solid state fermentation. Biotechnology Letters. 22 (20); 1629-1633.
 - Sangare-Tigori, B., Moukha, S., Kouadio, J. H., Dano-Djedje, S., Betbeder, A.-M., Achour, A. & Creppy, E. E. (2006). Ochratoxin A in human blood in Abidjan, Cote d'Ivoire. Toxicon. 47 (8); 894-900.
 - Sava, V., Reunova, O., Velasquez, A., Harbison, R. & Sanchez-Ramos, J. (2006). Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin A. Neurotoxicology. 27 (1); 82-92.
 - Schatzki, T. F. & Pan, J. (1997). Distribution of aflatoxin in pistachios. 4. Distribution in small pistachios. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45 (1); 205-207.
 - Schatzmayr, G., Heidler, D., Fuchs, E., Mohnl, M., Täubel, M., Loibner, A. P., Braun, R. & Binder, E. M. (2003). Investigation of different yeast strains for the detoxification of ochratoxin A. Mycotoxin Research. 19 (2); 124-128.
 - Schlosberg, A., Elkin, N., Malkinson, M., Orgad, U., Hanji, V., Bogin, E., Weisman, Y., Meroz, M. & Bock, R. (1997). Severe hepatopathy in geese and broilers associated with ochratoxin in their feed. Mycopathologia. 138 (2); 71-76.
 - Schwerdt, G., Freudinger, R., Silbernagl, S. & Gekle, M. (1999). Ochratoxin A - Binding proteins in rat organs and plasma and in different cell lines of the kidney. Toxicology. 135 (1); 1-10.
 - Scientific Committee on Food (SCF) (1998). Opinion of the scientific committee on food on ochratoxin A (expressed on 17 September 1998). In Directorate - Scientific Opinions, European Commission. Brussels, Belgium.

-
- Scott, P. M., Kanhere, S. R., Lawrence, G. A., Daley, E. F. & Farber, J. M. (1995). Fermentation of wort containing added ochratoxin A and fumonisins B₁ and B₂. *Food Additives and Contaminants*. 12 (1); 31-40.
 - Scott, P. M., van Walbeek, W., Kennedy, B. & Anyeti, D. (1972). Mycotoxins (ochratoxin A, citrinin, and sterigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and other agricultural products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 20 (6); 1103-1109.
 - Scudamore, K. A. (2005). Prevention of ochratoxin A in commodities and likely effects of processing fractionation and animal feeds. *Food Additives and Contaminants*. 22 (12); 17-25.
 - Scudamore, K. A., Banks, J. & MacDonald, S. J. (2003). Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grains during milling and bread production. *Food Additives and Contaminants*. 20 (12); 1153-1163.
 - Scudamore, K. A., Banks, J. N. & Guy, R. C. E. (2004). Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grain during extrusion. *Food Additives and Contaminants*. 21 (5); 488-497.
 - Scudamore, K. A., Patel, S. & Breeze, V. (1999). Surveillance of stored grain from the 1997 harvest in the United Kingdom for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*. 16 (7); 281-290.
 - Searcy, J. W., Davis, N. D. & Diener, U. L. (1969). Biosynthesis of ochratoxin A. *Applied Microbiology*. 18 (4); 622-627.
 - Sen, B. H., Akdeniz, B. G. & Denizci, A. A. (2000). The effect of ethylenediamine-tetraacetic acid on *Candida albicans*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics*. 90 (5); 651-655.
 - Senyuva, H. Z., Gilbert, J., Ozcan, S. & Ulken, U. (2005). Survey for co-occurrence of ochratoxin A and aflatoxin B₁, in dried figs in Turkey by using a single laboratory-validated alkaline extraction method for ochratoxin A. *Journal of Food Protection*. 68 (7); 1512-1515.
 - Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z. & Venâncio, A. (2003). Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*. 88 (1); 63-68.
 - Serra, R., Mendonça, C., Abrunhosa, L., Pietri, A. & Venâncio, A. (2004). Determination of ochratoxin A in wine grapes: comparison of extraction procedures and method validation. *Analytica Chimica Acta*. 513 (1); 41-47.
 - Serra, R., Mendonca, C. & Venâncio, A. (2006a). Fungi and ochratoxin A detected in healthy grapes for wine production. *Letters in Applied Microbiology*. 42 (1); 42-47.
 - Serra, R., Mendonca, C. & Venâncio, A. (2006b). Ochratoxin A occurrence and formation in Portuguese wine grapes at various stages of maturation. *International Journal of Food Microbiology*. 111 (S1); S35-S39.
 - Shima, J., Takase, S., Takahashi, Y., Iwai, Y., Fujimoto, H., Yamazaki, M. & Ochi, K. (1997). Novel detoxification of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol by a soil bacterium isolated by enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (10); 3825-3830.
 - Shotwell, O. L., Hesseltine, C. W. & Goulden, M. L. (1969). Ochratoxin A: Occurrence as natural contaminant of a corn sample. *Applied Microbiology*. 17 (5); 765-766.

-
- Simpson, D. R., Weston, G. E., Turner, J. A., Jennings, P. & Nicholson, P. (2001). Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. *European Journal of Plant Pathology*. 107 (4); 421-431.
 - Siqueira, J. & Sen, B. H. (2004). Fungi in endodontic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics*. 97 (5); 632-641.
 - Skaug, M. A. (1999). Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*. 16 (2); 75-78.
 - Skaug, M. A., Helland, I., Solvoll, K. & Saugstad, O. D. (2001). Presence of ochratoxin A in human milk in relation to dietary intake. *Food Additives and Contaminants*. 18 (4); 321-327.
 - Skrinjar, M., Rasic, J. L. & Stojicic, V. (1996). Lowering of ochratoxin A level in milk by yoghurt bacteria and bifidobacteria. *Folia Microbiologica*. 41 (1); 26-28.
 - Spanjer, M. C., Scholten, J. M., Kastrup, S., Jorissen, U., Schatzki, T. F. & Toyofuku, N. (2006). Sample comminution for mycotoxin analysis: dry milling or slurry mixing? *Food Additives and Contaminants*. 23 (1); 73-83.
 - Stander, M. A., Bornscheuer, U. T., Henke, E. & Steyn, P. S. (2000). Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48 (11); 5736-5739.
 - Steyn, P. S. (1995). Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicology Letters*. 82/83; 843-851.
 - Steyn, P. S., Holzapfel, C. W. & Ferreira, N. P. (1970). The biosynthesis of the ochratoxins, metabolites of *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry*. 9 (9); 1977-1983.
 - Stoll, V. S. & Blanchard, J. S. (1990). Buffers: principles and practice. In Deutscher, M. P. (Ed.), *Methods in enzymology*. Vol: 182. Guide to protein purification. Academic Press, Inc., San Diego, California, USA. pp 24-38.
 - Storen, O., Holm, H. & Stormer, F. C. (1982). Metabolism of ochratoxin A by rats. *Applied and Environmental Microbiology*. 44 (4); 785-789.
 - Suarez-Quiroz, M., De Louise, B., Gonzalez-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S. & Guiraud, J. P. (2005). The impact of roasting on the ochratoxin A content of coffee. *International Journal of Food Science and Technology*. 40 (6); 605-611.
 - Sweeney, M. J. & Dobson, A. D. (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*. 43 (3); 141-158.
 - Tafuri, A., Ferracane, R. & Ritieni, A. (2004). Ochratoxin A in Italian marketed cocoa products. *Food Chemistry*. 88 (4); 487-494.
 - Takahashi-Ando, N., Kimura, M., Kakeya, H., Osada, H. & Yamaguchi, I. (2002). A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: Enzyme purification and gene cloning. *Biochemical Journal*. 365 (1); 1-6.
 - Téren, J., Palagyi, A., & Varga, J. (1997). Isolation of ochratoxin producing aspergilli from green coffee beans of different origin. *Cereal Research Communications*. 25 (3); 303-304.

-
- Téren, J., Varga, J., Hamari, Z., Rinyu, E. & Kevei, F. (1996). Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia*. 134 (3); 171-176.
 - Thirumala-Devi, K., Mayo, M. A., Reddy, G., Emmanuel, K. E., Larondelle, Y. & Reddy, D. V. (2001). Occurrence of ochratoxin A in black pepper, coriander, ginger and turmeric in India. *Food Additives and Contaminants*. 18 (9); 830-835.
 - Thirumala-Devi, K., Mayo, M. A., Reddy, G. & Reddy, D. V. R. (2002). Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in Indian poultry feeds. *Journal of Food Protection*. 65 (8); 1338-1340.
 - Trail, F., Hammerschmidt, R., Linz, J. E., Xu, H., Velasquez, L., & Annis, S. L. (2006). Alkaloid that inhibits biosynthesis of mycotoxins and method for screening for mycotoxin inhibitors. Patent US 7041678.
 - Trenholm, H. L., Charmley, L. L., Prelusky, D. B. & Warner, R. M. (1991). Two physical methods for the decontamination of 4 cereals contaminated with deoxynivalenol and zearalenone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 39 (2); 356-360.
 - Trenholm, H. L., Charmley, L. L., Prelusky, D. B. & Warner, R. M. (1992). Washing procedures using water or sodium-carbonate solutions for the decontamination of 3 cereals contaminated with deoxynivalenol and zearalenone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40 (11); 2147-2151.
 - Tsubouchi, H., Terada, H., Yamamoto, K., Hisada, K. & Sakabe, Y. (1988). Ochratoxin A found in commercial roast coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 36 (3); 540-542.
 - Tsujita, Y. & Endo, A. (1978). Purification and characterization of the two molecular forms of membrane acid protease from *Aspergillus oryzae*. *European Journal of Biochemistry*. 84 (2); 347-353.
 - Turconi, G., Guarcello, M., Livieri, C., Comizzoli, S., Maccarini, L., Castellazzi, A., Pietri, A., Piva, G. & Roggi, C. (2004). Evaluation of xenobiotics in human milk and ingestion by the newborn: An epidemiological survey in Lombardy (Northern Italy). *European Journal of Nutrition*. 43 (4); 191-197.
 - Turner, W. B. & Aldridge, D. C. (1983). *Fungal metabolites II*. Academic Press, London.
 - Uchiyama, S., Saito, Y. & Uchiyama, M. (1985). Protein-binding of ochratoxin A and its extractability from proteinous food. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*. 26 (6); 651-657.
 - Ueno, Y., Maki, S., Lin, J., Furuya, M., Sugiura, Y. & Kawamura, O. (1998). A 4-year study of plasma ochratoxin A in a selected population in Tokyo by immunoassay and immunoaffinity column-linked HPLC. *Food and Chemical Toxicology*. 36 (5); 445-449.
 - Umetsu, H., Hishinuma, K., Wake, H., Takeuchi, M. & Ichishima, E. (1997). Action of carboxypeptidase W on oligopeptides containing carboxy-terminally amidated peptides. *Phytochemistry*. 45 (5); 907-910.
 - van der Merwe, K. J., Steyn, P. S. & Fourie, L. (1965a). Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Journal of Chemical Society*. 7083-7088.
 - van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Scott, D. B. & Theron, J. J. (1965b). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*. 205 (976); 1112-1113.
 - van Walbeek, W., Scott, P. M., Harwig, J. & Lawrence, J. W. (1969). *Penicillium viridicatum* Westling: a new source of ochratoxin A. *Canadian Journal of Microbiology*. 15 (11); 1281-1285.

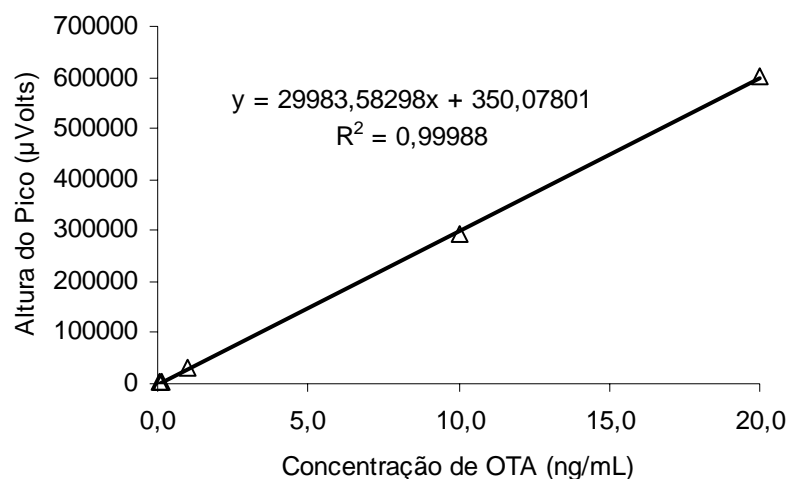
-
- Varga, J., Kevei, E., Rinyu, E., Téren, J. & Kozakiewicz, Z. (1996). Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (12); 4461-4464.
 - Varga, J., Rigó, K. & Téren, J. (2000). Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology*. 59 (1-2); 1-7.
 - Varga, J. & Kozakiewicz, Z. (2006). Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. *Trends in Food Science & Technology*. 17 (2); 72-81.
 - Varga, J., Peteri, Z., Tabori, K., Teren, J. & Vagvolgyi, C. (2005). Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *International Journal of Food Microbiology*. 99 (3); 321-328.
 - Visconti, A. & de Girolamo, A. (2005). Fitness for purpose: Ochratoxin A analytical developments. *Food Additives and Contaminants*. 22 (1); 37-44.
 - Visconti, A., Pascale, M. & Centonze, G. (2000). Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 888 (1-2); 321-326.
 - Volmajer, J., Toplak, R., Leban, I. & Le Marechal, A. M. (2005). Synthesis of new iminocoumarins and their transformations into N-chloro and hydrazono compounds. *Tetrahedron*. 61 (29); 7012-7021.
 - Wegst, W. & Lingens, F. (1983). Bacterial degradation of ochratoxin A. *FEMS Microbiology Letters*. 17 (1-3); 341-344.
 - Wei, R. D., Strong, F. M. & Smalley, E. B. (1971). Incorporation of chlorine-36 into ochratoxin A. *Applied Microbiology*. 22 (3); 276-277.
 - Whitaker, T. B. (2003). Standardisation of mycotoxin sampling procedures: An urgent necessity. *Food Control*. 14 (4); 233-237.
 - Wilk, S. (2004). Purification of proteolytic enzymes. *In* Beynon, R. & Bond, J. S. (Eds.), *Proteolytic enzymes: A practical approach*. Oxford University Press, New York, USA. pp 23-44.
 - Wu, F. (2006). Mycotoxin reduction in Bt corn: Potential economic, health, and regulatory impacts. *Transgenic Research*. 15 (3); 277-289.
 - Xiao, H., Madhyastha, S., Marquardt, R. R., Li, S., Vodela, J. K., Frohlich, A. A. & Kemppainen, B. W. (1996a). Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: Structure-activity relationships. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 137 (2); 182-192.
 - Xiao, H., Marquardt, R. R., Abramson, D. & Frohlich, A. A. (1996b). Metabolites of ochratoxins in rat urine and in a culture of *Aspergillus ochraceus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (2); 648-655.
 - Yamaguchi, H., Uchida, K., Nagino, K. & Matsunaga, T. (2002). Usefulness of a colorimetric method for testing antifungal drug susceptibilities of *Aspergillus* species to voriconazole. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 8 (4); 374-377.
 - Yiannikouris, A., Andre, G., Poughon, L., Francois, J., Dussap, C. G., Jeminet, G., Bertin, G. & Jouany, J. P. (2006). Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with β -D-glucans. *Biomacromolecules*. 7 (4); 1147-1155.

- Young, J. C., Trenholm, H. L., Friend, D. W. & Prelusky, D. B. (1987). Detoxification of deoxynivalenol with sodium bisulfite and evaluation of the effects when pure mycotoxin or contaminated corn was treated and given to pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 35 (2); 259-261.
- Yu, D. L., Suzuki, M., Xie, L., Morris-Natschke, S. L. & Lee, K. H. (2003). Recent progress in the development of coumarin derivatives as potent anti-HIV agents. *Medicinal Research Reviews*. 23 (3); 322-345.
- Yu, J. C. C. & Lai, E. P. C. (2006). Molecularly imprinted polypyrrole modified carbon nanotubes on stainless steel frit for selective micro solid phase pre-concentration of ochratoxin A. *Reactive and Functional Polymers*. 66 (7); 702-711.
- Zanick-Grubisik, T., Zrinski, R., Cepelak, I., Petrik, J., Radic, B. & Pepeljnjak, S. (2000). Studies of ochratoxin A-induced inhibition of phenylalanine hydroxylase and its reversal by phenylalanine. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 167 (2); 132-139.
- Zimmerli, B. & Dick, R. (1995). Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: Methodology and Swiss data. *Journal of Chromatography B*. 666 (1); 85-99.
- Zimmerli, B. & Dick, R. (1996). Ochratoxin A in table wine and grape-juice: Occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants*. 13 (6); 655-668.

Anexo ao Capítulo II

Tabela A-2.1 OTA detectada nos meios de cultura com as leveduras testadas e respectivas taxas de degradação

Espécie	Código	OTA detectada em YPD+OTA (µg)		Taxa de degradação (%)			Desvio padrão
		1ª réplica	2ª réplica	1ª réplica	2ª réplica	Média	
<i>I. orientalis</i>	PL34	2,177	2,154	12,9	13,8	13,4	0,65
<i>P. membranifaciens</i>	PL17	2,136	2,011	14,6	19,6	17,1	3,54
<i>R. glutinis</i>	IGC4177T	2,207	2,187	11,7	12,5	12,1	0,57
<i>R. minuta</i>	IGC4689	2,076	1,988	17,0	20,5	18,7	2,49
<i>S. bayanus</i>	IGC4456T	2,178	2,119	12,9	15,2	14,1	1,67
<i>S. cerevisiae</i>	D35	2,155	2,152	13,8	13,9	13,9	0,08
<i>S. cerevisiae</i>	D305	2,172	2,128	13,1	14,9	14,0	1,24
<i>S. pasteurianus</i>	IGC4601T	2,206	2,193	11,8	12,3	12,0	0,37
<i>K. marxianus</i>	IGC3286	2,104	2,048	15,8	18,1	17,0	1,58



Dados da curva de calibração	Concentração de OTA (ng/mL)	0,1	0,1	1,0	10,0	20,0
	Altura do pico (µVolts)	2248	4034	31819	295204	602434

Figura A-2.1 Exemplo de curva de calibração utilizada para a quantificação da OTA.

Anexo ao Capítulo III

Tabela A-3.1 Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados a pH 3,0 e incubados a 37 °C

Enzima	(µg/mL)	Tempo (horas)					
		0	3	6	9	15	25
Branco	OTA	1,025	0,937	0,929	0,942	0,838	0,920
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Protease A	OTA	0,964	0,925	0,985	0,903	0,809	0,910
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Protease II	OTA	0,882	0,914	0,932	0,917	0,825	0,890
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Prolyve PAC	OTA	0,971	0,951	0,939	0,941	0,844	0,855
	OT α	nd	0,009	0,016	0,023	0,043	0,062
Prolyve BS	OTA	0,944	0,941	0,959	0,944	0,840	0,932
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Prolyve NP CONC	OTA	0,961	0,988	0,977	0,934	0,914	0,863
	OT α	nd	nd	0,002	0,001	0,004	0,006
Prolyve 1000	OTA	0,904	0,908	0,883	0,886	0,818	0,843
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Papain powder PNS800	OTA	0,970	0,961	0,889	0,953	0,745	0,932
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Pancreatin	OTA	1,035	0,897	0,847	0,757	0,932	0,687
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Lallzyme CB	OTA	1,039	0,959	1,042	1,029	0,987	0,970
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Lallzyme β	OTA	1,163	1,115	1,175	1,178	0,993	0,996
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Lallzyme HC	OTA	1,000	1,138	1,135	1,154	0,981	1,028
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Lallzyme MMX	OTA	1,083	1,116	1,169	1,153	1,014	1,041
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Carboxipeptidase A	OTA	0,968	0,984	0,988	0,996	1,002	0,985
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd

notas: nd - não detectado

Tabela A-3.2 Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados a pH 5,6 e incubados a 37 °C

Enzima	(µg/mL)	Tempo (horas)					
		0	3	6	9	15	25
Branco	OTA	1,216	1,165	1,162	1,150	1,028	1,032
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Protease A	OTA	1,039	1,012	1,067	0,974	0,886	0,946
	OT α	nd	nd	0,001	0,004	nd	nd
Protease II	OTA	1,050	1,024	1,086	1,028	0,911	0,999
	OT α	nd	nd	nd	0,001	nd	0,001
Prolyve PAC	OTA	1,035	1,045	1,039	1,043	0,897	0,981
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Prolyve BS	OTA	1,051	0,917	1,056	1,035	0,915	0,976
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Prolyve NP CONC	OTA	1,055	1,053	0,968	1,037	0,955	0,986
	OT α	nd	nd	nd	0,001	0,002	0,003
Prolyve 1000	OTA	0,983	0,980	0,973	0,945	0,933	0,922
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Papain powder PNS800	OTA	1,055	0,963	0,942	0,925	0,874	0,859
	OT α	nd	nd	0,001	0,002	0,004	nd
Pancreatin	OTA	1,080	0,980	1,062	1,021	0,973	0,973
	OT α	nd	nd	0,001	0,004	0,006	0,012
Lallzyme CB	OTA	1,116	1,088	1,075	1,134	1,104	1,104
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Lallzyme β	OTA	1,017	1,025	1,060	1,040	1,005	1,002
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Lallzyme HC	OTA	1,024	1,025	1,008	1,031	1,019	1,012
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Lallzyme MMX	OTA	1,020	1,035	1,130	1,031	1,117	1,142
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Carboxipeptidase A	OTA	0,808	0,882	0,856	0,887	0,880	0,863
	OT α	nd	0,008	0,017	0,024	0,043	0,073

notas: nd - não detectado

Tabela A-3.3 Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados a pH 7,5 e incubados a 37 °C

Enzima	(µg/mL)	Tempo (horas)					
		0	3	6	9	15	25
Branco	OTA	1,044	0,999	1,058	1,027	0,908	0,975
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Protease A	OTA	1,037	0,768	0,595	0,352	0,276	0,132
	OT α	nd	0,283	0,467	0,590	0,768	0,961
Protease II	OTA	1,074	1,038	1,056	1,027	0,911	0,997
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Prolyve PAC	OTA	1,014	1,040	0,974	1,046	0,959	0,984
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Prolyve BS	OTA	1,038	1,039	1,037	1,006	0,954	0,975
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Prolyve NP CONC	OTA	1,042	1,047	1,046	1,025	0,971	0,965
	OT α	nd	0,001	0,002	0,002	0,002	0,004
Prolyve 1000	OTA	0,961	0,959	0,970	0,947	0,919	0,937
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Papain powder PNS800	OTA	1,055	1,045	1,050	1,027	1,002	0,970
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Pancreatin	OTA	1,049	0,987	0,954	0,846	0,762	0,594
	OT α	nd	0,056	0,107	0,155	0,254	0,385
Lallzyme CB	OTA	1,151	1,097	1,059	1,088	1,137	1,139
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Lallzyme β	OTA	1,122	1,108	1,142	1,033	1,108	1,118
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Lallzyme HC	OTA	1,100	1,183	1,123	1,160	1,144	1,144
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Lallzyme MMX	OTA	1,182	1,161	1,183	1,190	1,125	1,084
	OT α	nd	nd	nd	nd	0,004	0,020
Carboxipeptidase A	OTA	0,871	0,688	0,520	0,425	0,243	0,103
	OT α	nd	0,249	0,433	0,588	0,799	1,044

notas: nd - não detectado

Tabela A-3.4 Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados a pH 8,5 e incubados a 37 °C

Enzima	(µg/mL)	Tempo (horas)					
		0	3	6	9	15	25
Branco	OTA	1,248	1,001	1,059	1,109	1,097	1,088
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Protease A	OTA	1,123	0,955	0,893	0,885	0,785	0,758
	OT α	nd	0,029	0,048	0,067	0,128	0,230
Protease II	OTA	1,161	1,064	1,101	1,071	1,108	1,036
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Prolyve PAC	OTA	1,091	1,032	1,035	0,995	0,983	1,085
	OT α	nd	0,003	nd	0,003	nd	nd
Prolyve BS	OTA	1,041	1,297	1,071	1,050	1,179	1,067
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Prolyve NP CONC	OTA	1,002	1,109	1,094	1,115	1,055	1,038
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Prolyve 1000	OTA	1,024	0,966	0,931	0,981	0,982	0,912
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Papain powder PNS800	OTA	1,182	1,045	0,906	1,033	1,185	1,062
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Pancreatin	OTA	1,072	0,987	0,963	0,835	0,833	0,969
	OT α	nd	0,015	0,035	0,039	0,083	0,130
Lallzyme CB	OTA	1,072	1,089	1,159	1,096	1,107	1,116
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Lallzyme β	OTA	1,100	1,062	1,130	1,189	1,140	1,146
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Lallzyme HC	OTA	1,171	1,115	1,197	1,158	1,131	1,138
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Lallzyme MMX	OTA	1,112	1,038	1,043	1,020	0,991	1,199
	OT α	nd	0,001	0,006	0,005	0,004	0,003
Carboxipeptidase A	OTA	0,946	0,137	0,024	0,003	0,000	0,000
	OT α	nd	0,975	1,101	1,138	1,113	1,148

notas: nd - não detectado

Tabela A-3.5 Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados a pH 10,0 e incubados a 37 °C

Enzima	(µg/mL)	Tempo (horas)					
		0	3	6	9	15	25
Branco	OTA	0,987	0,946	0,958	0,897	1,045	0,978
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Protease A	OTA	1,037	1,001	0,989	0,967	0,892	0,939
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Protease II	OTA	0,985	1,026	1,017	1,025	0,931	0,909
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Prolyve PAC	OTA	0,997	0,994	0,989	0,997	0,879	0,917
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Prolyve BS	OTA	1,030	1,020	0,974	0,955	0,738	0,802
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Prolyve NP CONC	OTA	1,018	1,008	1,033	0,983	0,886	0,933
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Prolyve 1000	OTA	0,986	0,957	0,952	0,940	0,925	0,886
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Papain powder PNS800	OTA	1,023	1,043	1,026	0,989	0,952	0,933
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Pancreatin	OTA	1,019	1,029	1,069	0,882	0,976	0,888
	OT α	nd	nd	nd	nd	0,003	0,008
Lallzyme CB	OTA	1,076	1,023	1,149	0,910	0,953	0,923
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Lallzyme β	OTA	1,110	1,104	0,990	1,111	1,104	1,001
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Lallzyme HC	OTA	1,014	1,005	1,038	1,070	1,039	1,032
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Lallzyme MMX	OTA	0,997	1,043	1,104	1,014	0,995	1,002
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Carboxipeptidase A	OTA	0,993	0,975	0,962	0,987	0,978	0,980
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd

notas: nd - não detectado

Tabela A-3.6 Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados com CPY e CPP a pH 3,6 e incubados 37 °C

Enzima	($\mu\text{g/mL}$)	Tempo (horas)									
		0	3	6	9	15	25	48	72	96	120
Carboxipeptidase Y	OTA	1,153	1,194	1,181	1,171	1,154	1,142	1,140	1,140	1,138	1,135
	OT α	nd	0,004	0,005	0,006	0,007	0,008	0,009	0,010	0,010	0,009
Carboxipeptidase P	OTA	1,165	1,150	1,144	1,147	1,103	1,093	×	×	×	×
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd	×	×	×	×

notas: nd - não detectado; × - ensaios não realizados.

Tabela A-3.7 Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados com CPY e CPP a pH 4,6 e incubados 37 °C

Enzima	($\mu\text{g/mL}$)	Tempo (horas)									
		0	3	6	9	15	25	48	72	96	120
Carboxipeptidase Y	OTA	1,179	1,131	1,099	1,074	1,047	1,007	0,993	0,968	0,951	0,959
	OT α	nd	0,011	0,020	0,028	0,040	0,068	0,118	0,162	0,197	0,202
Carboxipeptidase P	OTA	1,097	1,080	1,083	1,090	1,053	1,064	×	×	×	×
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd	×	×	×	×

notas: nd - não detectado; × - ensaios não realizados.

Tabela A-3.8 Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados com CPY e CPP a pH 5,6 e incubados 37 °C

Enzima	($\mu\text{g/mL}$)	Tempo (horas)									
		0	3	6	9	15	25	48	72	96	120
Carboxipeptidase Y	OTA	1,069	1,019	1,002	0,979	0,945	0,864	0,753	0,652	0,584	0,511
	OT α	nd	0,030	0,058	0,085	0,121	0,208	0,392	0,528	0,637	0,782
Carboxipeptidase P	OTA	1,108	1,084	1,078	1,089	1,035	1,051	×	×	×	×
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd	×	×	×	×

notas: nd - não detectado; × - ensaios não realizados.

Tabela A-3.9 Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados com CPY e CPP a pH 6,6 e incubados 37 °C

Enzima	($\mu\text{g/mL}$)	Tempo (horas)									
		0	3	6	9	15	25	48	72	96	120
Carboxipeptidase Y	OTA	1,166	1,130	1,094	1,065	1,023	0,965	0,928	0,893	0,861	0,853
	OT α	nd	0,012	0,026	0,038	0,051	0,088	0,162	0,220	0,268	0,355
Carboxipeptidase P	OTA	1,040	1,026	1,042	1,018	1,010	1,020	×	×	×	×
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd	×	×	×	×

notas: nd - não detectado; × - ensaios não realizados.

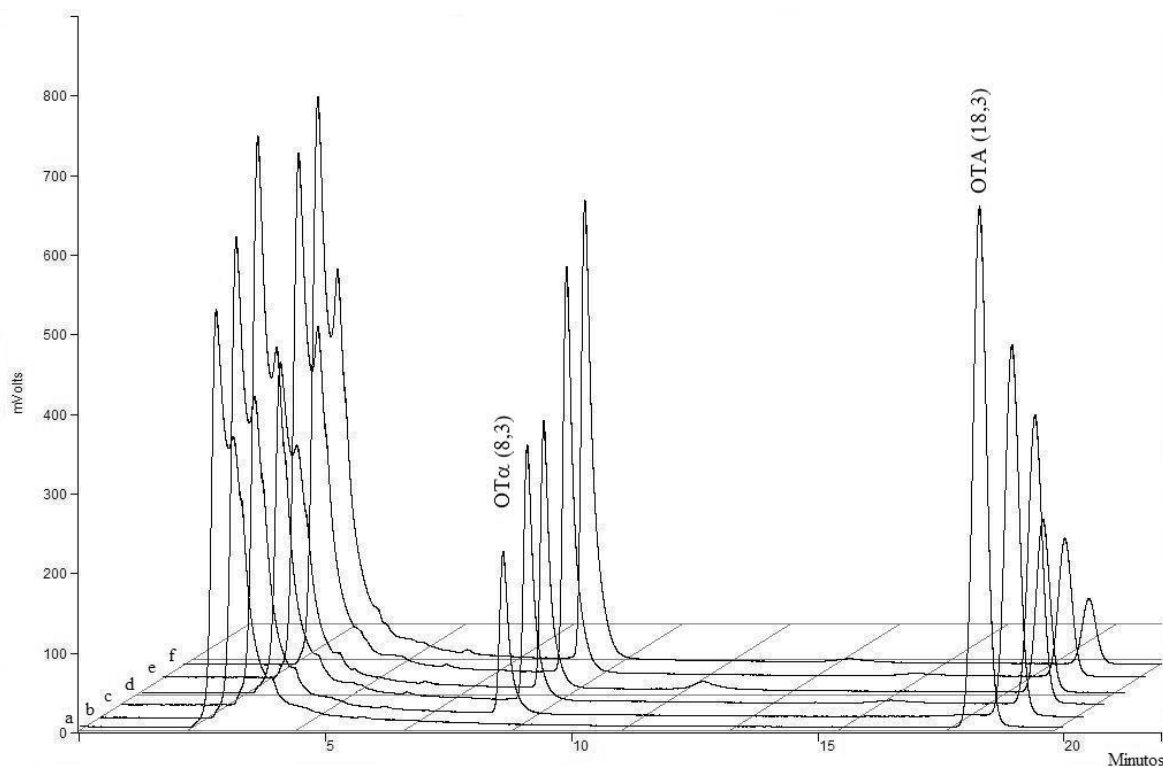


Figura A-3.1 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com Protease A a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

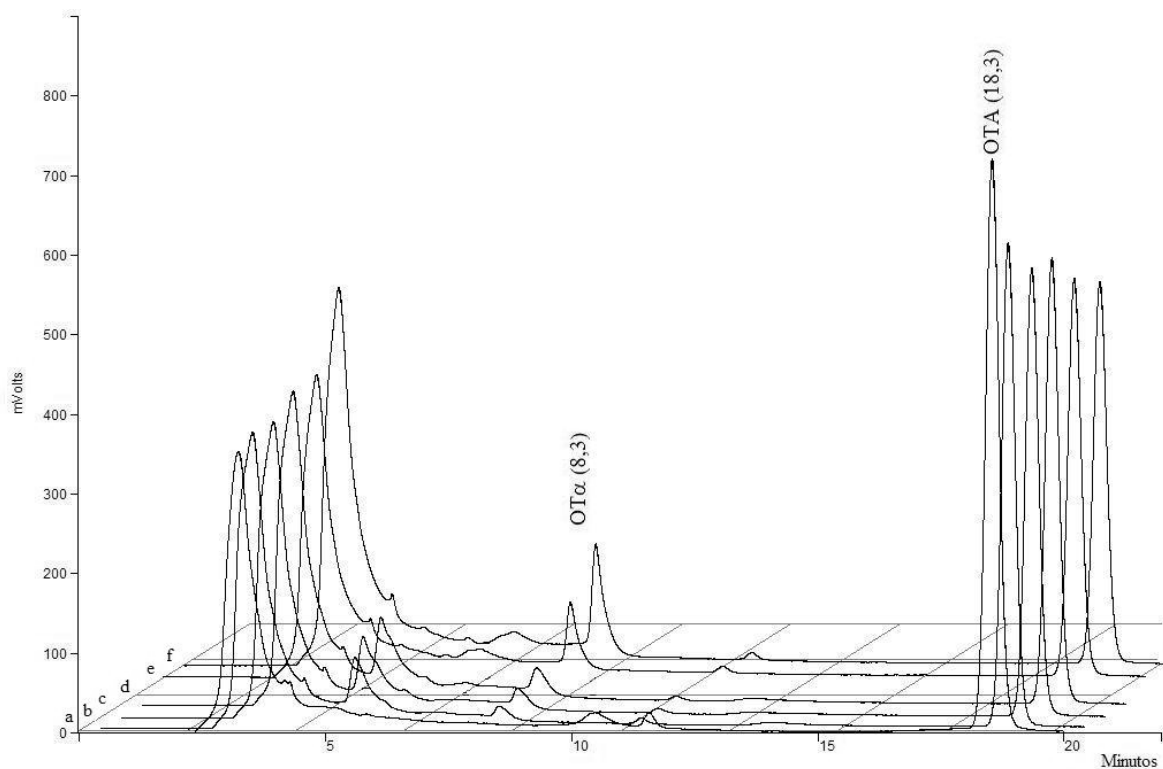


Figura A-3.2 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com Protease A a pH 8,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

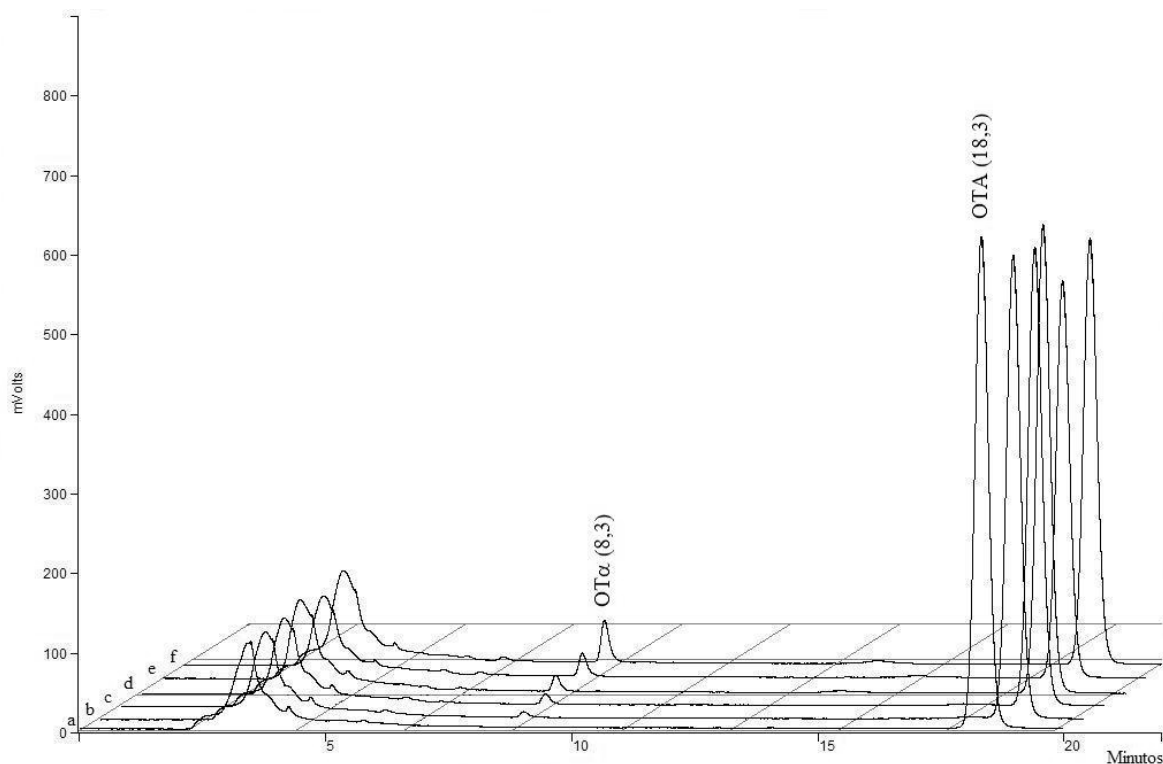


Figura A-3.3 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com Prolyve PAC a pH 3,0 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

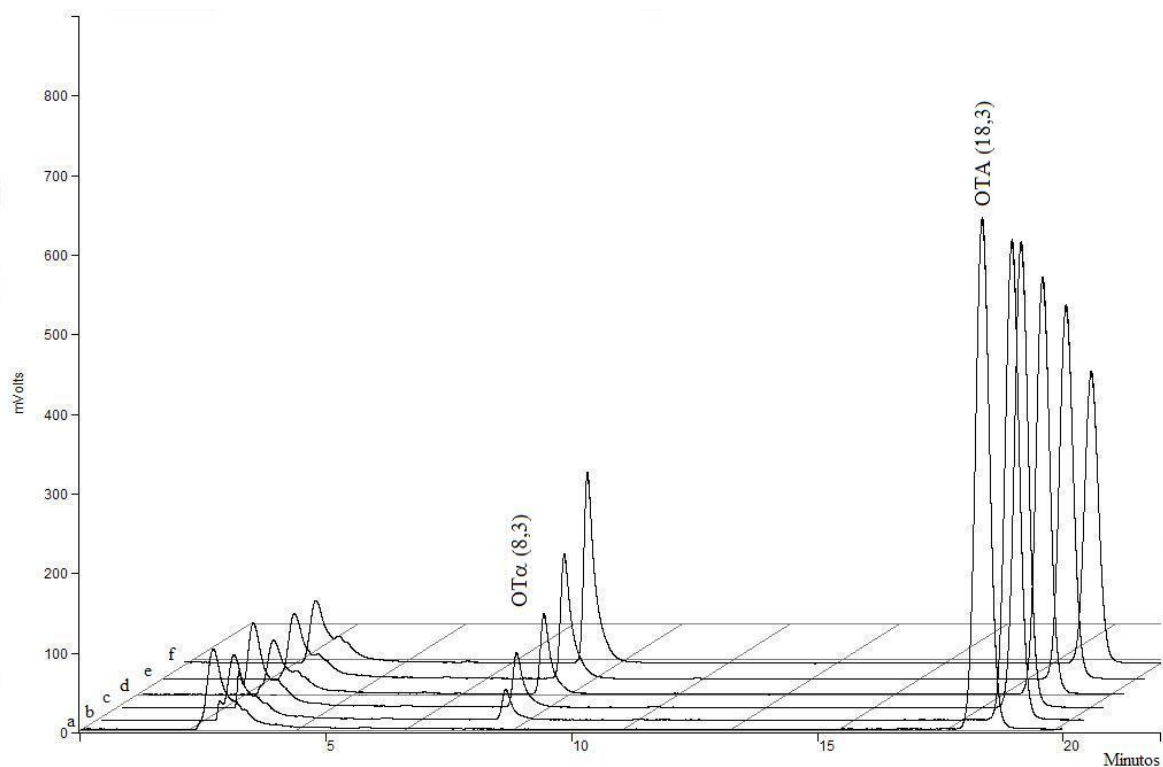


Figura A-3.4 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com Pancreatin a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

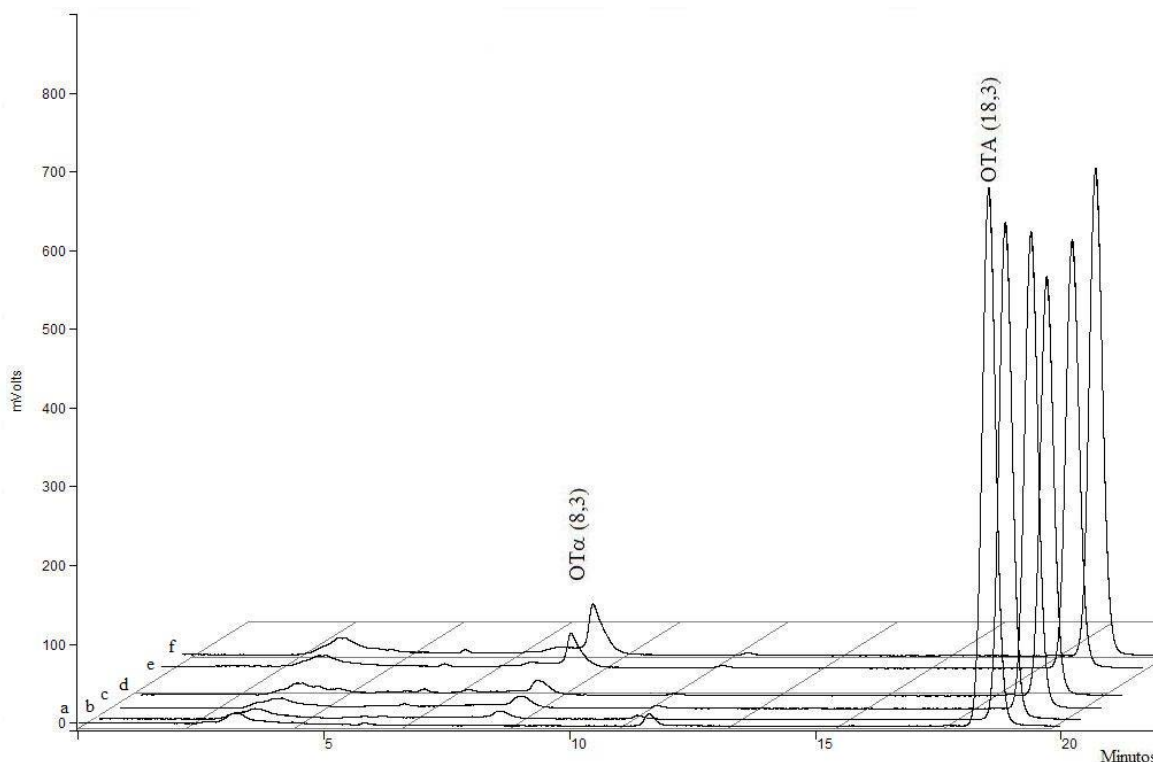


Figura A-3.5 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com Pancreatin a pH 8,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

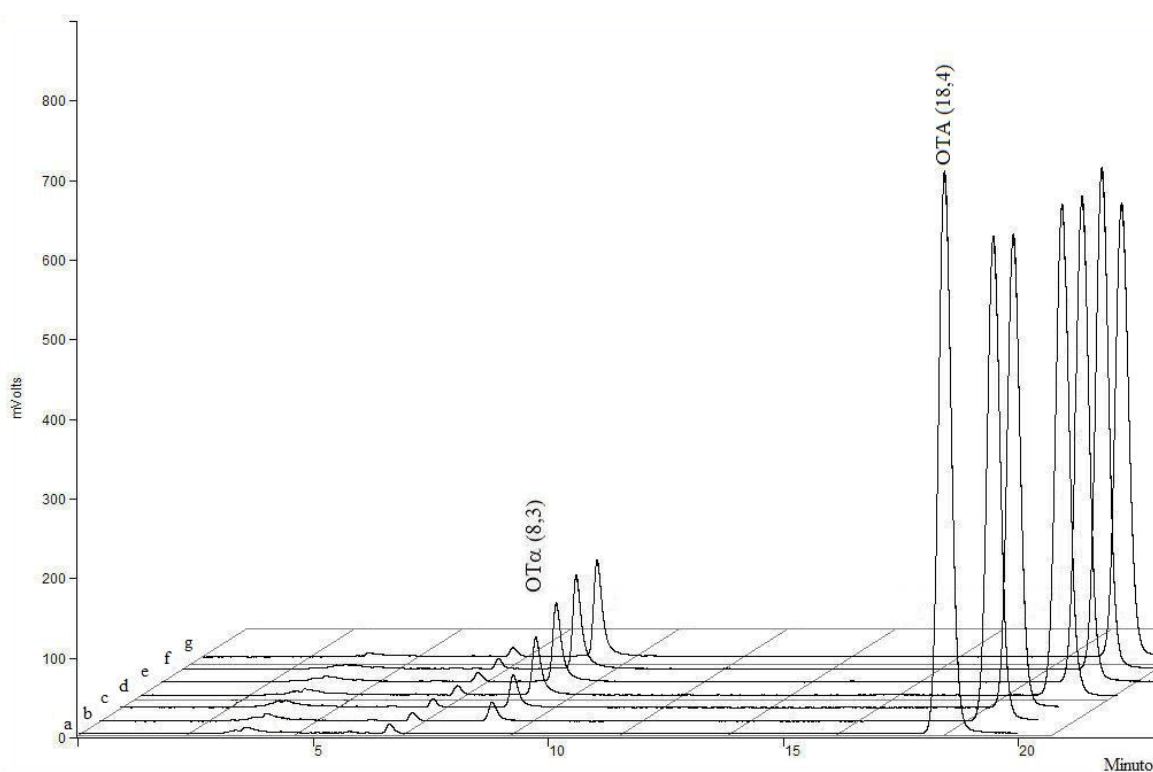


Figura A-3.6 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com CPY a pH 4,6 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 15, c) 25, d) 48, e) 72, f) 96 e g) 120 horas.

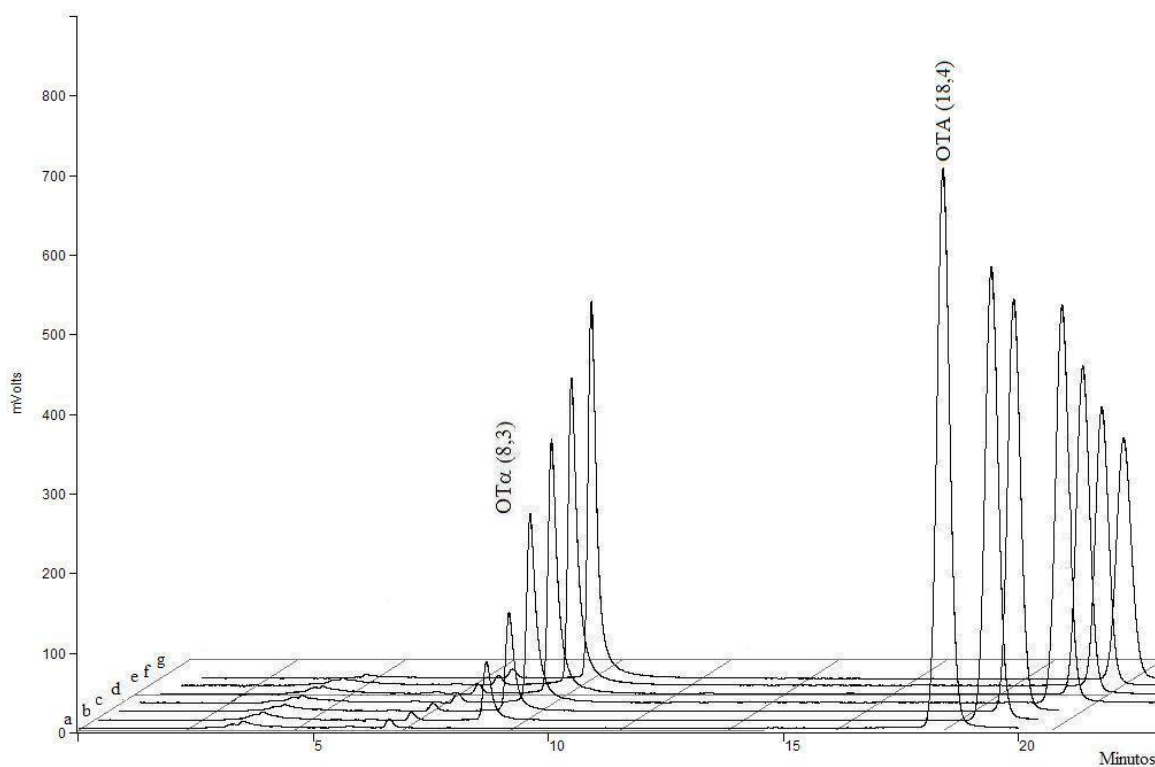


Figura A-3.7 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com CPY a pH 5,6 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 15, c) 25, d) 48, e) 72, f) 96 e g) 120 horas.

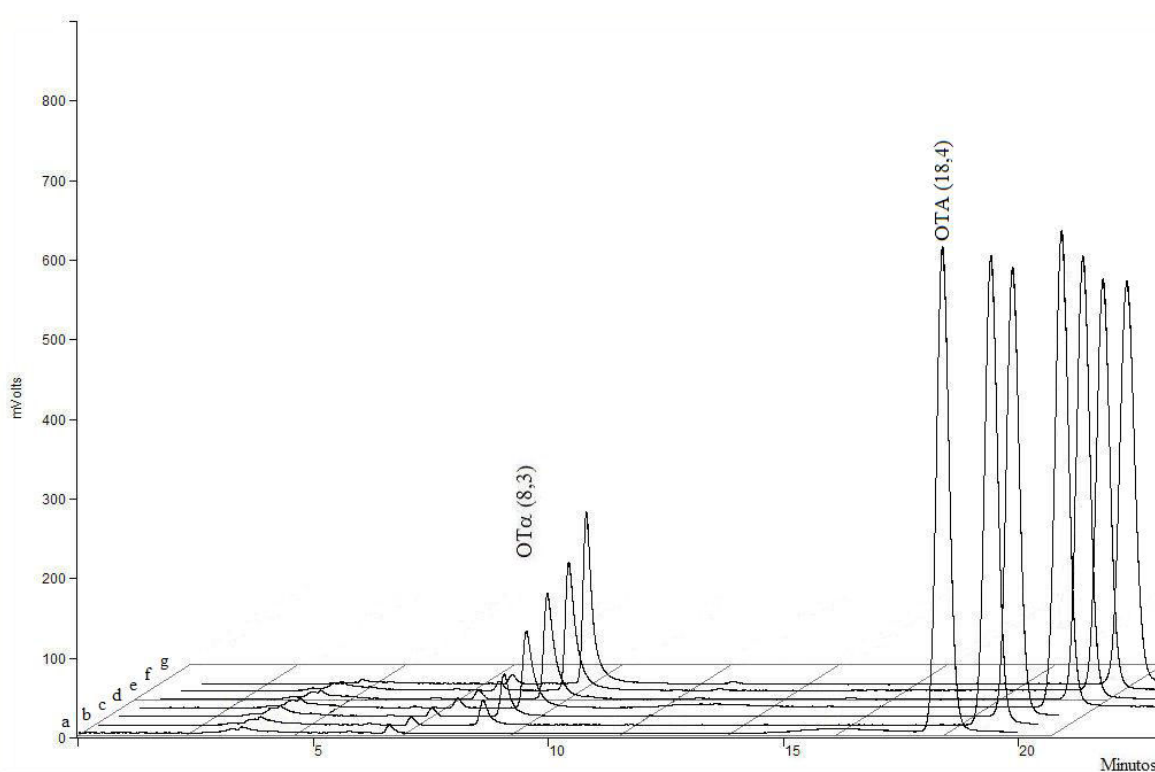


Figura A-3.8 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com CPY a pH 6,6 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 15, c) 25, d) 48, e) 72, f) 96 e g) 120 horas.

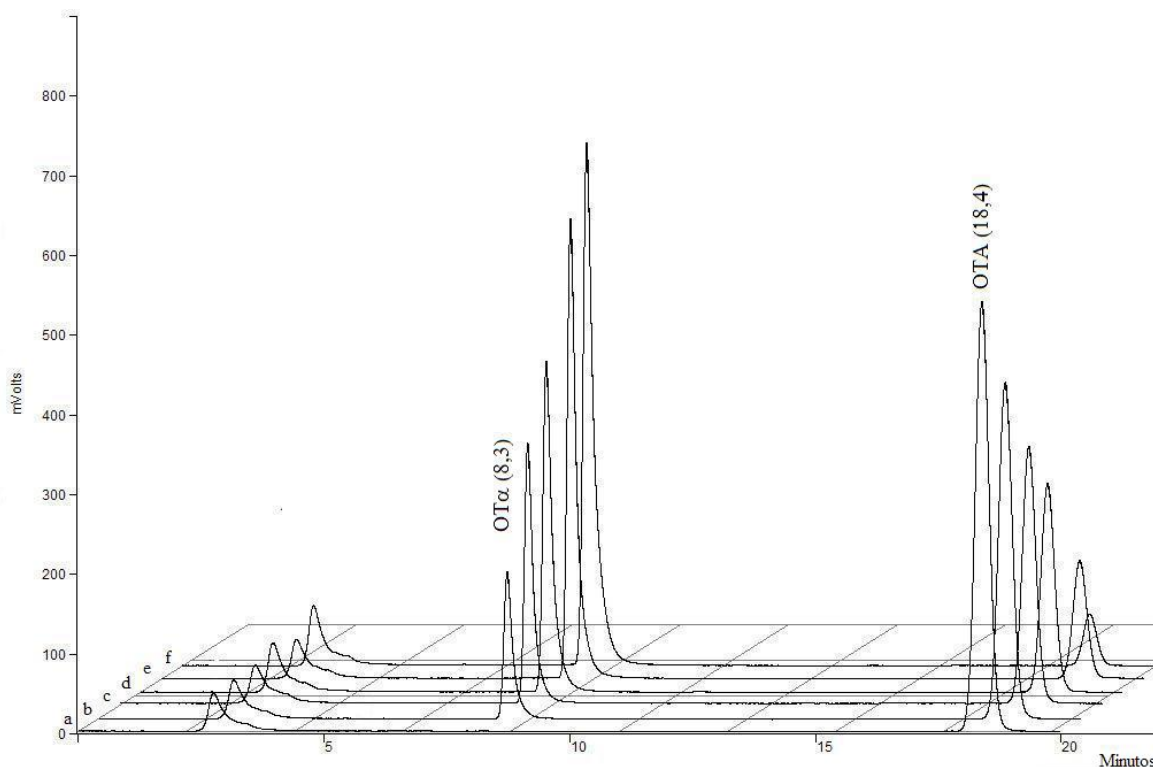


Figura A-3.9 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com a CPA a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

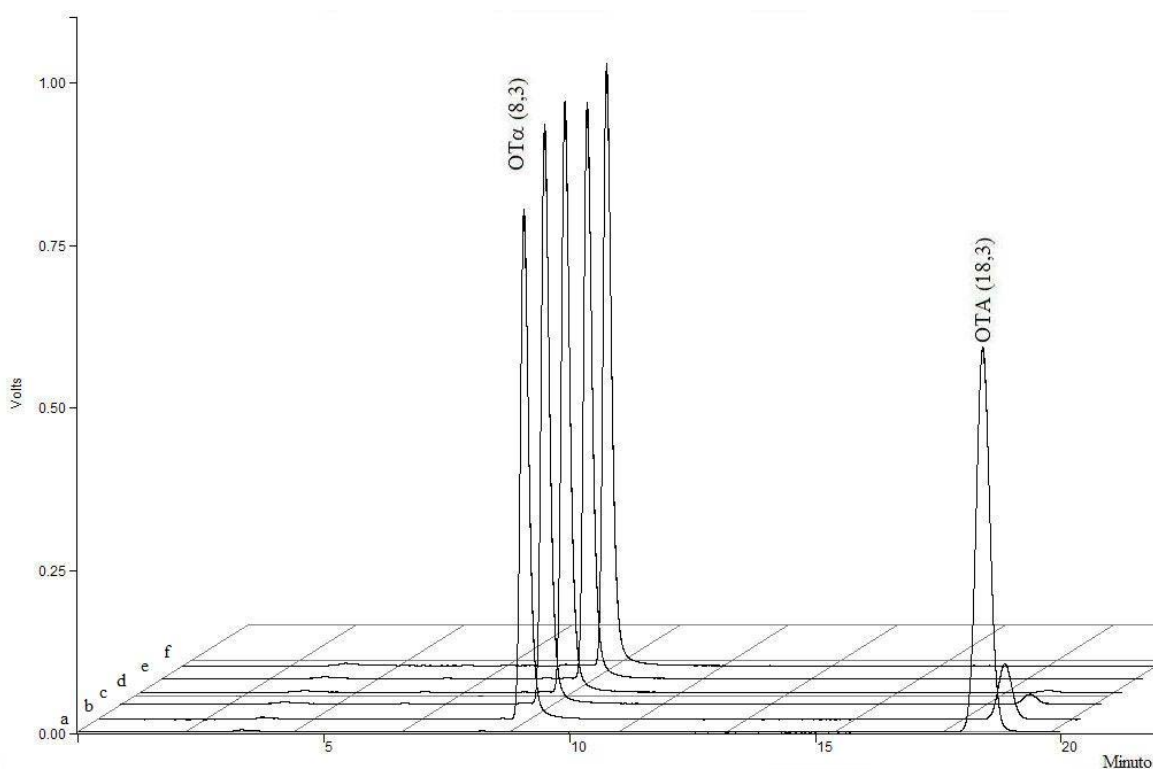


Figura A-3.10 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com a CPA a pH 8,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

Tabela A-3.10 Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados com Protease A, Prolyve PAC, Pancreatin e Carboxipeptidase A na presença de 10 mM de EDTA. Ensaios realizados a pH 7,5 e incubados a 37 °C com excepção do ensaio com Prolyve PAC que foi realizado a pH 3,0

Enzima	(μg/mL)	Tempo (horas)					
		0	3	6	9	15	25
Branco	OTA	1,112	1,038	1,043	1,020	0,991	1,199
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Protease A	OTA	1,070	0,921	0,891	0,861	0,677	0,942
	OT α	nd	0,115	0,159	0,169	0,125	0,196
Prolyve PAC	OTA	1,544	1,386	1,408	1,403	1,342	1,499
	OT α	nd	0,020	0,027	0,032	0,038	0,076
Pancreatin	OTA	1,085	0,999	1,005	0,962	0,690	1,088
	OT α	nd	0,016	0,026	0,034	0,023	0,038
Carboxipeptidase A	OTA	1,069	1,002	0,984	0,982	0,958	1,085
	OT α	nd	0,032	0,030	0,029	0,033	0,040

notas: nd - não detectado

Tabela A-3.11 Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados com Protease A, Prolyve PAC, Pancreatin e Carboxipeptidase A na presença de 1 mM de PMSF. Ensaios realizados a pH 7,5 e incubados a 37 °C com excepção do ensaio com Prolyve PAC que foi realizado a pH 3,0

Enzima	(μg/mL)	Tempo (horas)					
		0	3	6	9	15	25
Branco	OTA	1,112	1,038	1,043	1,020	0,991	1,199
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Protease A	OTA	1,040	0,784	0,598	0,502	0,338	0,207
	OT α	nd	0,248	0,349	0,482	0,636	0,776
Prolyve PAC	OTA	1,461	1,243	1,283	1,279	1,246	1,344
	OT α	nd	0,004	0,008	0,011	0,016	0,020
Pancreatin	OTA	1,039	0,965	0,906	0,744	0,683	0,640
	OT α	nd	0,042	0,099	0,124	0,212	0,416
Carboxipeptidase A	OTA	1,005	0,796	0,620	0,489	0,312	0,167
	OT α	nd	0,186	0,386	0,445	0,607	0,886

notas: nd - não detectado

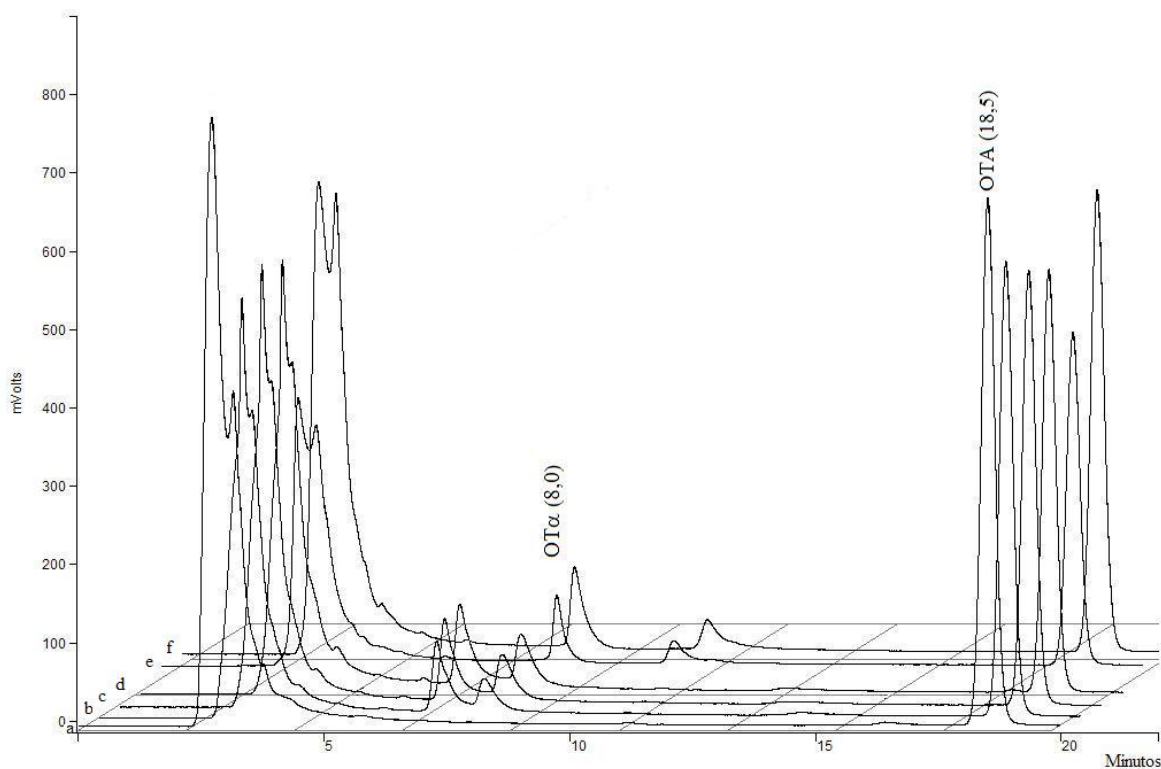


Figura A-3.11 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com Protease A e 10 mM de EDTA a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

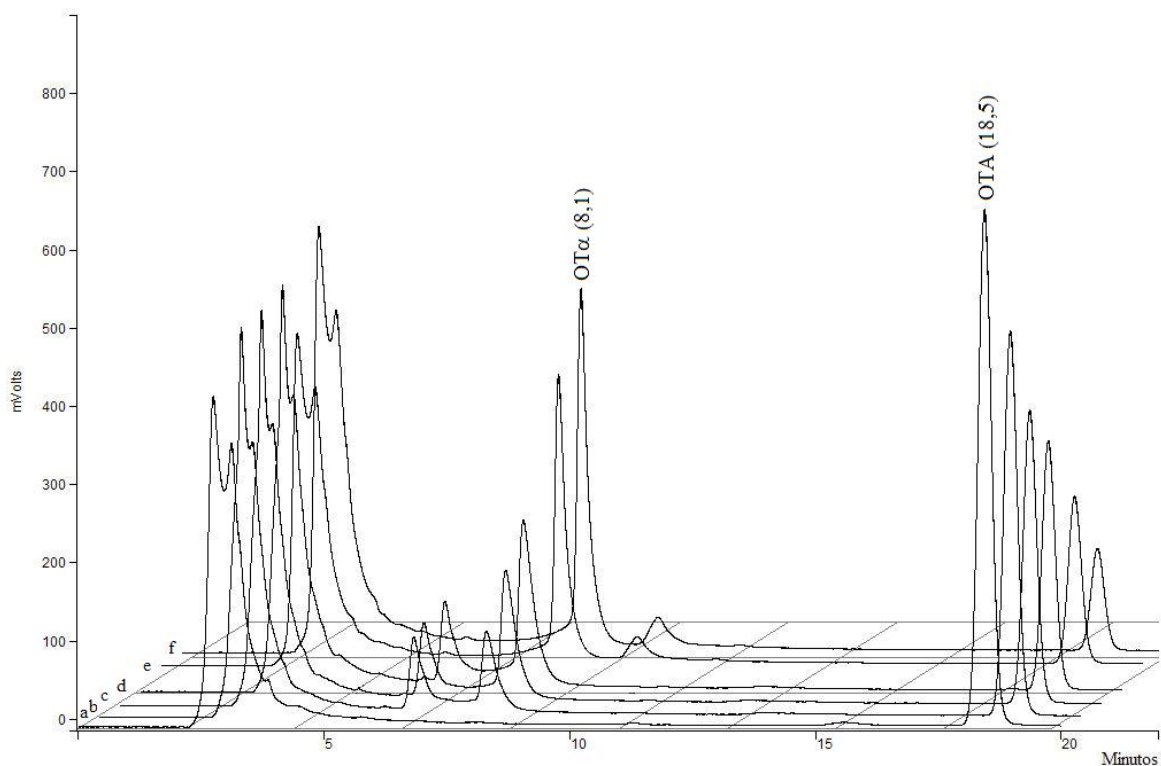


Figura A-3.12 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com Protease A e 1 mM de PMSF a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

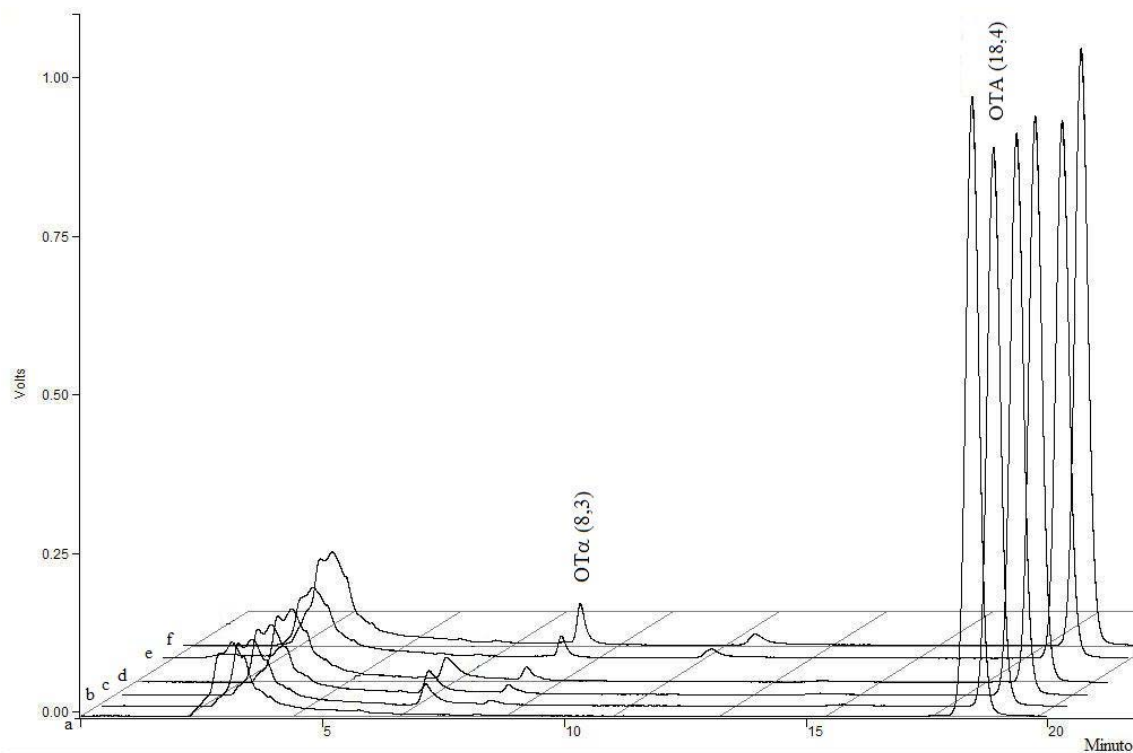


Figura A-3.13 Cromatogramas de HPLC obtidos no ensaio de degradação realizado com Prolyve PAC e 10 mM de EDTA a pH 3,0 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

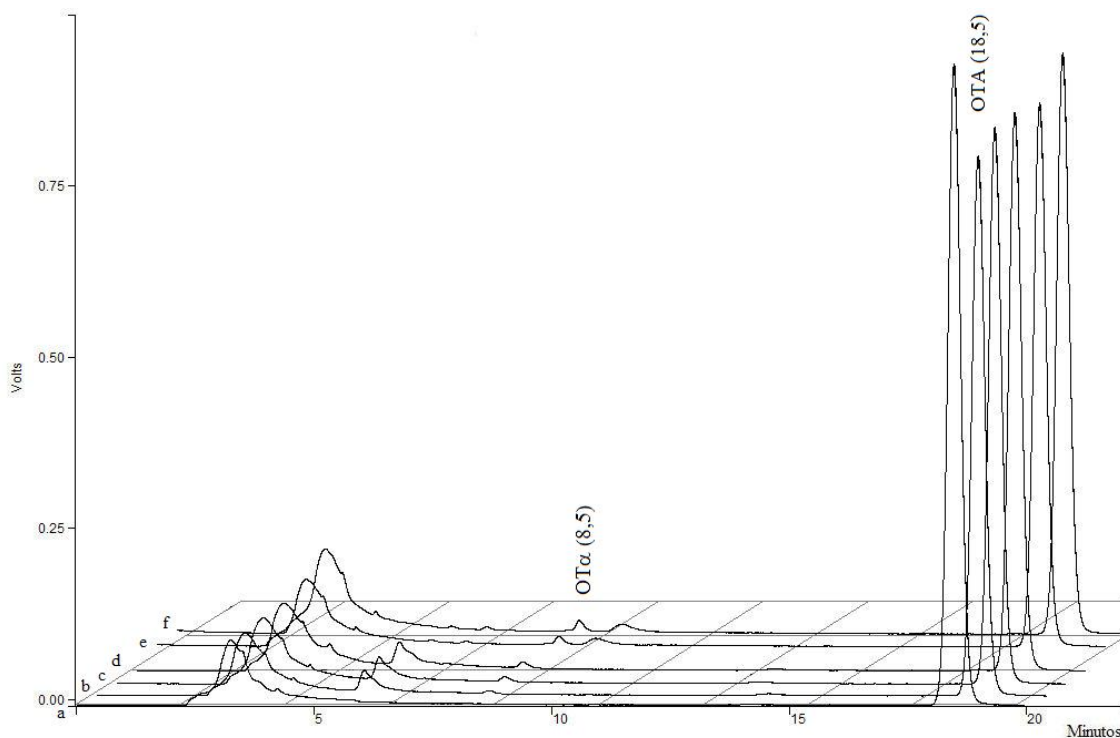


Figura A-3.14 Cromatogramas de HPLC obtidos no ensaio de degradação realizado com Prolyve PAC e 1 mM de PMSF a pH 3,0 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

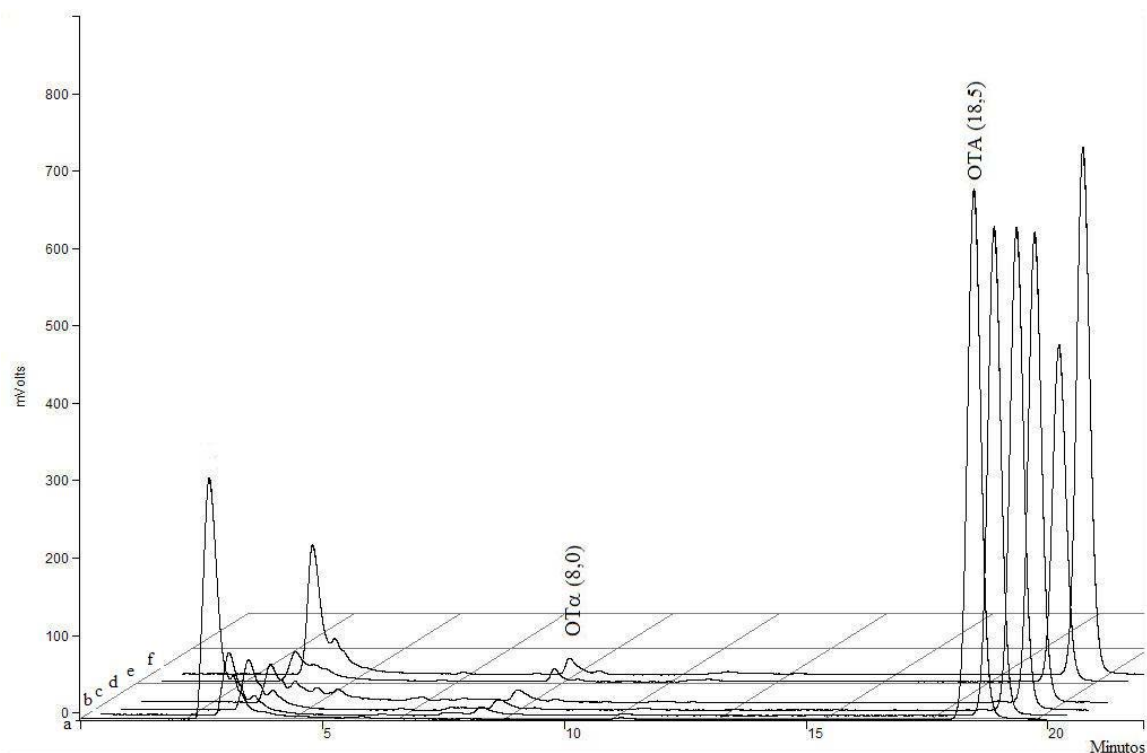


Figura A-3.15 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com Pancreatin e 10 mM de EDTA a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

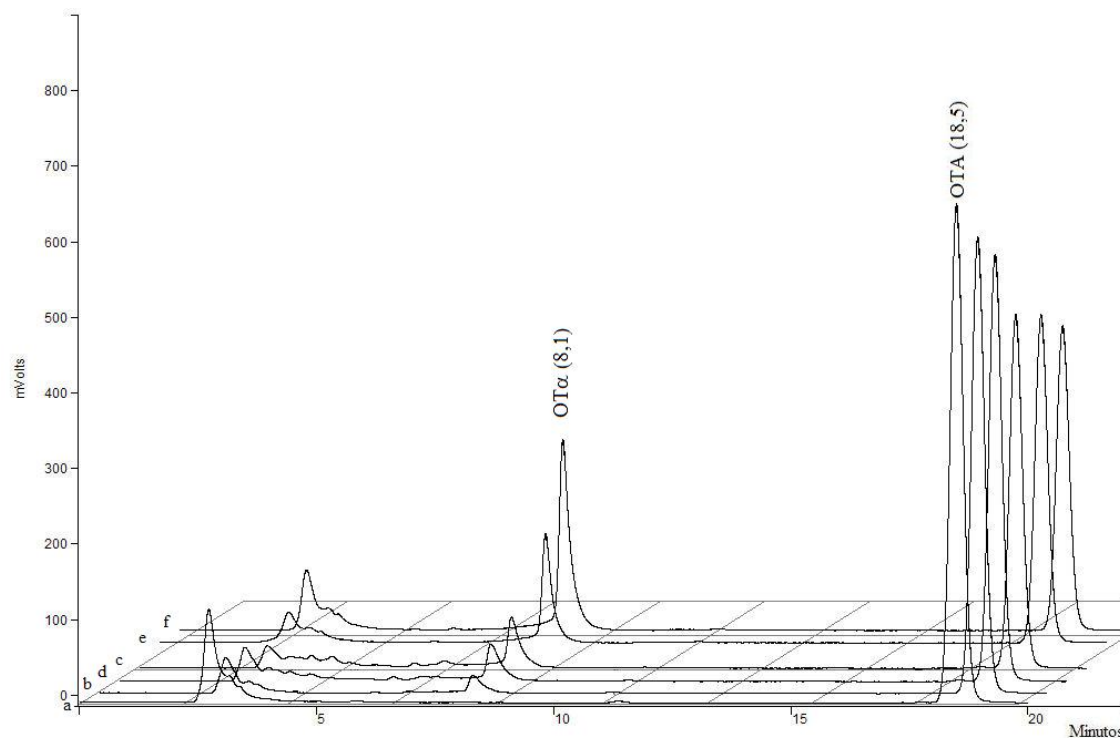


Figura A-3.16 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com Pancreatin e 1 mM de PMSF a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

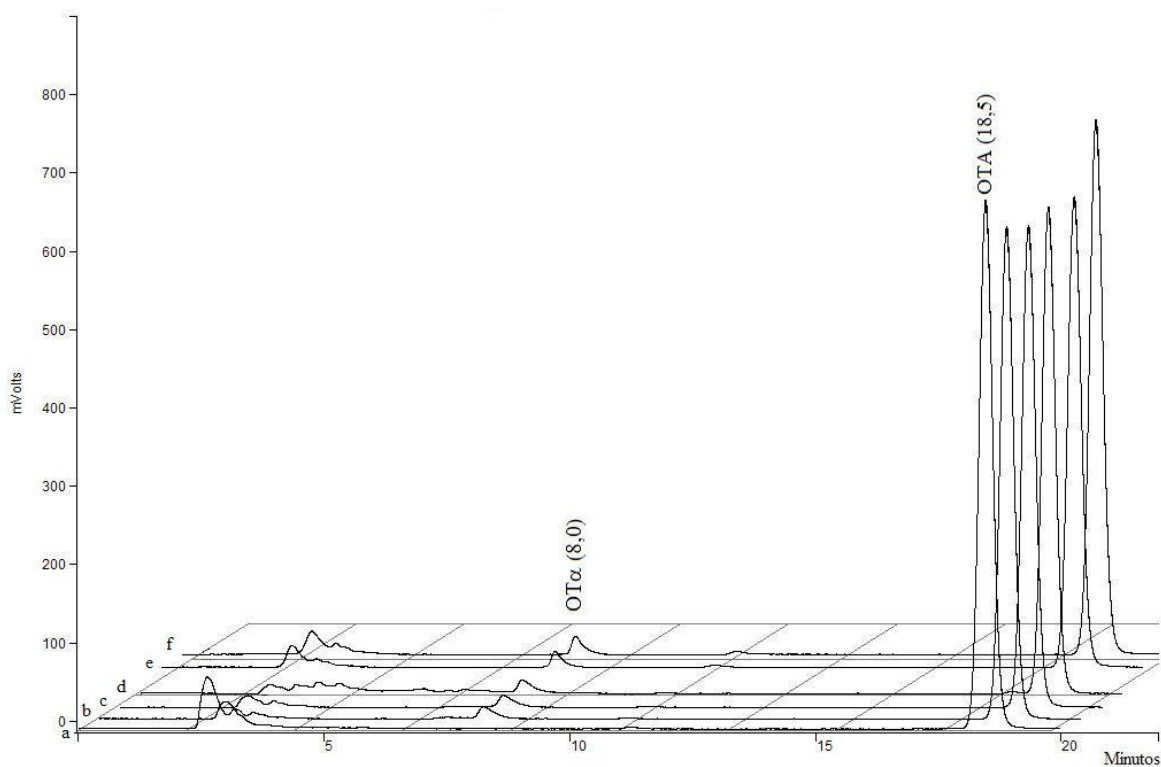


Figura A-3.17 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com CPA e 10 mM de EDTA a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

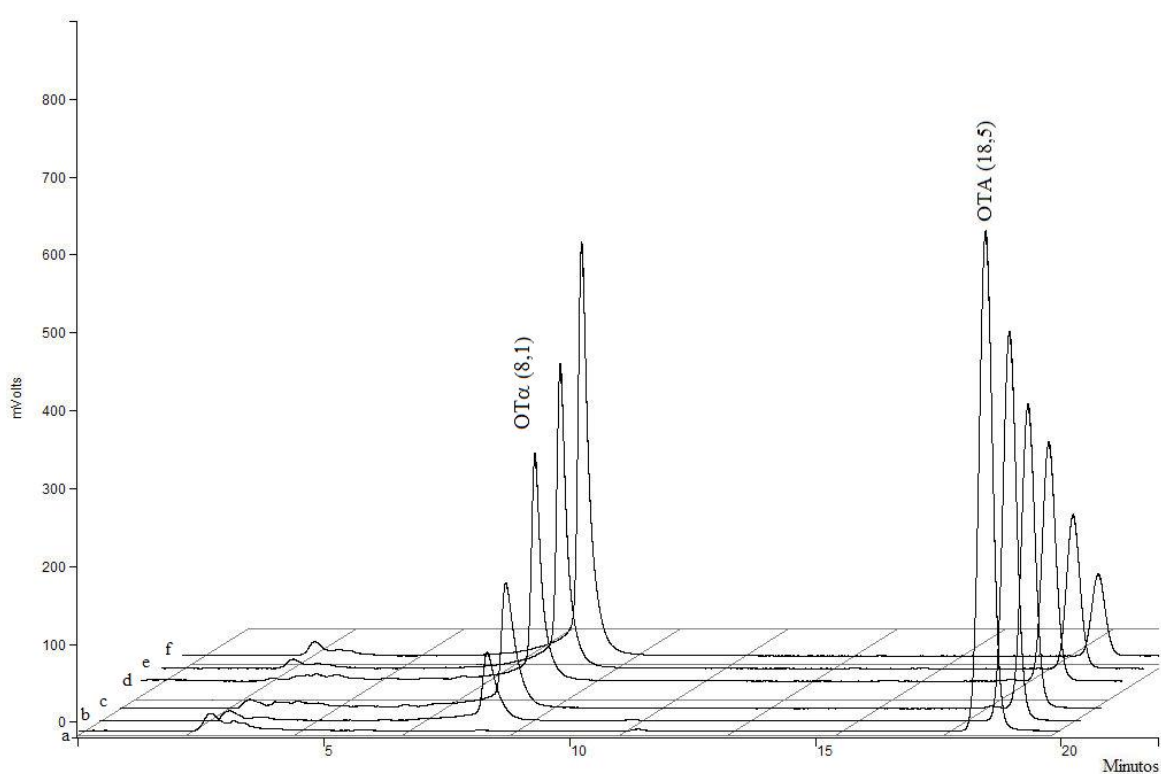


Figura A-3.18 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com CPA e 1 mM de PMSF a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

Tabela A-3.12 Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados com Protease A, Prolyve PAC, Pancreatin e CPA a pH 7,5 e incubados a 50 °C com excepção do ensaio com Prolyve PAC que foi realizado a pH 3,0

Enzima	(μg/mL)	Tempo (horas)				
		0	3	6	9	15
Branco	OTA	1,072	1,065	1,062	1,050	1,028
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd
Protease A	OTA	1,158	0,624	0,422	0,277	0,181
	OT α	nd	0,312	0,480	0,501	0,522
Prolyve PAC	OTA	1,413	1,353	1,312	1,321	1,280
	OT α	nd	0,000	0,004	0,004	0,007
Pancreatin	OTA	1,124	0,989	0,938	0,913	0,970
	OT α	nd	0,036	0,031	0,043	0,060
Carboxipeptidase A	OTA	1,069	0,682	0,642	0,633	0,594
	OT α	nd	0,153	0,175	0,200	0,160

notas: nd - não detectado

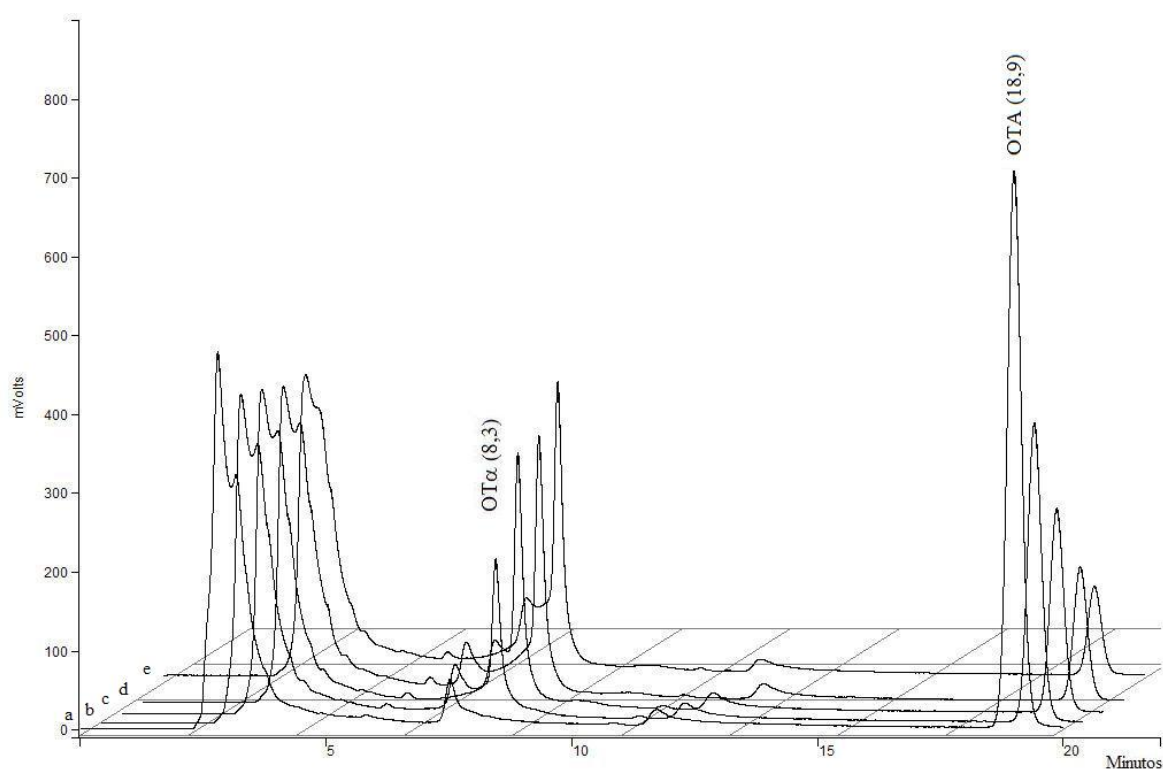


Figura A-3.19 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com Protease A a pH 7,5 e 50 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9 e e) 15 horas.

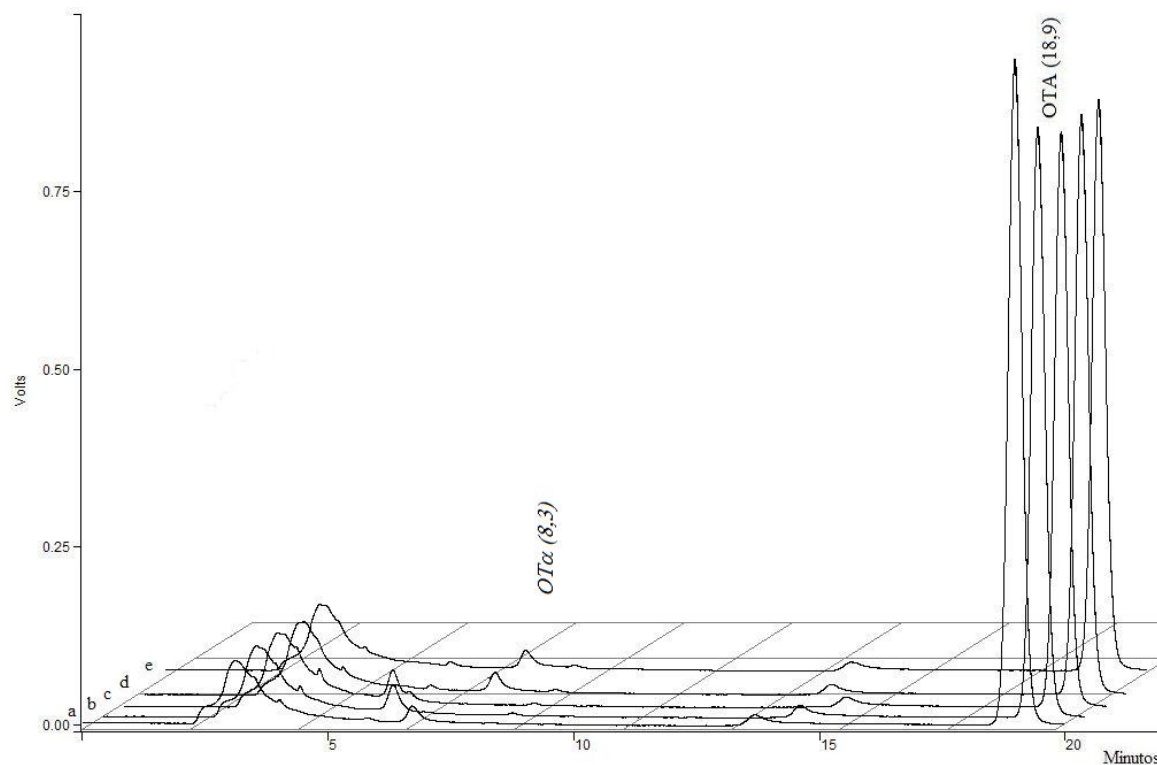


Figura A-3.20 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com Prolyve PAC a pH 3,0 e 50 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9 e e) 15 horas.

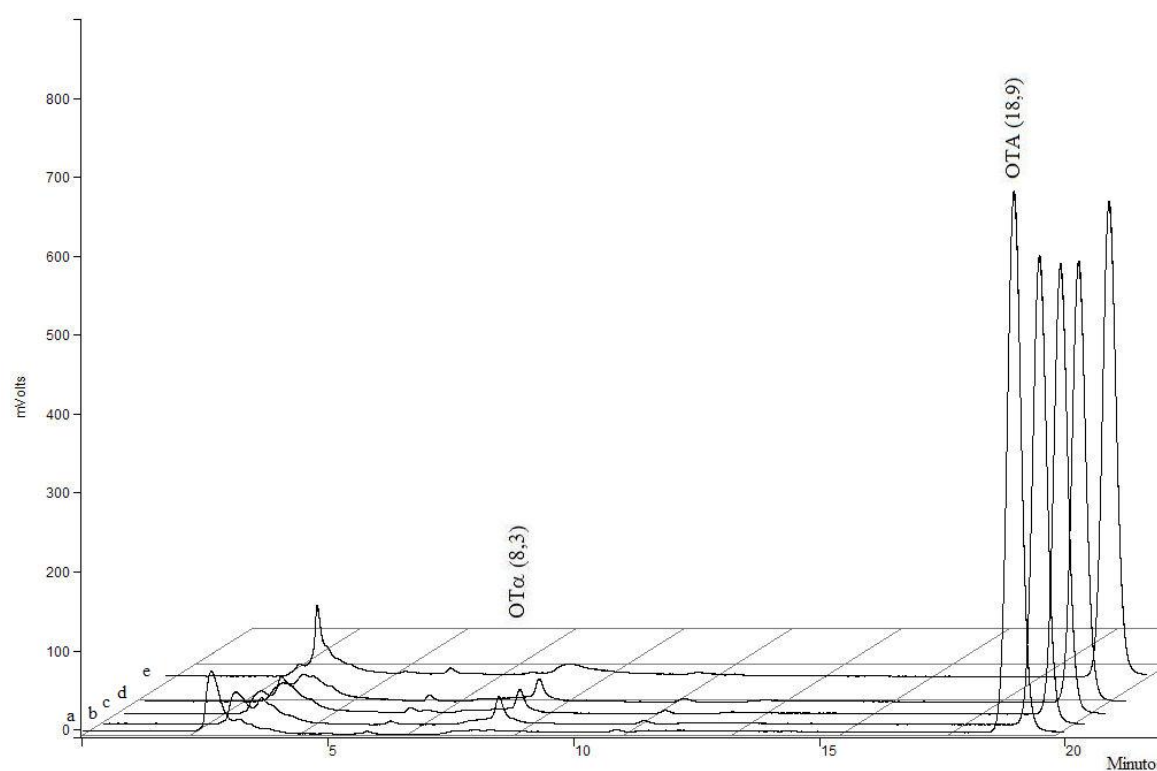


Figura A-3.21 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com Pancreatin a pH 7,5 e 50 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9 e e) 15 horas.

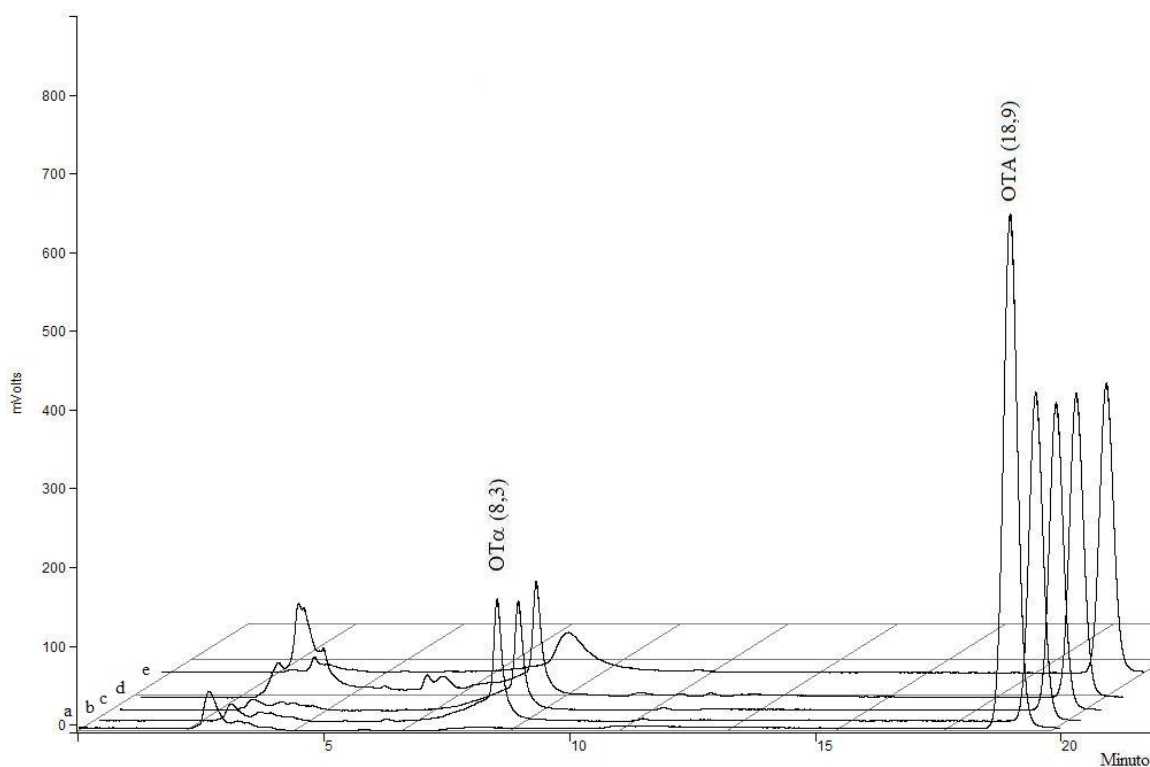


Figura A-3.22 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com CPA a pH 7,5 e 50 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9 e e) 15 horas.

Tabela A-3.13 Absorvências registadas para a quantificação da proteína nos extractos enzimáticos

Amostra	Réplicas				Média
	1	2	3	4	
Extracto cru GT	0,649	0,638	0,653	0,627	0,642
Extracto cru GT-OTA	0,659	0,710	0,662	0,642	0,668
Extracto cru GT-niger	0,662	0,671	0,664	0,672	0,667
Extracto enzimático GT	1,370	1,386	1,368	1,369	1,373
Extracto enzimático GT-OTA	0,995	1,036	1,072	1,047	1,038
Extracto enzimático GT-niger	1,075	1,132	1,131	1,186	1,131
Branco	0,400	0,421	0,417	0,416	0,414
BSA 0,1 mg/mL	0,550	0,583	0,566	0,585	0,571
BSA 0,2 mg/mL	0,653	0,714	0,720	0,715	0,701
BSA 0,4 mg/mL	0,915	0,846	0,893	0,912	0,891
BSA 0,6 mg/mL	1,103	1,080	1,160	1,158	1,125
BSA 0,8 mg/mL	1,222	1,457	1,472	1,475	1,407
BSA 1,0 mg/mL	1,700	1,676	1,710	1,698	1,696

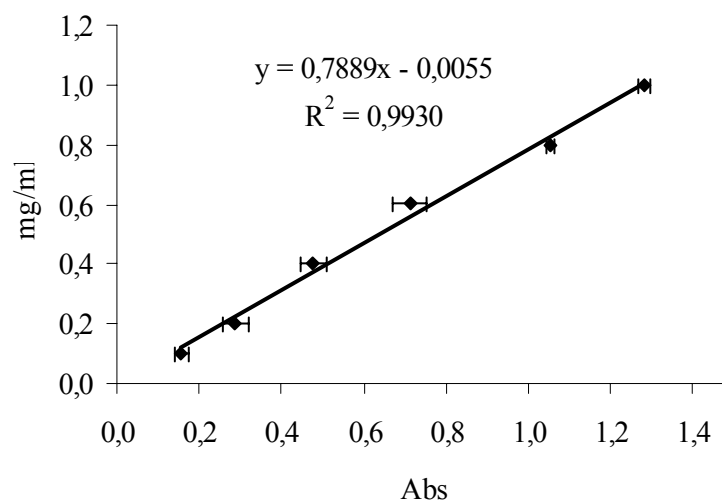


Figura A-3.23 Curva de calibração elaborada para quantificar o conteúdo em proteína dos extractos produzidos. Cada ponto representa a média de 4 réplicas e as barras o desvio padrão.

Tabela A-3.14 Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados a pH 3,0 e 37 °C com os extractos enzimáticos obtidos

Extracto enzimático	($\mu\text{g/mL}$)	Tempo (horas)					
		0	3	6	9	15	25
Branco	OTA	1,004	0,976	0,978	1,000	0,996	0,994
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
GT	OTA	1,092	0,976	0,977	1,009	1,003	1,003
	OT α	nd	0,002	0,003	0,001	0,001	0,001
GT-OTA	OTA	0,989	0,988	1,002	1,004	1,030	1,028
	OT α	nd	0,024	0,024	0,026	0,027	0,030
GT-niger	OTA	0,988	0,973	0,986	0,996	1,077	1,029
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd

notas: nd - não detectado

Tabela A-3.15 Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados a pH 5,6 e 37 °C com os extractos enzimáticos obtidos

Extracto enzimático	($\mu\text{g/mL}$)	Tempo (horas)					
		0	3	6	9	15	25
Branco	OTA	0,949	0,944	0,961	0,963	1,003	0,969
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
GT	OTA	0,917	0,903	0,894	0,935	0,950	0,940
	OT α	nd	0,000	0,001	0,001	0,002	0,004
GT-OTA	OTA	1,018	0,903	0,913	0,894	0,865	0,806
	OT α	nd	0,049	0,068	0,092	0,131	0,192
GT-niger	OTA	1,014	0,915	0,905	0,906	0,883	0,904
	OT α	nd	0,011	0,022	0,030	0,051	0,082

notas: nd - não detectado

Tabela A-3.16 Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados a pH 7,5 e 37 °C com os extractos enzimáticos obtidos

Extracto enzimático	(µg/mL)	Tempo (horas)					
		0	3	6	9	15	25
Branco	OTA	0,969	0,932	0,941	0,999	0,983	1,065
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
GT-10dias	OTA	1,046	0,937	0,971	0,942	0,953	0,862
	OT α	nd	0,011	0,034	0,054	0,080	0,127
GT-OTA	OTA	0,930	0,468	0,225	0,129	0,030	0,002
	OT α	nd	0,585	0,874	1,088	1,147	1,195
GT-niger	OTA	0,994	0,310	0,114	0,047	0,005	0,000
	OT α	nd	0,667	0,965	1,086	1,122	1,149

notas: nd - não detectado

Tabela A-3.17 Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados a pH 8,5 e 37 °C com os extractos enzimáticos obtidos

Extracto enzimático	(µg/mL)	Tempo (horas)					
		0	3	6	9	15	25
Branco	OTA	0,999	1,017	1,003	1,027	1,041	1,016
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
GT	OTA	1,044	1,002	0,946	1,003	0,997	0,993
	OT α	nd	0,005	0,001	0,001	0,001	0,001
GT-OTA	OTA	1,063	0,907	0,797	0,731	0,555	0,370
	OT α	nd	0,160	0,280	0,386	0,573	0,828
GT-niger	OTA	0,979	0,738	0,578	0,432	0,239	0,087
	OT α	nd	0,297	0,531	0,677	0,943	1,082

notas: nd - não detectado

Tabela A-3.18 Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados a pH 10,0 e 37 °C com os extractos enzimáticos obtidos

Extracto enzimático	(µg/mL)	Tempo (horas)					
		0	3	6	9	15	25
Branco	OTA	1,024	0,976	0,969	0,983	1,034	1,056
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
GT	OTA	0,928	0,928	0,914	0,964	0,948	0,953
	OT α	nd	0,018	0,018	0,019	0,019	0,019
GT-OTA	OTA	0,904	0,950	0,863	0,752	0,960	0,954
	OT α	nd	0,019	0,020	0,013	0,018	0,017
GT-niger	OTA	1,073	1,007	0,997	1,007	1,017	1,024
	OT α	nd	0,020	0,020	0,019	0,019	0,019

notas: nd - não detectado

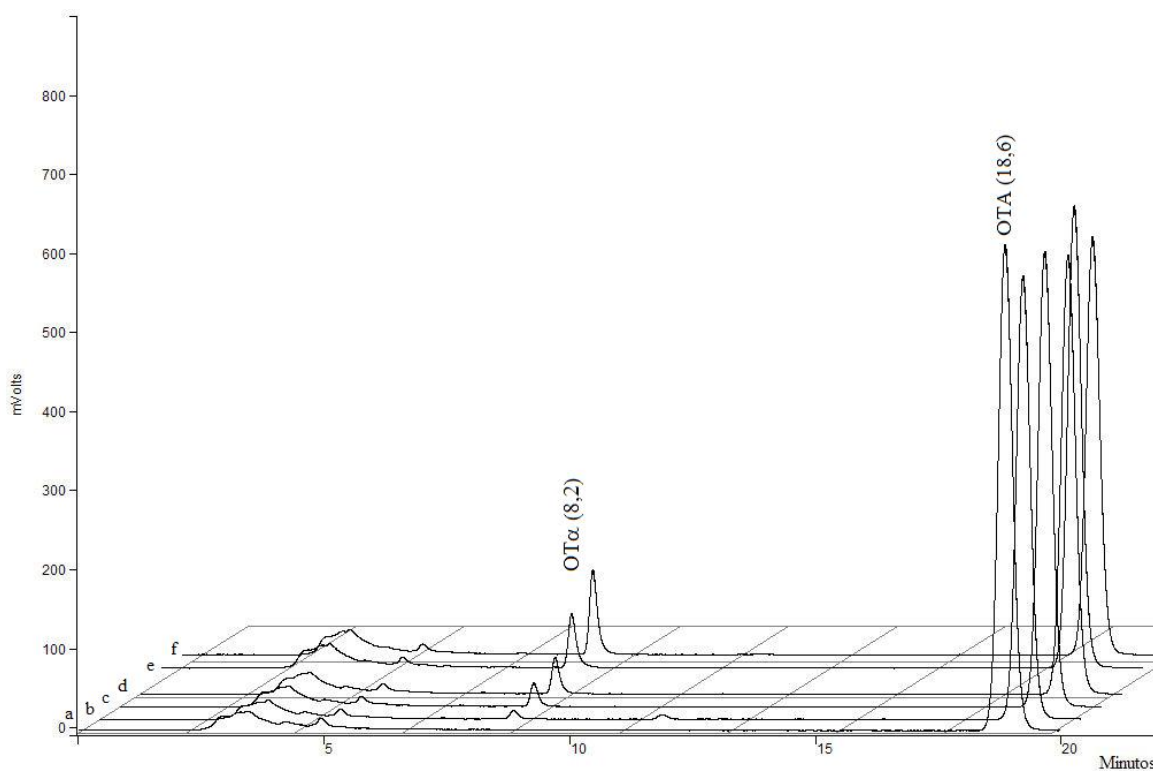


Figura A-3.24 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com o extracto enzimático obtido a partir do meio de cultura GT a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

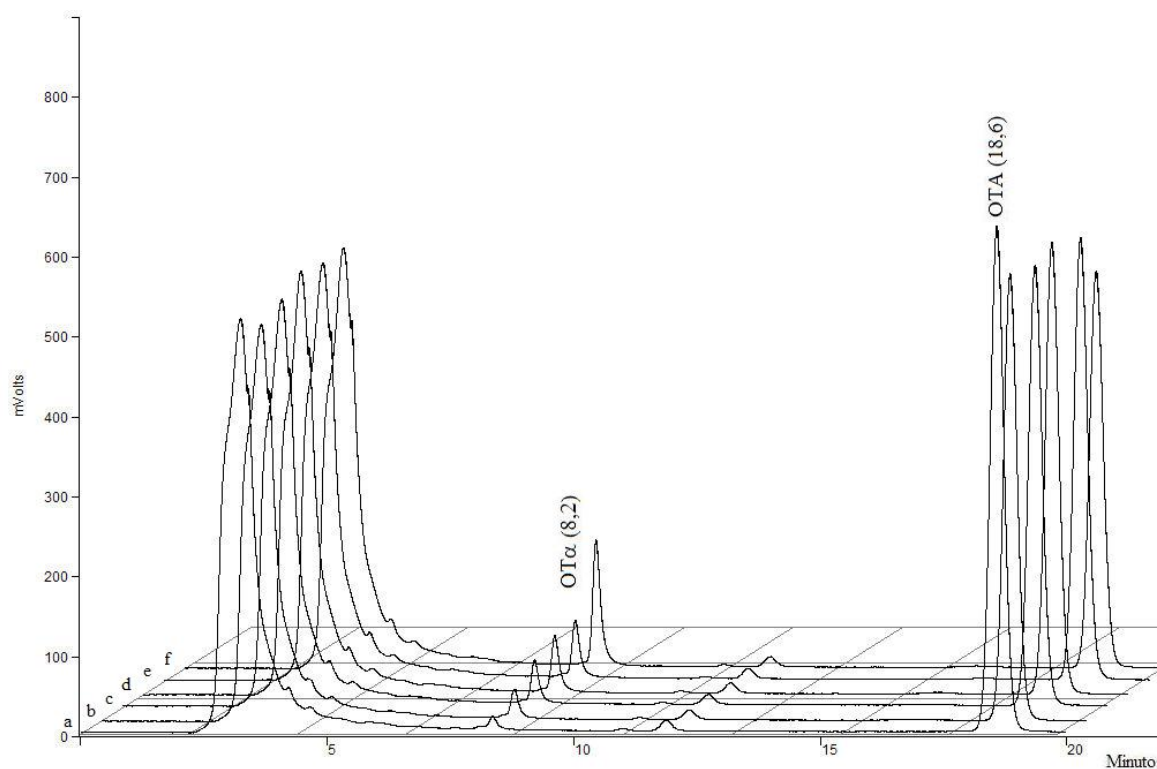


Figura A-3.25 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com o extracto enzimático obtido a partir do meio de cultura GT-OTA a pH 5,6 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

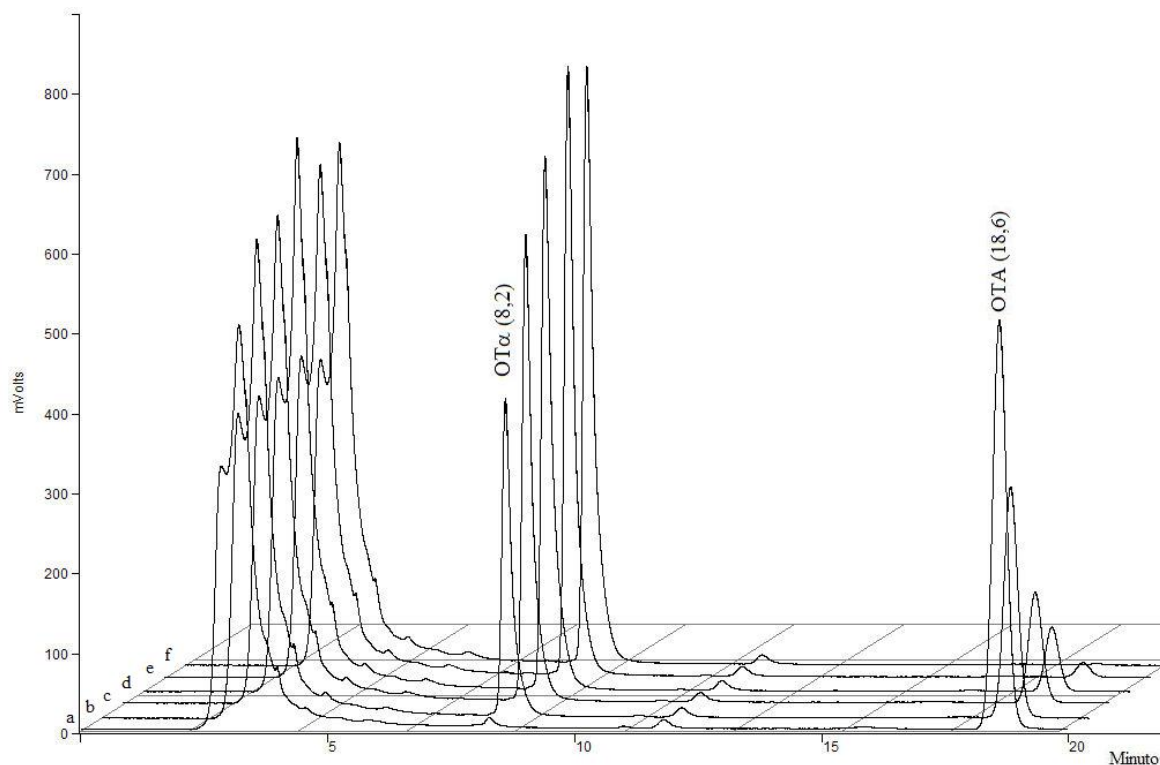


Figura A-3.26 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com o extracto enzimático obtido a partir do meio de cultura GT-OTA a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

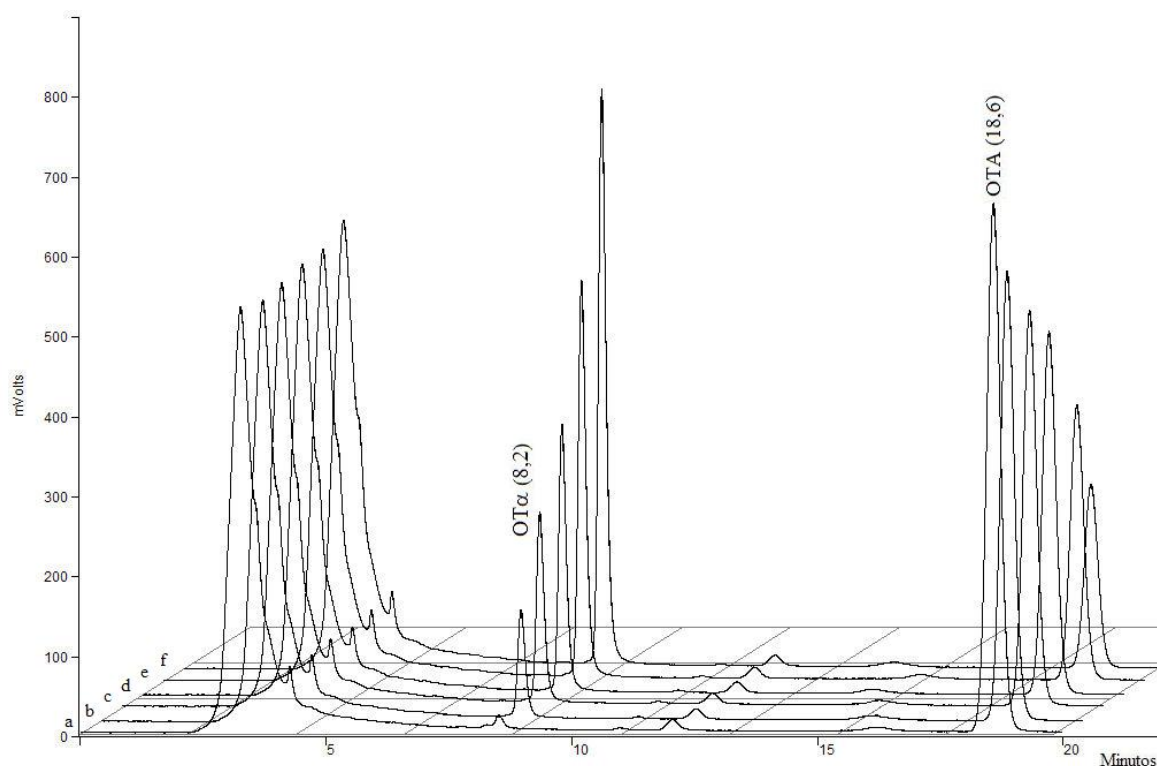


Figura A-3.27 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com o extracto enzimático obtido a partir do meio de cultura GT-OTA a pH 8,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

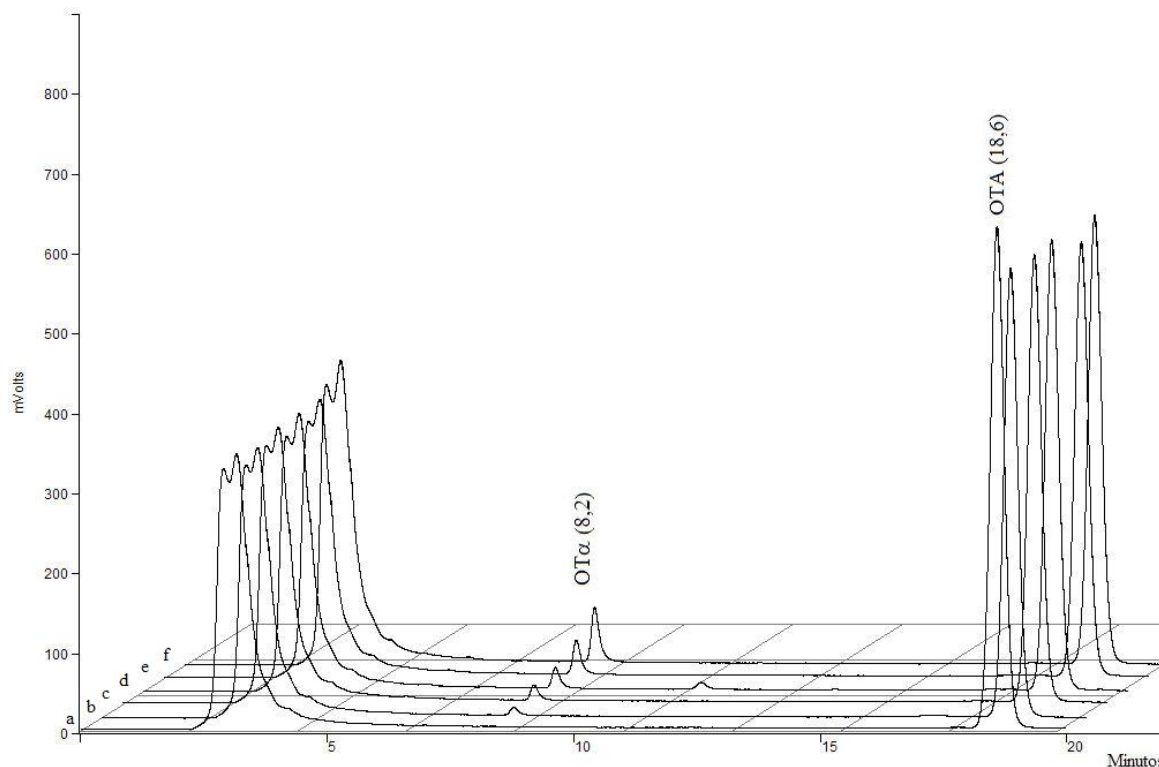


Figura A-3.28 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com o extracto enzimático obtido a partir do meio de cultura GT-niger a pH 5,6 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

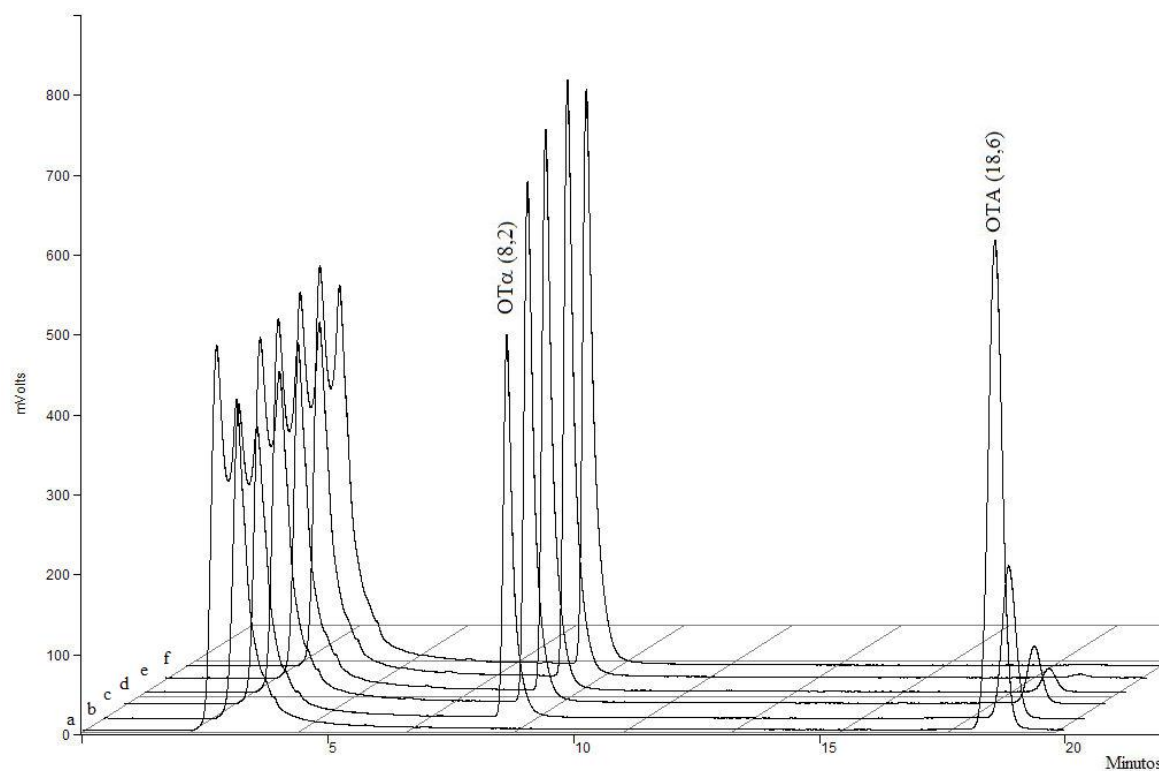


Figura A-3.29 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com o extracto enzimático obtido a partir do meio de cultura GT-niger a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

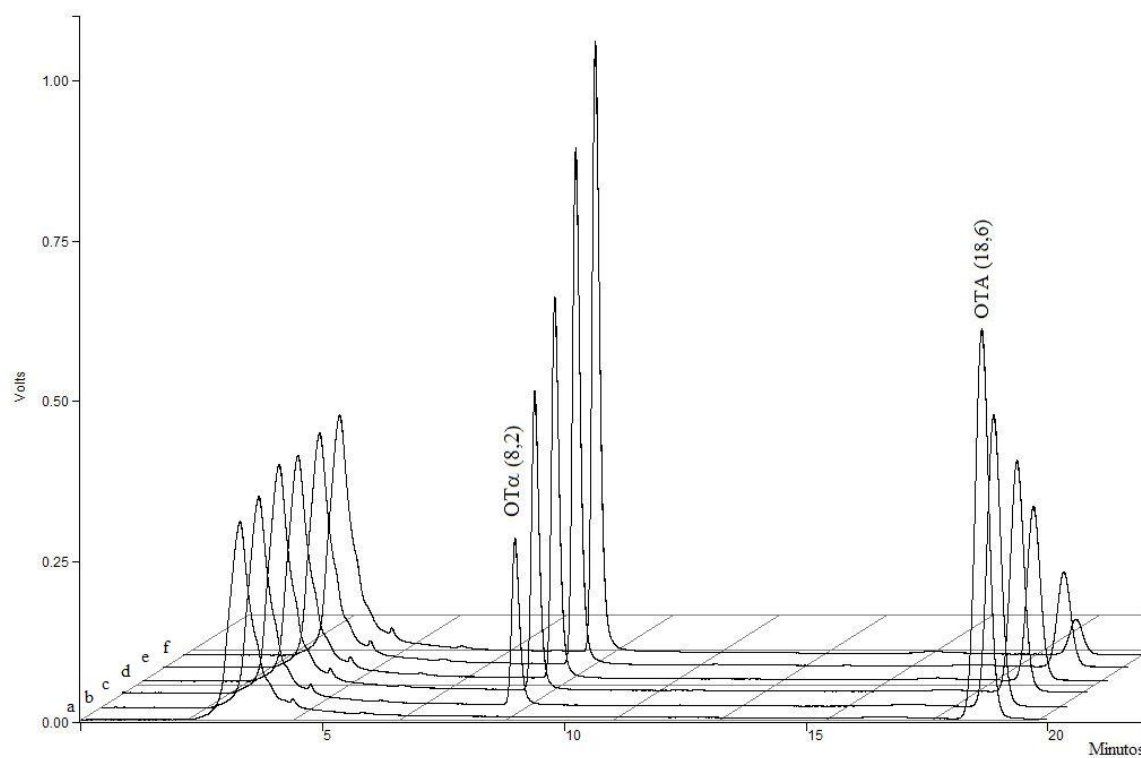


Figura A-3.30 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com o extracto enzimático obtido a partir do meio de cultura GT-niger a pH 8,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

Tabela A-3.19 Dados referentes às fracções recolhidas após separação do extracto de GT-OTA por coluna de FPLC

Fracção eluída	Absorvência	Proteína (mg/mL)	OTA (µg/mL)	OTα (µg/mL)	Actividade (U/mL)
Branco	0,482	×	×	×	×
t1,2	0,482	nd	1,019	nd	nd
t3,4	0,469	nd	1,038	nd	nd
t5,6	0,530	0,018	1,060	nd	nd
t7,8	0,538	0,026	1,013	nd	nd
t9,10	0,498	nd	1,018	nd	nd
t11,12	0,483	nd	1,024	nd	nd
t13,14	0,483	nd	1,013	nd	nd
t15,16	0,488	nd	1,035	nd	nd
t17,18	0,478	nd	1,041	nd	nd
t19,20	0,487	nd	1,027	nd	nd
t21,22	0,484	nd	1,036	nd	nd
t23,24	0,515	0,003	1,030	nd	nd
t25,26	0,531	0,019	1,006	0,003	0,018
t27,28	0,537	0,024	0,696	0,151	0,837
t29,30	0,615	0,098	0,035	0,527	2,927
t31,32	0,593	0,077	0,007	0,610	3,390
t33,34	0,511	nd	0,857	0,081	0,449
t35,36	0,502	nd	1,039	0,021	0,119
t37,38	0,502	nd	1,032	0,012	0,068
t39,40	0,496	nd	1,008	0,009	0,048
t41,42	0,488	nd	1,024	0,006	0,033
t43,44	0,480	nd	1,056	0,004	0,021
t45,46	0,475	nd	1,040	0,003	0,016
t47,48	0,493	nd	1,065	nd	nd
t49,50	0,477	nd	1,049	nd	nd
t51,52	0,472	nd	1,065	nd	nd
t53,54	0,470	nd	1,069	nd	nd
t55,56	0,466	nd	1,064	nd	nd
t57,58	0,464	nd	1,060	nd	nd
t59,60	0,468	nd	1,099	nd	nd

notas: nd - não detectado; × - não aplicável

Tabela A-3.20 Absorvências referentes aos padrões utilizados na elaboração da curva de calibração para a quantificar a proteína nas fracções recolhidas após separação do extracto de GT-OTA por FPLC

Amostra	Réplicas				Média
	1	2	3	4	
Branco	0,459	0,461	0,468	0,469	0,464
BSA 0,1 mg/mL	0,578	0,609	0,611	0,617	0,604
BSA 0,2 mg/mL	0,724	0,745	0,752	0,757	0,745
BSA 0,4 mg/mL	0,921	0,949	0,937	0,938	0,936
BSA 0,6 mg/mL	1,085	1,089	1,120	1,100	1,099
BSA 0,8 mg/mL	1,343	1,387	1,317	1,329	1,344
BSA 1,0 mg/mL	1,400	1,442	1,419	1,430	1,423

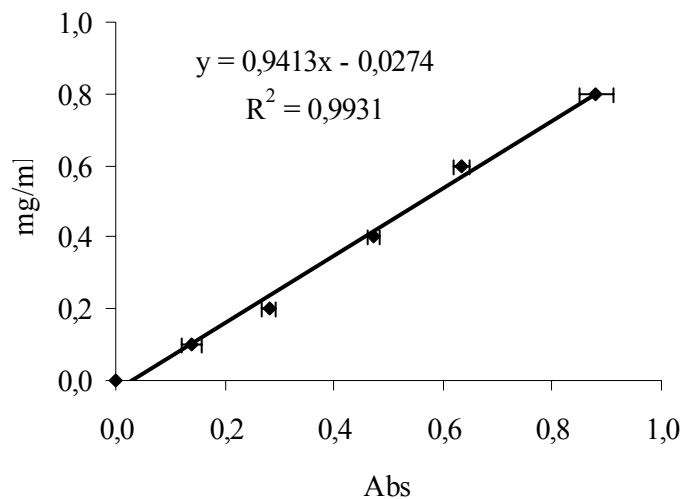


Figura A-3.31 Curva de calibração elaborada para quantificar o conteúdo em proteína das fracções recolhidas após eluição na coluna de FPLC. Cada ponto representa a média de 4 réplicas e as barras o desvio padrão.

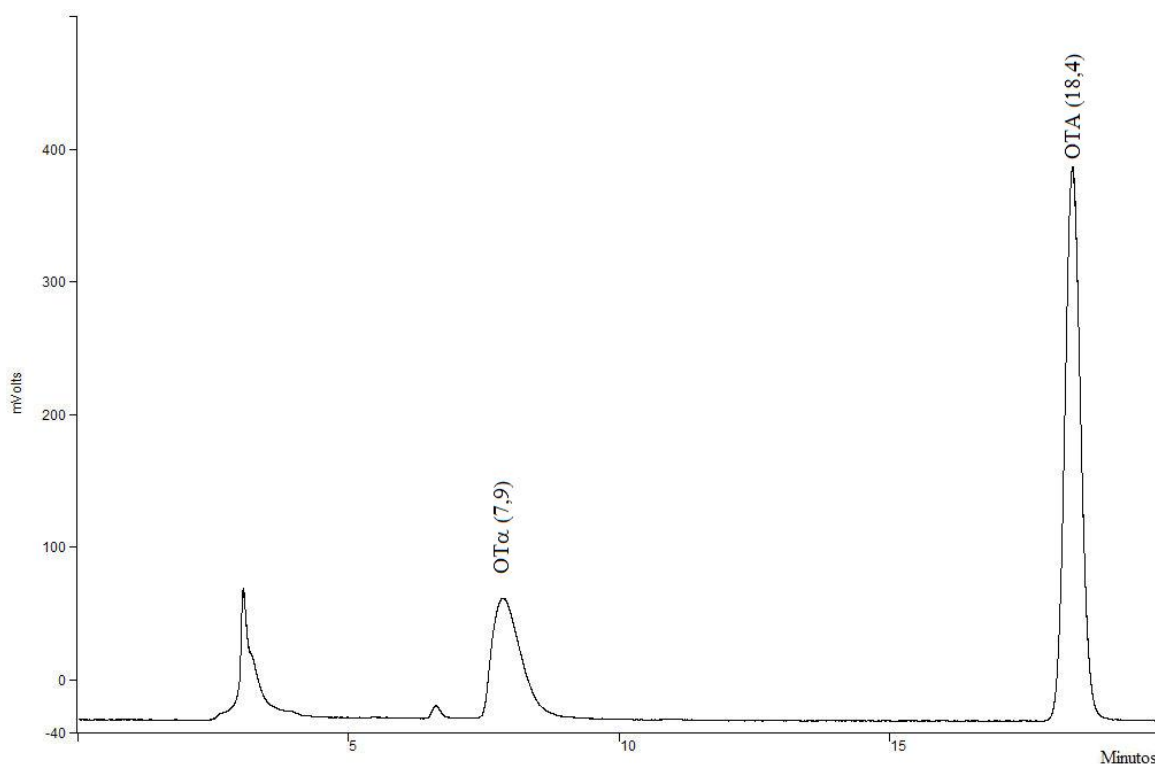


Figura A-3.32 Cromatograma de HPLC obtido no ensaio de degradação realizado com a fracção eluída t_{27,28} a pH 7,5 e 37 °C.

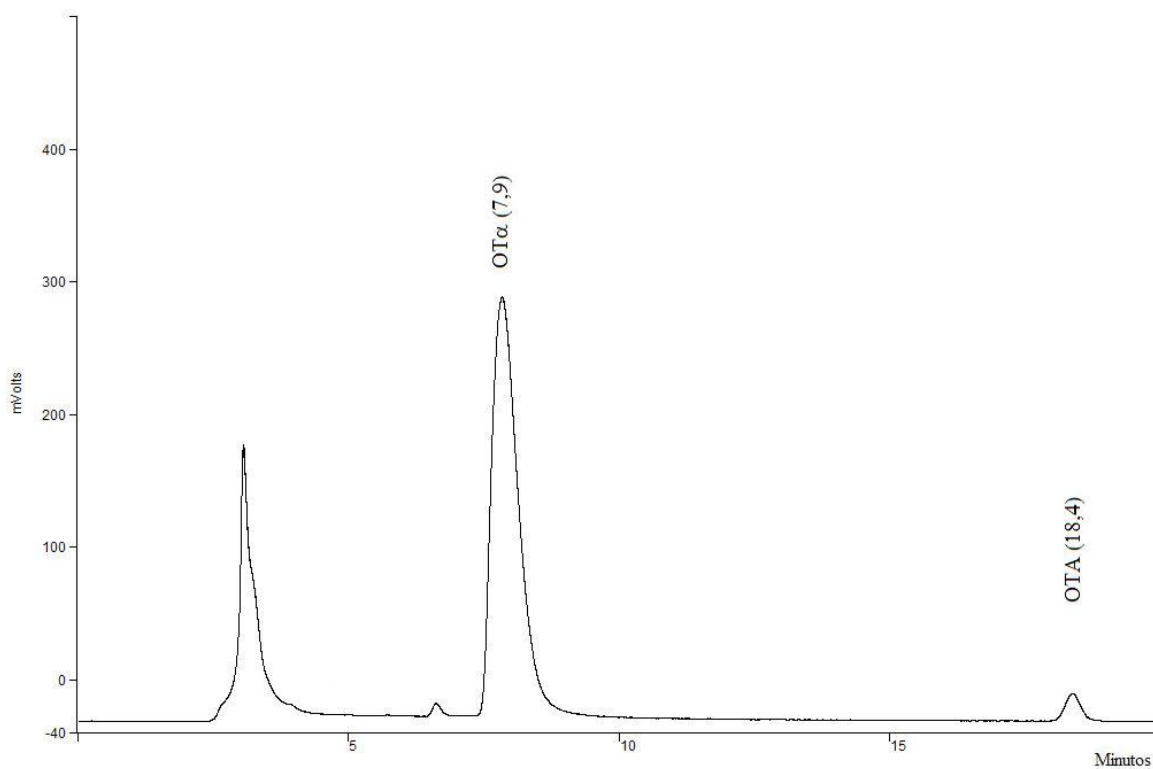


Figura A-3.33 Cromatograma de HPLC obtido no ensaio de degradação realizado com a fracção eluída t29,30 a pH 7,5 e 37 °C.

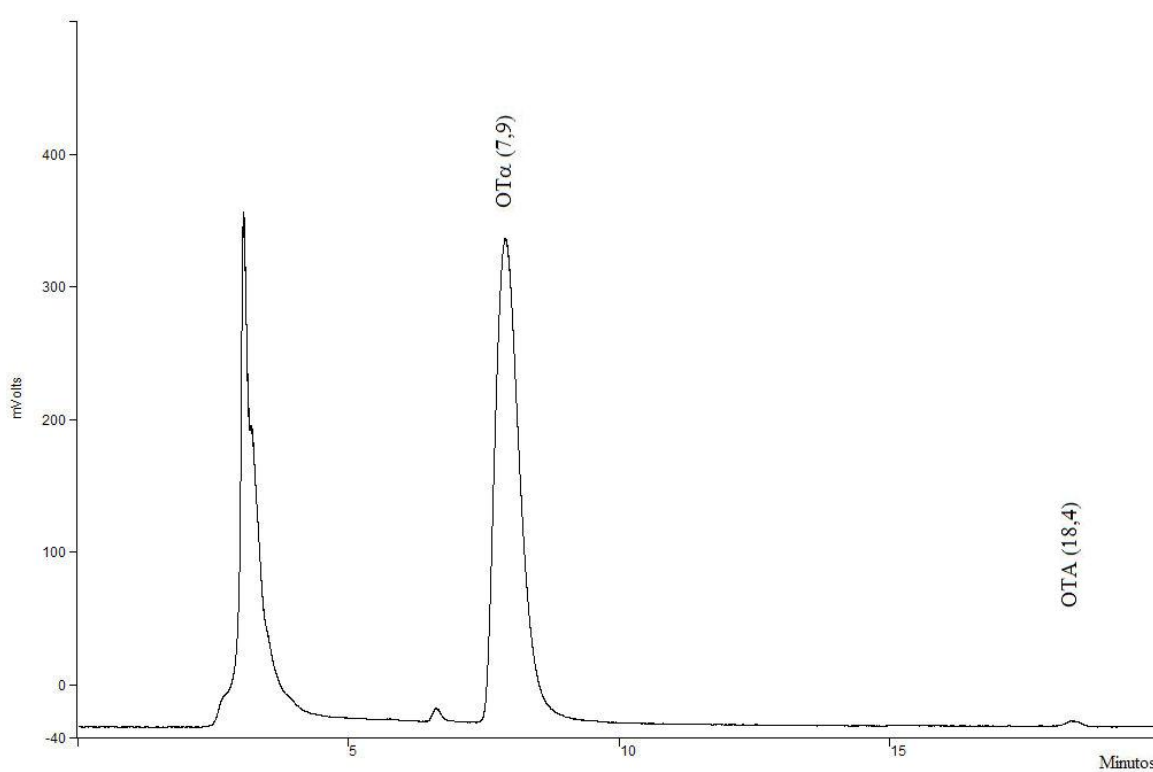


Figura A-3.34 Cromatograma de HPLC obtido no ensaio de degradação realizado com a fracção eluída t31,32 a pH 7,5 e 37 °C.

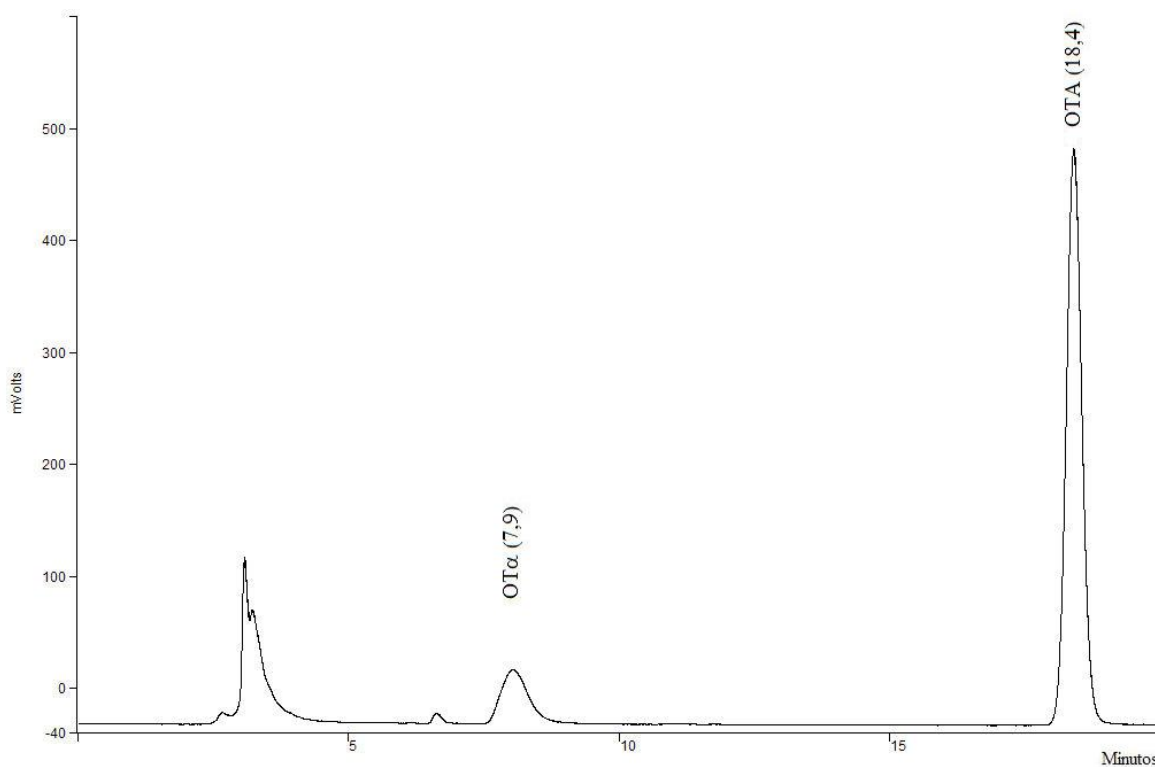


Figura A-3.35 Cromatograma de HPLC obtido no ensaio de degradação realizado com a fracção eluída t33,34 a pH 7,5 e 37 °C.

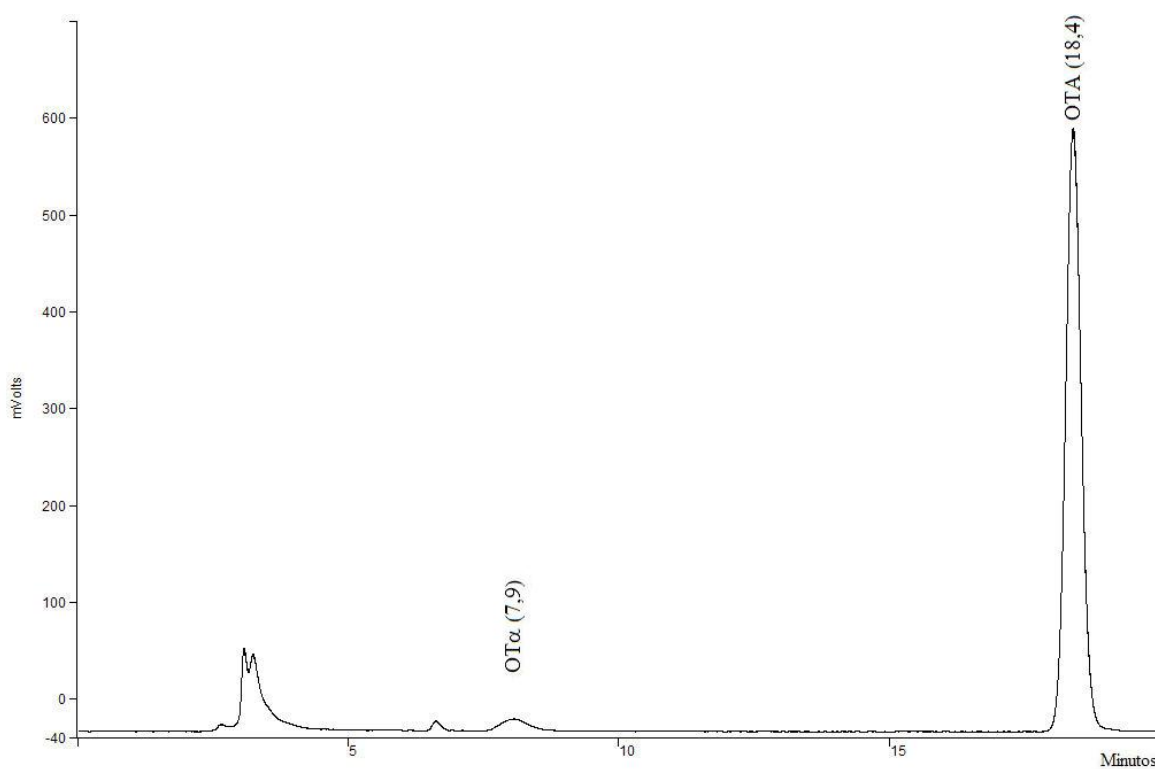


Figura A-3.36 Cromatograma de HPLC obtido no ensaio de degradação realizado com a fracção eluída t35,36 a pH 7,5 e 37 °C.

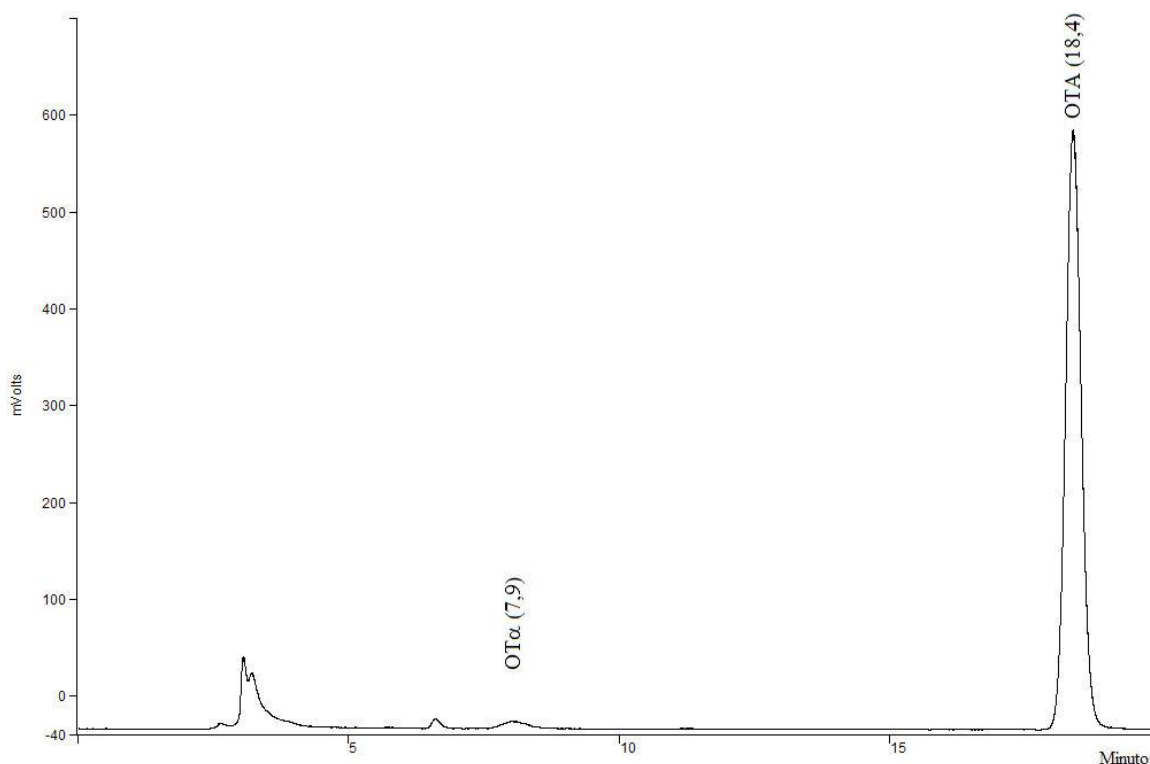


Figura A-3.37 Cromatograma de HPLC obtido no ensaio de degradação realizado com a fracção eluída t37,38 a pH 7,5 e 37 °C.

Tabela A-3.21 Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados com o extracto enzimático obtido a partir do GT-OTA na presença de 10 mM de EDTA e 1 mM de PMSF. Ensaio realizado a pH 7,5 e incubados a 37 °C

Extracto enzimático	(μg/mL)	Tempo (horas)					
		0	3	6	9	15	25
Branco	OTA	1,033	0,962	0,978	0,978	1,077	1,068
	OT α	nd	nd	nd	nd	nd	nd
GT-OTA	OTA	0,975	0,492	0,300	0,146	0,070	0,030
	OT α	nd	0,593	0,827	1,002	1,085	1,105
GT-OTA + 10 mM EDTA	OTA	0,904	0,970	0,952	1,005	0,990	0,983
	OT α	nd	0,008	0,009	0,011	0,010	0,011
GT-OTA + 1 mM de PMSF	OTA	0,999	0,572	0,400	0,230	0,106	0,075
	OT α	nd	0,488	0,718	0,883	1,007	1,070

notas: nd - não detectado

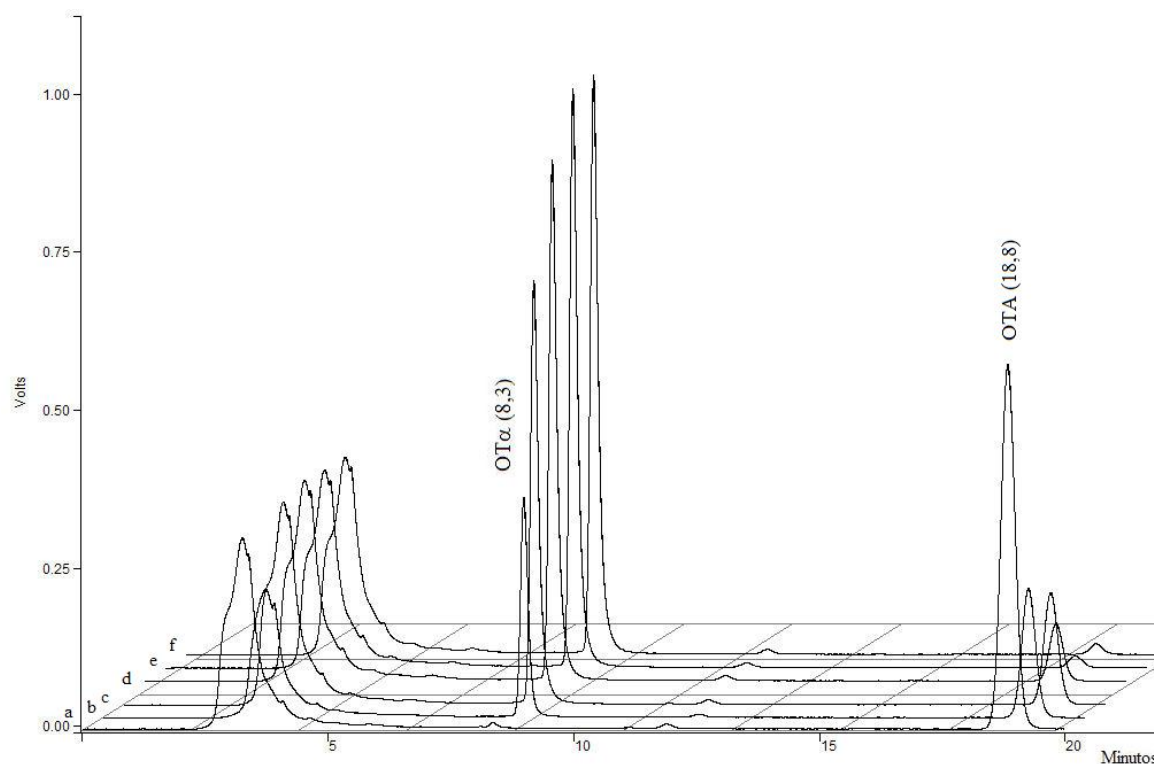


Figura A-3.38 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com extracto de GT-OTA a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

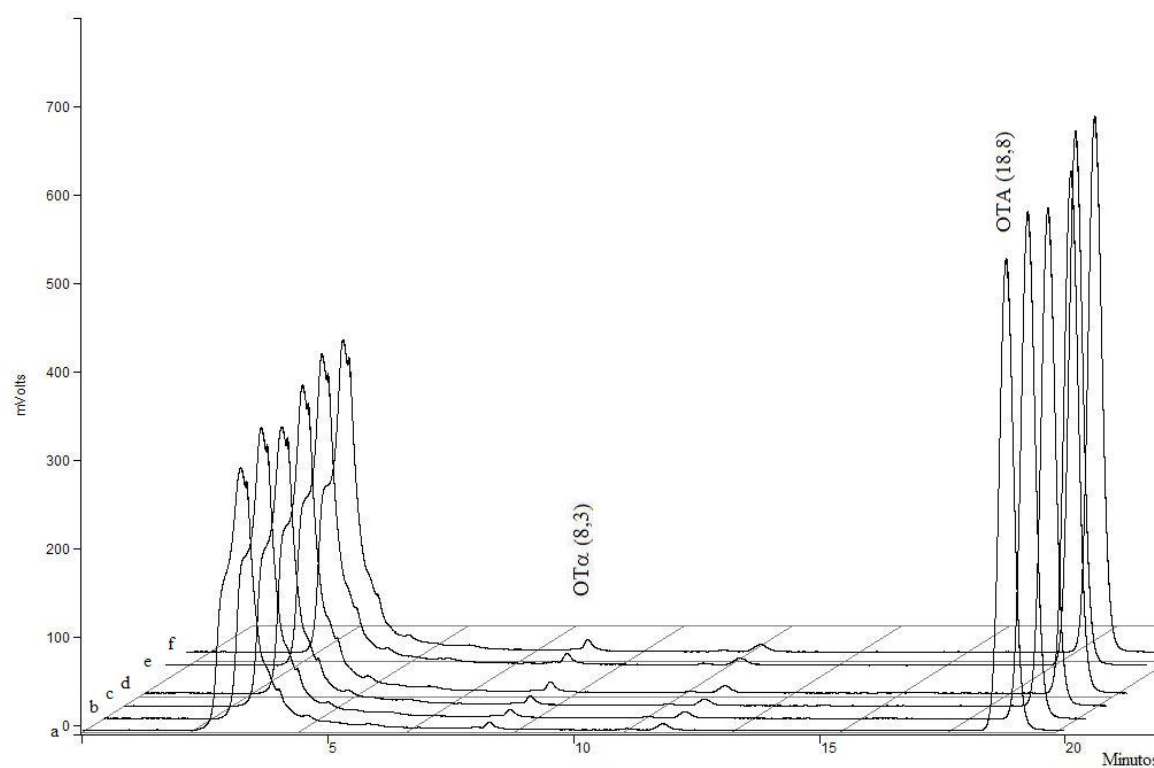


Figura A-3.39 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com extracto de GT-OTA e 10 mM de EDTA a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

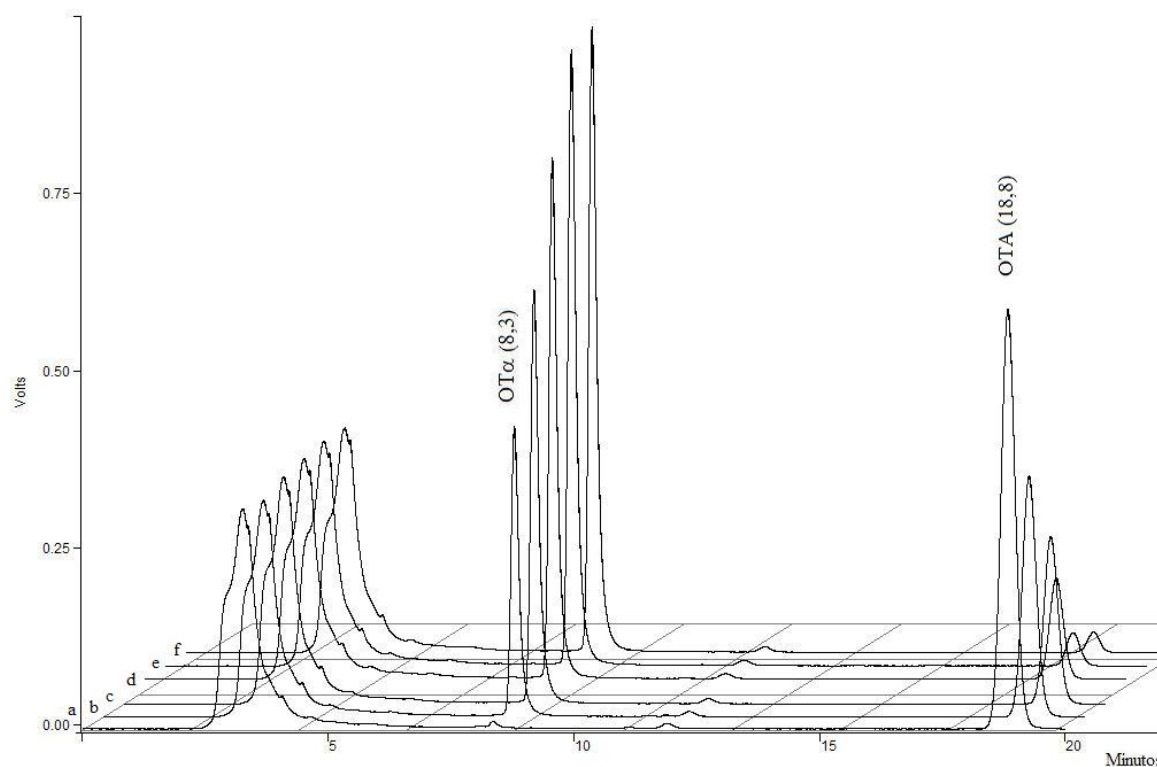


Figura A-3.40 Cromatogramas de HPLC obtidos para o ensaio de degradação realizado com o extracto de GT-OTA e 1 mM de PMSF a pH 7,5 e 37 °C. Amostras recolhidas às a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 15 e f) 25 horas.

Tabela A-3.22 Concentrações de OTA e de OTα detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados com o extracto enzimático obtido a partir do GT-OTA para a determinação de V_0

Ensaio de reacção com	(μg/mL)	Tempo (min)				
		0	15	30	45	60
10 μg/mL	OTA	9,65	9,30	9,20	9,20	9,15
	OTα	nd	0,06	0,13	0,21	0,29
100 μg/mL	OTA	95,70	92,75	98,05	90,00	90,00
	OTα	nd	0,60	1,26	1,54	2,25
300 μg/mL	OTA	287,10	279,30	276,55	278,45	281,95
	OTα	nd	0,92	1,90	2,94	4,21
600 μg/mL	OTA	569,25	561,70	560,00	554,35	564,20
	OTα	nd	1,10	2,30	3,71	4,97
1300 μg/mL	OTA	1222,80	1212,10	1205,05	1221,85	1235,55
	OTα	nd	1,22	2,65	4,18	5,83

notas: nd - não detectado

Tabela A-3.23 Concentrações de OTA e de OT α detectadas ao longo do tempo nos ensaios de reacção realizados com a CPA para a determinação de V_0

Ensaio de reacção com	$(\mu\text{g/mL})$	Tempo (min)				
		0	15	30	45	60
10 $\mu\text{g/mL}$	OTA	9,8	9,65	9,75	9,50	9,55
	OT α	nd	0,005	0,014	0,019	0,021
100 $\mu\text{g/mL}$	OTA	96,0	96,45	97,00	95,30	95,15
	OT α	nd	0,040	0,069	0,099	0,122
300 $\mu\text{g/mL}$	OTA	294,2	293,05	286,65	285,60	280,20
	OT α	nd	0,091	0,166	0,238	0,303
600 $\mu\text{g/mL}$	OTA	569,0	569,50	574,05	556,40	563,10
	OT α	nd	0,124	0,237	0,338	0,422
1300 $\mu\text{g/mL}$	OTA	1224,2	1225,00	1218,35	1215,45	1222,65
	OT α	nd	0,188	0,322	0,450	0,552

notas: nd - não detectado

Tabela A-3.24 Dados utilizados na elaboração das representações de Michaelis-Menten, de Lineweaver-Burk e de Hanes-Woolf para calcular os parâmetros cinéticos do extracto enzimático de GT-OTA

Ensaio de reacção com	Michaelis-Menten		Lineweaver-Burk		Hanes-Woolf	
	V_0 ($\mu\text{M}/\text{min}$)	OTA (μM)	$1/V_0$ ($\text{min}/\mu\text{M}$)	$1/\text{OTA}$ (μM^{-1})	OTA/ V_0 (min)	OTA (μM)
10 $\mu\text{g/mL}$	0,0187	23,90	53,5042	0,0418	1278,6	23,90
100 $\mu\text{g/mL}$	0,1414	237,00	7,0725	0,0042	1676,2	237,00
300 $\mu\text{g/mL}$	0,2710	711,00	3,6902	0,0014	2623,7	711,00
600 $\mu\text{g/mL}$	0,3262	1409,73	3,0653	0,0007	4321,3	1409,73
1300 $\mu\text{g/mL}$	0,3795	3028,23	2,6350	0,0003	7979,3	3028,23

Tabela A-3.25 Dados utilizados na elaboração das representações de Michaelis-Menten, de Lineweaver-Burk e de Hanes-Woolf para calcular os parâmetros cinéticos da CPA

Ensaio de reacção com	Michaelis-Menten		Lineweaver-Burk		Hanes-Woolf	
	V_0 ($\mu\text{M}/\text{min}$)	OTA (μM)	$1/V_0$ ($\text{min}/\mu\text{M}$)	$1/\text{OTA}$ (μM^{-1})	OTA/ V_0 (min)	OTA (μM)
10 $\mu\text{g/mL}$	0,001460	24,27	685,1	0,0412	16627,0	24,27
100 $\mu\text{g/mL}$	0,007883	237,74	126,9	0,0042	30159,0	237,74
300 $\mu\text{g/mL}$	0,019586	728,58	51,1	0,0014	37198,8	728,58
600 $\mu\text{g/mL}$	0,027478	1409,11	36,4	0,0007	51282,1	1409,11
1300 $\mu\text{g/mL}$	0,035473	3031,70	28,2	0,0003	85464,4	3031,70

Tabela A-3.26 Dados utilizados para determinar as concentrações de OTA e OT α nos mostos

	1ª réplica					
	Controlo (t ₀)	Controlo (t ₁₆)	Lallzyme HC	Lallzyme CB	Prolyve PAC	Extracto de <i>A. niger</i>
Peso do líquido (g)	80,6	81,16	84,36	84,84	88,35	86,86
Volume do líquido (mL)	76,0	77,0	80,0	81,0	84,0	82,0
Peso dos sólidos (g)	22,16	21,24	18,35	17,27	13,96	15,84
Volume dos sólidos (mL)	154,0	153,0	151,0	150,0	150,0	151,0

Tabela A-3.27 Dados utilizados para determinar as concentrações de OTA e OT α nos mostos

	2ª réplica					
	Controlo (t ₀)	Controlo (t ₁₆)	Lallzyme HC	Lallzyme CB	Prolyve PAC	Extracto de <i>A. niger</i>
Peso do líquido (g)	89,07	83,76	86,89	88,22	88,91	88,54
Volume do líquido (mL)	84,0	79,0	81,0	82,0	84,0	83,0
Peso dos sólidos (g)	16,55	16,63	16,13	14,26	13,11	14,2
Volume dos sólidos (mL)	151,0	150,0	150,0	148,0	150,0	148,0

Tabela A-3.28 Concentração de OTA ($\mu\text{g/Kg}$) detectada nas diferentes fracções dos mostos após maceração com os enzimas

		OTA ($\mu\text{g/Kg}$)					
		Controlo (t ₀)	Controlo (t ₁₆)	Lallzyme HC	Lallzyme CB	Prolyve PAC	Extracto de <i>A. niger</i>
1ª réplica	Líquido	15,629	23,259	14,201	12,640	28,025	21,032
	Sólidos	297,695	241,223	269,157	313,178	405,025	303,095
2ª réplica	Líquido	15,334	15,576	16,182	19,578	27,715	28,809
	Sólidos	272,760	331,685	342,856	384,660	390,839	361,420
Média	Líquido	15,482	19,417	15,191	16,109	27,870	24,920
	Sólidos	285,228	286,454	306,006	348,919	397,932	332,257
Desvio padrão (sd)	Líquido	0,208	5,433	1,401	4,906	0,219	5,499
	Sólidos	17,632	63,966	52,113	50,545	10,031	41,242

Anexo ao Capítulo IV

Tabela A-4.1 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com DMSO a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias							TCR (cm/dia)	R ²
		0	1	2	3	4	5	6		
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,9	2,55	4,1	5,8	7,8	8,5	1,71	0,9997
	II	0	0,9	2,6	4,1	5,9	7,9	8,5	1,73	0,9989
	III	0	0,9	2,6	4,1	5,8	7,7	8,5	1,68	0,9994
	Média	0	0,9	2,6	4,1	5,8	7,8	8,5	1,71	0,9994
	SD	0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,1	3,0	5,5	7,5	8,5	8,5	2,17	0,9973
	II	0	1,1	3,0	5,5	7,6	8,5	8,5	2,20	0,9975
	III	0	1,1	3,0	5,5	7,6	8,5	8,5	2,20	0,9975
	Média	0	1,1	3,0	5,5	7,6	8,5	8,5	2,19	0,9975
	SD	0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,7	2,5	4,8	6,6	8,0	8,5	2,00	0,9975
	II	0	0,8	2,5	4,8	6,6	8,0	8,5	1,97	0,9968
	III	0	0,7	2,4	4,7	6,5	8,0	8,5	1,97	0,9968
	Média	0	0,7	2,5	4,8	6,6	8,0	8,5	1,98	0,9970
	SD	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,02	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,7	1,4	2,7	4,0	5,7	7,1	1,32	0,9874
	II	0	0,6	1,4	2,7	3,9	5,6	7,0	1,31	0,9899
	III	0	0,6	1,4	2,7	4,0	5,7	7,1	1,33	0,9901
	Média	0	0,6	1,4	2,7	4,0	5,7	7,1	1,32	0,9892
	SD	0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,01	

Tabela A-4.2 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto **4a** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias							TCR (cm/dia)	R ²
		0	1	2	3	4	5	6		
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,7	2,1	3,4	4,7	5,6	6,8	1,21	0,9997
	II	0	0,8	2,2	3,5	4,7	5,7	6,9	1,21	0,9988
	III	0	0,8	2,2	3,6	4,8	5,7	6,9	1,21	0,9987
	Média	0	0,8	2,2	3,5	4,7	5,7	6,9	1,21	0,9992
	SD	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,002	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,3	3,2	5,4	7,8	8,5	8,5	2,17	0,9973
	II	0	1,4	3,2	5,5	7,9	8,5	8,5	2,18	0,9959
	III	0	1,3	3,2	5,5	7,8	8,5	8,5	2,18	0,9980
	Média	0	1,3	3,2	5,5	7,8	8,5	8,5	2,18	0,9972
	SD	0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,01	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,7	1,9	3,5	4,7	6,0	7,1	1,30	0,9966
	II	0	0,8	2,0	3,4	4,8	6,0	7,1	1,28	0,9987
	III	0	0,8	2,0	3,5	4,7	6,1	7,1	1,29	0,9979
	Média	0	0,8	2,0	3,5	4,7	6,0	7,1	1,29	0,9983
	SD	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,01	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,8	1,6	2,8	4,2	5,3	6,9	1,23	0,9923
	II	0	0,8	1,6	2,8	4,3	5,4	7,0	1,25	0,9919
	III	0	0,8	1,6	2,9	4,4	5,5	7,1	1,28	0,9929
	Média	0	0,8	1,6	2,8	4,3	5,4	7,0	1,25	0,9924
	SD	0	0,8	1,6	2,8	4,2	5,3	6,9	0,02	

Tabela A-4.3 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto **5** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,75	2,4	4,2	6,1	7,5	8,5	1,79	0,9990
	II	0	0,8	2,4	4,3	6,3	7,7	8,5	1,84	0,9975
	III	0	0,9	2,5	4,4	6,3	7,7	8,5	1,81	0,9984
	Média	0	0,8	2,4	4,3	6,2	7,6	8,5	1,81	0,9984
	SD	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,03	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,4	3,3	5,5	7,8	8,5	8,5	2,14	0,9982
	II	0	1,4	3,3	5,6	7,8	8,5	8,5	2,15	0,9985
	III	0	1,4	3,3	5,5	7,8	8,5	8,5	2,14	0,9982
	Média	0	1,4	3,3	5,5	7,8	8,5	8,5	2,14	0,9983
	SD	0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,01	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,7	2,4	4,4	6,6	7,8	8,5	1,97	0,9968
	II	0	0,9	2,4	4,5	6,7	7,8	8,5	1,95	0,9929
	III	0	0,8	2,3	4,4	6,5	7,8	8,5	1,92	0,9942
	Média	0	0,8	2,4	4,4	6,6	7,8	8,5	1,95	0,9949
	SD	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,03	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,75	1,5	2,8	4,3	5,2	6,9	1,24	0,9903
	II	0	0,8	1,6	2,9	4,3	5,4	7,0	1,25	0,9932
	III	0	0,8	1,6	2,9	4,4	5,5	7,1	1,28	0,9929
	Média	0	0,8	1,6	2,9	4,3	5,4	7,0	1,26	0,9923
	SD	0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,02	

Tabela A-4.4 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto **6** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,9	2,5	4,3	6,1	7,5	8,5	1,74	0,9992
	II	0	0,9	2,5	4,6	6,3	7,8	8,5	1,83	0,9974
	III	0	0,9	2,6	4,5	6,3	7,7	8,5	1,81	0,9996
	Média	0	0,9	2,5	4,5	6,2	7,7	8,5	1,79	0,9990
	SD	0	0,0	0,1	0,2	0,1	0,2	0,0	0,05	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,3	3,4	5,4	7,8	8,5	8,5	2,15	0,9985
	II	0	1,3	3,3	5,5	7,8	8,5	8,5	2,17	0,9990
	III	0	1,4	3,4	5,6	7,8	8,5	8,5	2,14	0,9995
	Média	0	1,3	3,4	5,5	7,8	8,5	8,5	2,15	0,9992
	SD	0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,8	2,4	4,4	6,6	7,8	8,5	1,94	0,9951
	II	0	0,8	2,4	4,4	6,6	7,8	8,5	1,94	0,9951
	III	0	0,9	2,4	4,5	6,6	7,8	8,5	1,92	0,9942
	Média	0	0,8	2,4	4,4	6,6	7,8	8,5	1,93	0,9949
	SD	0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,01	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,8	1,6	2,8	4,3	5,4	7,0	1,25	0,9919
	II	0	0,8	1,6	2,8	4,3	5,4	7,0	1,25	0,9919
	III	0	0,8	1,6	2,9	4,3	5,5	7,0	1,26	0,9941
	Média	0	0,8	1,6	2,8	4,3	5,4	7,0	1,26	0,9928
	SD	0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,003	

Tabela A-4.5 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto **7** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,8	2,3	4,1	5,9	7,2	8,5	1,71	0,9982
	II	0	0,8	2,4	4,2	6,1	7,4	8,5	1,77	0,9985
	III	0	0,8	2,4	4,1	5,9	7,2	8,5	1,70	0,9993
	Média	0	0,8	2,4	4,1	6,0	7,3	8,5	1,73	0,9987
	SD	0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,04	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,3	3,2	5,4	7,7	8,5	8,5	2,14	0,9982
	II	0	1,4	3,3	5,5	7,7	8,5	8,5	2,11	0,9988
	III	0	1,3	3,3	5,5	7,7	8,5	8,5	2,14	0,9995
	Média	0	1,3	3,3	5,5	7,7	8,5	8,5	2,13	0,9989
	SD	0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,8	2,3	4,2	6,4	7,7	8,5	1,87	0,9930
	II	0	0,7	2,3	4,2	6,4	7,7	8,5	1,90	0,9950
	III	0	0,8	2,3	4,2	6,3	7,7	8,5	1,84	0,9946
	Média	0	0,8	2,3	4,2	6,4	7,7	8,5	1,87	0,9943
	SD	0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,03	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,8	1,6	2,8	4,3	5,4	6,9	1,24	0,9932
	II	0	0,75	1,6	2,8	4,3	5,4	6,9	1,25	0,9942
	III	0	0,8	1,6	2,9	4,4	5,5	7,1	1,28	0,9929
	Média	0	0,8	1,6	2,8	4,3	5,4	7,0	1,25	0,9934
	SD	0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,02	

Tabela A-4.6 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto **8** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,8	2,2	3,8	5,6	6,9	8,0	1,60	0,9969
	II	0	0,8	2,2	3,8	5,5	6,8	8,0	1,57	0,9981
	III	0	0,8	2,2	3,9	5,6	6,8	8,0	1,61	0,9979
	Média	0	0,8	2,2	3,8	5,6	6,8	8,0	1,59	0,9977
	SD	0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,1	2,9	5,1	7,3	8,5	8,5	2,08	0,9978
	II	0	1,5	3,4	5,6	7,6	8,5	8,5	2,05	0,9993
	III	0	1,4	3,3	5,4	7,6	8,5	8,5	2,07	0,9989
	Média	0	1,3	3,2	5,4	7,5	8,5	8,5	2,07	0,9989
	SD	0	0,2	0,3	0,3	0,2	0,0	0,0	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,7	2,4	4,3	6,5	7,8	8,5	1,93	0,9966
	II	0	0,7	2,2	4,2	6,4	7,7	8,5	1,91	0,9931
	III	0	0,7	2,2	4,2	6,3	7,8	8,5	1,88	0,9945
	Média	0	0,7	2,3	4,2	6,4	7,8	8,5	1,91	0,9950
	SD	0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,03	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,7	1,6	2,75	4,1	5,2	7,0	1,25	0,9901
	II	0	0,8	1,6	2,75	4,2	5,3	6,9	1,23	0,9915
	III	0	0,7	1,5	2,8	4,2	5,3	6,9	1,25	0,9932
	Média	0	0,7	1,6	2,8	4,2	5,3	6,9	1,24	0,9919
	SD	0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,01	

Tabela A-4.7 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto **9** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,8	2,4	4,1	5,8	7,1	8,4	1,67	0,9998
	II	0	0,8	2,3	4,0	5,7	7,0	8,4	1,64	0,9991
	III	0	0,8	2,3	4,0	5,7	7,0	8,4	1,64	0,9991
	Média	0	0,8	2,3	4,0	5,7	7,0	8,4	1,65	0,9994
	SD	0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,1	3,1	5,3	7,6	8,5	8,5	2,17	0,9990
	II	0	1,1	3,1	5,3	7,7	8,5	8,5	2,20	0,9983
	III	0	1,1	3,1	5,3	7,8	8,5	8,5	2,23	0,9975
	Média	0	1,1	3,1	5,3	7,7	8,5	8,5	2,20	0,9983
	SD	0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,03	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,7	2,3	4,2	6,4	8,0	8,5	1,90	0,9950
	II	0	0,7	2,3	4,3	6,4	7,9	8,5	1,91	0,9963
	III	0	0,7	2,3	4,3	6,4	7,9	8,5	1,91	0,9963
	Média	0	0,7	2,3	4,3	6,4	7,9	8,5	1,91	0,9960
	SD	0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,01	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,6	1,5	2,7	4,2	5,4	6,9	1,28	0,9947
	II	0	0,7	1,6	2,8	4,3	5,5	7,0	1,28	0,9947
	III	0	0,7	1,6	2,8	4,3	5,5	7,0	1,28	0,9947
	Média	0	0,7	1,6	2,8	4,3	5,5	7,0	1,28	0,9947
	SD	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,003	

Tabela A-4.8 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto **10** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,8	2,3	4,0	5,7	6,9	8,0	1,64	0,9991
	II	0	0,8	2,3	3,9	5,5	6,8	8,0	1,57	0,9998
	III	0	0,8	2,4	3,9	5,6	6,8	8,0	1,59	0,9994
	Média	0	0,8	2,3	3,9	5,6	6,8	8,0	1,60	0,9997
	SD	0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,04	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,2	3,2	5,4	7,7	8,5	8,5	2,17	0,9990
	II	0	1,1	3,1	5,3	7,6	8,5	8,5	2,17	0,9990
	III	0	1,1	3,1	5,3	7,5	8,5	8,5	2,14	0,9995
	Média	0	1,1	3,1	5,3	7,6	8,5	8,5	2,16	0,9992
	SD	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,8	2,4	4,4	6,5	7,9	8,5	1,91	0,9963
	II	0	0,7	2,4	4,4	6,5	8,0	8,5	1,94	0,9978
	III	0	0,8	2,4	4,3	6,5	7,9	8,5	1,90	0,9950
	Média	0	0,8	2,4	4,4	6,5	7,9	8,5	1,92	0,9965
	SD	0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,02	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,7	1,5	2,8	4,3	5,4	6,9	1,26	0,9939
	II	0	0,7	1,6	2,8	4,4	5,4	7,0	1,27	0,9935
	III	0	0,7	1,6	2,8	4,3	5,4	7,0	1,27	0,9940
	Média	0	0,7	1,6	2,8	4,3	5,4	7,0	1,27	0,9939
	SD	0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,004	

Tabela A-4.9 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto **11** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,7	2,2	3,9	5,8	7,0	8,2	1,70	0,9972
	II	0	0,8	2,3	4,0	5,8	7,1	8,2	1,67	0,9984
	III	0	0,8	2,3	4,1	5,8	6,9	8,1	1,68	0,9987
	Média	0	0,8	2,3	4,0	5,8	7,0	8,2	1,68	0,9983
	SD	0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,1	3,0	5,3	7,6	8,5	8,5	2,18	0,9980
	II	0	1,0	3,1	5,3	7,7	8,5	8,5	2,23	0,9991
	III	0	1,0	3,1	5,3	7,7	8,5	8,5	2,23	0,9991
	Média	0	1,0	3,1	5,3	7,7	8,5	8,5	2,21	0,9989
	SD	0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,03	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,6	2,2	4,1	6,3	7,7	8,5	1,90	0,9950
	II	0	0,6	2,3	4,2	6,4	7,7	8,5	1,93	0,9966
	III	0	0,6	2,3	4,2	6,4	7,9	8,5	1,93	0,9966
	Média	0	0,6	2,3	4,2	6,4	7,8	8,5	1,92	0,9961
	SD	0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,02	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,65	1,5	2,8	4,3	5,4	6,9	1,27	0,9948
	II	0	0,6	1,5	2,75	4,2	5,4	6,9	1,28	0,9954
	III	0	0,6	1,5	2,8	4,3	5,4	7,0	1,29	0,9948
	Média	0	0,6	1,5	2,8	4,3	5,4	6,9	1,28	0,9951
	SD	0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,01	

Tabela A-4.10 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto **12** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,7	2,2	4,1	5,5	7,6	8,5	1,63	0,9968
	II	0	0,7	2,2	4,0	5,5	7,5	8,5	1,62	0,9986
	III	0	0,7	2,2	4,0	5,4	7,5	8,5	1,59	0,9979
	Média	0	0,7	2,2	4,0	5,5	7,5	8,5	1,61	0,9979
	SD	0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,1	2,9	5,4	7,4	8,5	8,5	2,14	0,9964
	II	0	1,0	2,9	5,4	7,5	8,5	8,5	2,20	0,9975
	III	0	1,1	2,9	5,4	7,5	8,5	8,5	2,17	0,9965
	Média	0	1,1	2,9	5,4	7,5	8,5	8,5	2,17	0,9969
	SD	0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,03	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,7	2,5	4,7	6,5	8,0	8,5	1,96	0,9983
	II	0	0,7	2,4	4,7	6,5	8,0	8,5	1,97	0,9968
	III	0	0,7	2,4	4,6	6,6	8,0	8,5	1,99	0,9976
	Média	0	0,7	2,4	4,7	6,5	8,0	8,5	1,97	0,9978
	SD	0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,02	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,5	1,4	2,7	3,9	5,5	6,9	1,30	0,9935
	II	0	0,6	1,4	2,7	3,9	5,6	7,1	1,32	0,9887
	III	0	0,6	1,4	2,8	4,0	5,65	7,1	1,33	0,9913
	Média	0	0,6	1,4	2,7	3,9	5,6	7,0	1,32	0,9913
	SD	0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,01	

Tabela A-4.11 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto **13** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,7	2,2	4,1	5,5	7,8	8,5	1,63	0,9968
	II	0	0,7	2,15	4,0	5,5	7,5	8,5	1,63	0,9978
	III	0	0,7	2,25	4,1	5,5	7,4	8,5	1,63	0,9975
	Média	0	0,7	2,2	4,1	5,5	7,6	8,5	1,63	0,9975
	SD	0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,2	0,0	0,003	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,0	2,8	5,4	7,4	8,5	8,5	2,18	0,9955
	II	0	1,0	2,85	5,4	7,4	8,5	8,5	2,18	0,9965
	III	0	1,0	2,8	5,4	7,4	8,5	8,5	2,18	0,9955
	Média	0	1,0	2,8	5,4	7,4	8,5	8,5	2,18	0,9958
	SD	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,003	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,7	2,5	4,7	6,5	8,0	8,5	1,96	0,9983
	II	0	0,7	2,5	4,7	6,5	8,0	8,5	1,96	0,9983
	III	0	0,7	2,5	4,7	6,5	8,0	8,5	1,96	0,9983
	Média	0	0,7	2,5	4,7	6,5	8,0	8,5	1,96	0,9983
	SD	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,003	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,6	0,9	2,7	3,9	5,5	6,9	1,33	0,9810
	II	0	0,6	0,9	2,7	3,8	5,4	6,8	1,30	0,9806
	III	0	0,6	0,9	2,7	3,9	5,5	6,9	1,33	0,9810
	Média	0	0,6	0,9	2,7	3,9	5,5	6,9	1,32	0,9809
	SD	0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,01	

Tabela A-4.12 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto **14** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,8	2,3	4,1	5,6	7,5	8,5	1,62	0,9986
	II	0	0,8	2,35	4,2	5,7	7,6	8,5	1,66	0,9984
	III	0	0,8	2,3	4,1	5,5	7,4	8,5	1,59	0,9979
	Média	0	0,8	2,3	4,1	5,6	7,5	8,5	1,62	0,9983
	SD	0	0,0	0,03	0,1	0,1	0,1	0,0	0,03	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,1	3,0	5,5	7,5	8,5	8,5	2,17	0,9973
	II	0	1,1	2,95	5,5	7,5	8,5	8,5	2,18	0,9965
	III	0	1,1	3,0	5,5	7,6	8,5	8,5	2,20	0,9975
	Média	0	1,1	3,0	5,5	7,5	8,5	8,5	2,18	0,9972
	SD	0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,8	2,5	4,7	6,6	8,0	8,5	1,96	0,9978
	II	0	0,75	2,5	4,8	6,6	8,0	8,5	1,99	0,9972
	III	0	0,75	2,45	4,7	6,5	8,0	8,5	1,95	0,9972
	Média	0	0,8	2,5	4,7	6,6	8,0	8,5	1,97	0,9975
	SD	0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,02	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,6	1,5	2,8	4,1	5,8	7,1	1,33	0,9930
	II	0	0,7	1,5	2,9	4,2	5,8	7,2	1,33	0,9926
	III	0	0,7	1,5	2,9	4,1	5,8	7,2	1,33	0,9911
	Média	0	0,7	1,5	2,9	4,1	5,8	7,2	1,33	0,9924
	SD	0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,002	

Tabela A-4.13 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto **15** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,7	2,2	4,0	5,4	7,4	8,5	1,59	0,9979
	II	0	0,7	2,2	4,0	5,4	7,4	8,5	1,59	0,9979
	III	0	0,7	2,25	4,0	5,5	7,4	8,5	1,62	0,9992
	Média	0	0,7	2,2	4,0	5,4	7,4	8,5	1,60	0,9984
	SD	0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,01	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,0	2,8	5,3	7,3	8,5	8,5	2,14	0,9964
	II	0	1,0	2,8	5,4	7,4	8,5	8,5	2,18	0,9955
	III	0	1,0	2,8	5,3	7,4	8,5	8,5	2,17	0,9965
	Média	0	1,0	2,8	5,3	7,4	8,5	8,5	2,16	0,9962
	SD	0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,8	2,4	4,7	6,5	8,0	8,5	1,94	0,9957
	II	0	0,8	2,45	4,65	6,5	8,0	8,5	1,93	0,9973
	III	0	0,8	2,4	4,6	6,45	8,0	8,5	1,92	0,9967
	Média	0	0,8	2,4	4,7	6,5	8,0	8,5	1,93	0,9966
	SD	0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,01	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,6	1,4	2,75	3,9	5,6	7,1	1,32	0,9892
	II	0	0,6	1,35	2,7	3,9	5,6	7,0	1,31	0,9893
	III	0	0,6	1,4	2,75	3,9	5,7	7,2	1,34	0,9876
	Média	0	0,6	1,4	2,7	3,9	5,6	7,1	1,33	0,9888
	SD	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,02	

Tabela A-4.14 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto **16** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,8	2,2	4,1	5,7	7,8	8,5	1,66	0,9970
	II	0	0,8	2,2	4,0	5,5	7,6	8,5	1,59	0,9979
	III	0	0,8	2,3	4,2	5,6	7,8	8,5	1,63	0,9968
	Média	0	0,8	2,2	4,1	5,6	7,7	8,5	1,63	0,9975
	SD	0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,04	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,1	2,9	5,4	7,4	8,5	8,5	2,14	0,9964
	II	0	1,0	2,9	5,3	7,4	8,5	8,5	2,16	0,9982
	III	0	1,0	2,9	5,4	7,4	8,5	8,5	2,17	0,9973
	Média	0	1,0	2,9	5,4	7,4	8,5	8,5	2,16	0,9974
	SD	0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,9	2,5	4,6	6,45	8,0	8,5	1,88	0,9975
	II	0	1,0	2,6	4,8	6,6	8,0	8,5	1,90	0,9967
	III	0	0,8	2,45	4,6	6,5	8,0	8,5	1,93	0,9976
	Média	0	0,9	2,5	4,7	6,5	8,0	8,5	1,90	0,9973
	SD	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,03	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,7	1,5	2,8	4,1	5,7	7,2	1,33	0,9904
	II	0	0,6	1,4	2,7	4,0	5,6	7,1	1,33	0,9904
	III	0	0,6	1,4	2,7	4,0	5,6	7,1	1,33	0,9904
	Média	0	0,6	1,4	2,7	4,0	5,6	7,1	1,33	0,9904
	SD	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,003	

Tabela A-4.15 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto **17** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,7	2,3	4,0	6,2	7,8	8,5	1,82	0,9941
	II	0	0,7	2,3	4,1	6,2	7,9	8,5	1,83	0,9963
	III	0	0,7	2,4	4,2	6,0	7,8	8,5	1,77	0,9998
	Média	0	0,7	2,3	4,1	6,1	7,8	8,5	1,81	0,9975
	SD	0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,03	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,2	3,1	5,6	7,7	8,5	8,5	2,20	0,9975
	II	0	1,1	3,1	5,7	7,7	8,5	8,5	2,24	0,9971
	III	0	1,0	3,0	5,6	7,7	8,5	8,5	2,27	0,9976
	Média	0	1,1	3,1	5,6	7,7	8,5	8,5	2,24	0,9975
	SD	0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,04	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,9	2,5	4,8	6,9	8,0	8,5	2,03	0,9950
	II	0	0,8	2,5	4,7	6,6	8,0	8,5	1,96	0,9978
	III	0	0,9	2,6	4,7	6,7	8,0	8,5	1,95	0,9982
	Média	0	0,9	2,5	4,7	6,7	8,0	8,5	1,98	0,9972
	SD	0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,0	0,0	0,04	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,6	0,9	2,7	4,0	5,6	7,0	1,35	0,9811
	II	0	0,7	1,1	2,7	4,1	5,6	7,0	1,33	0,9841
	III	0	0,6	1,3	2,7	4,0	5,6	7,1	1,33	0,9892
	Média	0	0,6	1,1	2,7	4,0	5,6	7,0	1,34	0,9855
	SD	0	0,1	0,2	0,0	0,1	0,0	0,1	0,01	

Tabela A-4.16 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto **18** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,8	2,3	4,2	5,7	7,8	8,5	1,66	0,9977
	II	0	0,8	2,3	4,2	5,7	7,8	8,5	1,66	0,9977
	III	0	0,8	2,3	4,1	5,6	7,4	8,5	1,62	0,9986
	Média	0	0,8	2,3	4,2	5,7	7,7	8,5	1,65	0,9980
	SD	0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2	0,0	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,2	3,0	5,5	7,5	8,5	8,5	2,14	0,9964
	II	0	1,1	3,0	5,5	7,5	8,5	8,5	2,17	0,9973
	III	0	1,1	3,0	5,5	7,6	8,5	8,5	2,20	0,9975
	Média	0	1,1	3,0	5,5	7,5	8,5	8,5	2,17	0,9971
	SD	0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,03	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,8	2,5	4,7	6,6	8,0	8,5	1,96	0,9978
	II	0	0,7	2,4	4,6	6,5	8,0	8,5	1,96	0,9978
	III	0	0,8	2,5	4,7	6,5	8,0	8,5	1,93	0,9977
	Média	0	0,8	2,5	4,7	6,5	8,0	8,5	1,95	0,9978
	SD	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,02	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,7	1,45	2,7	4,0	5,7	7,2	1,33	0,9868
	II	0	0,7	1,45	2,7	4,0	5,6	7,1	1,31	0,9884
	III	0	0,7	1,4	2,7	4,1	5,7	7,2	1,34	0,9879
	Média	0	0,7	1,4	2,7	4,0	5,7	7,2	1,32	0,9878
	SD	0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,02	

Tabela A-4.17 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto **19** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,7	2,2	4,1	5,6	7,7	8,5	1,66	0,9977
	II	0	0,6	2,2	4,1	5,7	7,6	8,5	1,72	0,9988
	III	0	0,7	2,2	4,1	5,5	7,4	8,5	1,63	0,9968
	Média	0	0,7	2,2	4,1	5,6	7,6	8,5	1,67	0,9979
	SD	0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0	0,05	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	0,9	2,8	5,2	7,2	8,5	8,5	2,13	0,9981
	II	0	0,9	2,85	5,2	7,2	8,5	8,5	2,13	0,9987
	III	0	0,9	2,9	5,3	7,3	8,5	8,5	2,16	0,9986
	Média	0	0,9	2,9	5,2	7,2	8,5	8,5	2,14	0,9985
	SD	0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,6	2,5	4,7	6,5	8,0	8,5	1,99	0,9986
	II	0	0,6	2,5	4,8	6,6	8,0	8,5	2,03	0,9979
	III	0	0,6	2,45	4,7	6,5	8,0	8,5	2,00	0,9982
	Média	0	0,6	2,5	4,7	6,5	8,0	8,5	2,01	0,9983
	SD	0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,02	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,5	1,35	2,6	3,85	5,5	6,9	1,31	0,9912
	II	0	0,5	1,3	2,7	3,9	5,5	6,8	1,29	0,9932
	III	0	0,5	1,3	2,6	3,9	5,5	6,9	1,31	0,9915
	Média	0	0,5	1,3	2,6	3,9	5,5	6,9	1,30	0,9921
	SD	0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,01	

Tabela A-4.18 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto **20** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,8	2,3	4,1	5,6	7,7	8,5	1,62	0,9986
	II	0	0,8	2,2	4,1	5,6	7,7	8,5	1,63	0,9968
	III	0	0,8	2,3	4,1	5,6	7,6	8,5	1,62	0,9986
	Média	0	0,8	2,3	4,1	5,6	7,7	8,5	1,62	0,9981
	SD	0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,01	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,1	3,1	5,6	7,6	8,5	8,5	2,20	0,9979
	II	0	1,2	3,1	5,7	7,7	8,5	8,5	2,21	0,9965
	III	0	1,2	3,1	5,7	7,7	8,5	8,5	2,21	0,9965
	Média	0	1,2	3,1	5,7	7,7	8,5	8,5	2,21	0,9970
	SD	0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,01	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,9	2,5	4,8	6,6	8,0	8,5	1,94	0,9957
	II	0	0,9	2,5	4,7	6,5	8,0	8,5	1,90	0,9967
	III	0	0,8	2,5	4,7	6,5	8,0	8,5	1,93	0,9977
	Média	0	0,9	2,5	4,7	6,5	8,0	8,5	1,92	0,9967
	SD	0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,02	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,6	1,3	2,8	4,0	5,7	7,1	1,34	0,9898
	II	0	0,6	1,4	2,8	4,0	5,7	7,2	1,35	0,9901
	III	0	0,6	1,4	2,8	4,0	5,7	7,2	1,35	0,9901
	Média	0	0,6	1,4	2,8	4,0	5,7	7,2	1,34	0,9901
	SD	0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,003	

Tabela A-4.19 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto **21** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,8	2,3	4,15	5,7	7,6	8,5	1,66	0,9984
	II	0	0,8	2,3	4,1	5,7	7,6	8,5	1,65	0,9989
	III	0	0,8	2,4	4,2	5,7	7,6	8,5	1,65	0,9989
	Média	0	0,8	2,3	4,2	5,7	7,6	8,5	1,65	0,9989
	SD	0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,003	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,2	3,1	5,5	7,6	8,5	8,5	2,16	0,9982
	II	0	1,2	3,1	5,5	7,5	8,5	8,5	2,13	0,9981
	III	0	1,2	3,1	5,5	7,6	8,5	8,5	2,16	0,9982
	Média	0	1,2	3,1	5,5	7,6	8,5	8,5	2,15	0,9982
	SD	0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,9	2,5	4,8	6,6	8,0	8,5	1,94	0,9957
	II	0	0,9	2,5	4,7	6,6	8,0	8,5	1,93	0,9966
	III	0	0,8	2,5	4,7	6,5	8,0	8,5	1,93	0,9977
	Média	0	0,9	2,5	4,7	6,6	8,0	8,5	1,93	0,9968
	SD	0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,01	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,6	1,5	2,8	4,0	5,7	7,1	1,32	0,9921
	II	0	0,7	1,5	2,8	4,0	5,7	7	1,29	0,9908
	III	0	0,6	1,45	2,7	4,0	5,6	7,1	1,32	0,9909
	Média	0	0,6	1,5	2,8	4,0	5,7	7,1	1,31	0,9914
	SD	0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,02	

Tabela A-4.20 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto **22** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,7	2,3	4,1	5,6	7,6	8,5	1,65	0,9989
	II	0	0,7	2,3	4,1	5,6	7,6	8,5	1,65	0,9989
	III	0	0,7	2,3	4,15	5,6	7,6	8,5	1,66	0,9981
	Média	0	0,7	2,3	4,1	5,6	7,6	8,5	1,65	0,9986
	SD	0	0,0	0,0	0,03	0,0	0,0	0,0	0,003	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,1	3,1	5,6	7,55	8,5	8,5	2,19	0,9977
	II	0	1,2	3,1	5,6	7,65	8,5	8,5	2,19	0,9975
	III	0	1,1	3,1	5,6	7,6	8,5	8,5	2,20	0,9979
	Média	0	1,1	3,1	5,6	7,6	8,5	8,5	2,19	0,9978
	SD	0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,01	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,9	2,5	4,8	6,6	8,0	8,5	1,94	0,9957
	II	0	0,9	2,5	4,7	6,6	8,0	8,5	1,93	0,9966
	III	0	0,8	2,4	4,7	6,5	8,0	8,5	1,94	0,9957
	Média	0	0,9	2,5	4,7	6,6	8,0	8,5	1,94	0,9961
	SD	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,01	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,6	1,4	2,7	4,0	5,6	7,1	1,33	0,9904
	II	0	0,6	1,4	2,7	4,0	5,7	7,1	1,33	0,9901
	III	0	0,6	1,4	2,8	4,1	5,8	7,2	1,36	0,9913
	Média	0	0,6	1,4	2,7	4,0	5,7	7,1	1,34	0,9907
	SD	0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,02	

Tabela A-4.21 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com o composto **23** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR).

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,8	2,2	4,1	5,6	7,7	8,5	1,63	0,9968
	II	0	0,8	2,3	4,2	5,6	7,7	8,5	1,63	0,9968
	III	0	0,8	2,3	4,2	5,7	7,7	8,5	1,66	0,9977
	Média	0	0,8	2,3	4,2	5,6	7,7	8,5	1,64	0,9972
	SD	0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,2	3,1	5,6	7,6	8,5	8,5	2,17	0,9973
	II	0	1,2	3,15	5,6	7,7	8,5	8,5	2,20	0,9983
	III	0	1,2	3,1	5,6	7,7	8,5	8,5	2,20	0,9975
	Média	0	1,2	3,1	5,6	7,7	8,5	8,5	2,19	0,9978
	SD	0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,9	2,5	4,8	6,6	8,0	8,5	1,94	0,9957
	II	0	0,9	2,5	4,8	6,6	8,0	8,5	1,94	0,9957
	III	0	0,8	2,5	4,7	6,6	8,0	8,5	1,96	0,9978
	Média	0	0,9	2,5	4,8	6,6	8,0	8,5	1,95	0,9965
	SD	0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,01	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,7	1,5	2,9	4,15	5,9	7,3	1,36	0,9905
	II	0	0,6	1,5	2,85	4,1	5,9	7,2	1,36	0,9920
	III	0	0,6	1,5	2,9	4,2	5,9	7,4	1,39	0,9926
	Média	0	0,6	1,5	2,9	4,2	5,9	7,3	1,37	0,9918
	SD	0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,02	

Tabela A-4.22 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com DMSO a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	1,0	2,7	4,9	7,3	8,5	8,5	2,11	0,9943
	II	0	1,1	2,75	5,0	7,2	8,5	8,5	2,06	0,9954
	III	0	1,0	2,8	5,0	7,3	8,5	8,5	2,11	0,9970
	Média	0	1,0	2,8	5,0	7,3	8,5	8,5	2,09	0,9957
	SD	0	0,06	0,05	0,06	0,06	0,00	0,00	0,03	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,4	3,4	5,8	8,0	8,5	8,5	2,22	0,9989
	II	0	1,5	3,45	5,9	8,0	8,5	8,5	2,20	0,9983
	III	0	1,4	3,45	5,8	8,0	8,5	8,5	2,22	0,9994
	Média	0	1,4	3,4	5,8	8,0	8,5	8,5	2,21	0,9989
	SD	0	0,06	0,03	0,06	0,00	0,00	0,00	0,01	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	1,1	2,8	4,9	7,2	8,5	8,5	2,04	0,9956
	II	0	1,1	2,7	5,0	7,3	8,5	8,5	2,09	0,9933
	III	0	1,0	2,7	4,9	7,1	8,5	8,5	2,05	0,9964
	Média	0	1,1	2,7	4,9	7,2	8,5	8,5	2,06	0,9953
	SD	0	0,06	0,06	0,06	0,10	0,00	0,00	0,03	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,7	1,7	3,0	4,6	6,3	7,9	1,47	0,9923
	II	0	0,8	1,7	3,1	4,7	6,3	7,7	1,43	0,9938
	III	0	0,7	1,8	3,1	4,8	6,4	7,8	1,46	0,9956
	Média	0	0,7	1,7	3,1	4,7	6,3	7,8	1,45	0,9942
	SD	0	0,06	0,06	0,06	0,10	0,06	0,10	0,02	

Tabela A-4.23 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com 50 μ M de **4a** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias							TCR (cm/dia)	R ²
		0	1	2	3	4	5	6		
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	1,0	2,2	3,5	4,7	6,1	7,3	1,27	0,9997
	II	0	1,1	2,25	3,6	4,8	6,1	7,4	1,26	0,9991
	III	0	1,0	2,2	3,5	4,8	6,2	7,4	1,29	0,9996
	Média	0	1,0	2,2	3,5	4,8	6,1	7,4	1,28	0,9996
	SD	0	0,06	0,03	0,06	0,06	0,06	0,06	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,2	3,2	5,5	7,7	8,5	8,5	2,18	0,9992
	II	0	1,3	3,25	5,5	7,7	8,5	8,5	2,15	0,9991
	III	0	1,2	3,25	5,5	7,8	8,5	8,5	2,21	0,9993
	Média	0	1,2	3,2	5,5	7,7	8,5	8,5	2,18	0,9992
	SD	0	0,06	0,03	0,00	0,06	0,00	0,00	0,03	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,7	1,6	2,6	3,8	4,8	6,5	1,14	0,9957
	II	0	0,8	1,6	2,5	3,7	4,9	6,5	1,13	0,9910
	III	0	0,8	1,7	2,7	4,0	5,2	6,4	1,14	0,9926
	Média	0	0,8	1,6	2,6	3,8	5,0	6,5	1,14	0,9933
	SD	0	0,06	0,06	0,10	0,15	0,21	0,06	0,003	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,7	1,65	2,9	4,4	5,8	7,2	1,33	0,9956
	II	0	0,8	1,65	2,9	4,4	5,8	7,2	1,31	0,9938
	III	0	0,7	1,7	3,0	4,4	5,9	7,3	1,34	0,9963
	Média	0	0,7	1,7	2,9	4,4	5,8	7,2	1,33	0,9954
	SD	0	0,06	0,03	0,06	0,00	0,06	0,06	0,02	

Tabela A-4.24 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com 50 μ M de **3a** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias							TCR (cm/dia)	R ²
		0	1	2	3	4	5	6		
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	1,0	2,7	4,9	7,2	8,5	8,5	2,08	0,9955
	II	0	1,1	2,75	5,0	7,4	8,5	8,5	2,12	0,9933
	III	0	1,0	2,8	5,1	7,3	8,5	8,5	2,12	0,9974
	Média	0	1,0	2,8	5,0	7,3	8,5	8,5	2,11	0,9957
	SD	0	0,06	0,05	0,10	0,10	0,00	0,00	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,4	3,45	5,8	8,0	8,5	8,5	2,22	0,9994
	II	0	1,5	3,4	5,85	8,0	8,5	8,5	2,20	0,9979
	III	0	1,4	3,4	5,8	8,0	8,5	8,5	2,22	0,9989
	Média	0	1,4	3,4	5,8	8,0	8,5	8,5	2,21	0,9988
	SD	0	0,06	0,03	0,03	0,00	0,00	0,00	0,01	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	1,1	2,6	4,7	7,0	8,5	8,5	1,98	0,9915
	II	0	1,1	2,6	4,7	6,9	8,5	8,5	1,95	0,9929
	III	0	1,0	2,6	4,7	6,9	8,5	8,5	1,98	0,9950
	Média	0	1,1	2,6	4,7	6,9	8,5	8,5	1,97	0,9932
	SD	0	0,06	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,02	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,7	1,7	3,0	4,5	6,0	7,6	1,40	0,9945
	II	0	0,8	1,7	3,0	4,5	6,0	7,7	1,40	0,9914
	III	0	0,7	1,7	3,0	4,5	6,2	7,7	1,43	0,9934
	Média	0	0,7	1,7	3,0	4,5	6,1	7,7	1,41	0,9933
	SD	0	0,06	0,00	0,00	0,00	0,12	0,06	0,02	

Tabela A-4.25 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com 50 µM de **2a** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias							TCR (cm/dia)	R ²
		0	1	2	3	4	5	6		
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	1,0	2,6	4,5	6,8	8,5	8,5	1,93	0,9934
	II	0	1,1	2,5	4,6	7,0	8,5	8,5	1,98	0,9870
	III	0	1,0	2,6	4,7	7,1	8,5	8,5	2,04	0,9923
	Média	0	1,0	2,6	4,6	7,0	8,5	8,5	1,98	0,9912
	SD	0	0,06	0,06	0,10	0,15	0,00	0,00	0,06	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,4	3,4	5,9	8,2	8,5	8,5	2,29	0,9982
	II	0	1,5	3,4	5,8	8,2	8,5	8,5	2,25	0,9970
	III	0	1,4	3,4	5,75	8,2	8,5	8,5	2,28	0,9979
	Média	0	1,4	3,4	5,8	8,2	8,5	8,5	2,27	0,9979
	SD	0	0,06	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	1,1	2,6	4,7	7,0	8,5	8,5	1,98	0,9915
	II	0	1,1	2,5	4,6	6,9	8,5	8,5	1,95	0,9888
	III	0	1,0	2,7	4,7	7,0	8,5	8,5	2,00	0,9955
	Média	0	1,1	2,6	4,7	7,0	8,5	8,5	1,98	0,9923
	SD	0	0,06	0,10	0,06	0,06	0,00	0,00	0,03	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,7	1,7	3,0	4,7	6,3	7,8	1,46	0,9937
	II	0	0,8	1,7	3,1	4,7	6,3	7,8	1,44	0,9933
	III	0	0,7	1,7	3,1	4,7	6,2	7,7	1,43	0,9958
	Média	0	0,7	1,7	3,1	4,7	6,3	7,8	1,44	0,9944
	SD	0	0,06	0,00	0,06	0,00	0,06	0,06	0,01	

Tabela A-4.26 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com 50 µM de **4b** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias							TCR (cm/dia)	R ²
		0	1	2	3	4	5	6		
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	1,0	2,7	4,8	7,1	8,5	8,5	2,04	0,9956
	II	0	1,1	2,7	4,8	7,1	8,5	8,5	2,01	0,9938
	III	0	1,0	2,7	4,8	7,1	8,5	8,5	2,04	0,9956
	Média	0	1,0	2,7	4,8	7,1	8,5	8,5	2,03	0,9950
	SD	0	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,4	3,3	5,6	7,9	8,5	8,5	2,18	0,9980
	II	0	1,5	3,3	5,6	7,9	8,5	8,5	2,15	0,9968
	III	0	1,4	3,3	5,6	7,9	8,5	8,5	2,18	0,9980
	Média	0	1,4	3,3	5,6	7,9	8,5	8,5	2,17	0,9976
	SD	0	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	1,1	2,6	4,8	7,1	8,5	8,5	2,02	0,9914
	II	0	1,1	2,6	4,8	7,0	8,5	8,5	1,99	0,9926
	III	0	1,0	2,6	4,7	6,9	8,5	8,5	1,98	0,9950
	Média	0	1,1	2,6	4,8	7,0	8,5	8,5	2,00	0,9931
	SD	0	0,06	0,00	0,06	0,10	0,00	0,00	0,02	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,7	1,7	3,0	4,6	6,1	7,7	1,42	0,9943
	II	0	0,8	1,7	3,1	4,6	6,1	7,6	1,39	0,9945
	III	0	0,7	1,7	3,1	4,6	6,2	7,6	1,41	0,9959
	Média	0	0,7	1,7	3,1	4,6	6,1	7,6	1,41	0,9950
	SD	0	0,06	0,00	0,06	0,00	0,06	0,06	0,02	

Tabela A-4.27 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com 50 μM de **3b** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias							TCR (cm/dia)	R ²
		0	1	2	3	4	5	6		
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	1,0	2,7	4,75	7,0	8,5	8,5	2,01	0,9962
	II	0	1,1	2,6	4,7	7,1	8,5	8,5	2,01	0,9899
	III	0	1,0	2,6	4,7	7,2	8,5	8,5	2,07	0,9906
	Média	0	1,0	2,6	4,7	7,1	8,5	8,5	2,03	0,9925
	SD	0	0,06	0,06	0,03	0,10	0,00	0,00	0,04	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,4	3,3	5,7	8,0	8,5	8,5	2,22	0,9977
	II	0	1,5	3,3	5,6	8,0	8,5	8,5	2,18	0,9959
	III	0	1,4	3,3	5,7	8,0	8,5	8,5	2,22	0,9977
	Média	0	1,4	3,3	5,7	8,0	8,5	8,5	2,21	0,9972
	SD	0	0,06	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	1,1	2,7	4,8	7,3	8,5	8,5	2,07	0,9906
	II	0	1,1	2,6	4,7	7,1	8,5	8,5	2,01	0,9899
	III	0	1,0	2,6	4,7	7,1	8,5	8,5	2,04	0,9923
	Média	0	1,1	2,6	4,7	7,2	8,5	8,5	2,04	0,9910
	SD	0	0,06	0,06	0,06	0,12	0,00	0,00	0,03	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,7	1,6	3,2	4,8	6,3	7,9	1,48	0,9947
	II	0	0,8	1,7	3,2	4,8	6,3	7,8	1,44	0,9947
	III	0	0,7	1,7	3,1	4,6	6,2	7,7	1,43	0,9954
	Média	0	0,7	1,7	3,2	4,7	6,3	7,8	1,45	0,9951
	SD	0	0,06	0,06	0,06	0,12	0,06	0,10	0,03	

Tabela A-4.28 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com 50 μM de **2b** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias							TCR (cm/dia)	R ²
		0	1	2	3	4	5	6		
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	1,0	2,8	5,0	7,5	8,5	8,5	2,17	0,9948
	II	0	1,1	2,7	4,85	7,4	8,5	8,5	2,11	0,9899
	III	0	1,0	2,6	4,8	7,4	8,5	8,5	2,14	0,9891
	Média	0	1,0	2,7	4,9	7,4	8,5	8,5	2,14	0,9915
	SD	0	0,06	0,10	0,10	0,06	0,00	0,00	0,03	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,4	3,35	5,7	8,0	8,5	8,5	2,22	0,9983
	II	0	1,5	3,35	5,7	8,0	8,5	8,5	2,19	0,9973
	III	0	1,4	3,3	5,65	8,0	8,5	8,5	2,22	0,9975
	Média	0	1,4	3,3	5,7	8,0	8,5	8,5	2,21	0,9977
	SD	0	0,06	0,03	0,03	0,00	0,00	0,00	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	1,1	2,6	4,8	7,2	8,5	8,5	2,05	0,9899
	II	0	1,1	2,7	4,8	7,2	8,5	8,5	2,04	0,9923
	III	0	1,0	2,6	4,8	7,2	8,5	8,5	2,08	0,9923
	Média	0	1,1	2,6	4,8	7,2	8,5	8,5	2,06	0,9915
	SD	0	0,06	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,7	1,7	3,1	4,7	6,3	7,7	1,44	0,9955
	II	0	0,8	1,7	3,0	4,6	6,1	7,7	1,41	0,9924
	III	0	0,7	1,7	3,0	4,6	6,1	7,6	1,41	0,9950
	Média	0	0,7	1,7	3,0	4,6	6,2	7,7	1,42	0,9945
	SD	0	0,06	0,00	0,06	0,06	0,12	0,06	0,02	

Tabela A-4.29 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com DMSO a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias							TCR (cm/dia)	R ²
		0	1	2	3	4	5	6		
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	1,0	2,8	5,1	7,3	8,5	8,5	2,12	0,9974
	II	0	1,1	2,85	5,15	7,2	8,5	8,5	2,06	0,9974
	III	0	1,0	2,8	5,2	7,3	8,5	8,5	2,13	0,9972
	Média	0	1,0	2,8	5,2	7,3	8,5	8,5	2,10	0,9974
	SD	0	0,06	0,03	0,05	0,06	0,00	0,00	0,04	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,4	3,4	5,8	8,0	8,5	8,5	2,22	0,9989
	II	0	1,5	3,5	5,9	8,0	8,5	8,5	2,19	0,9989
	III	0	1,4	3,45	5,9	8,0	8,5	8,5	2,23	0,9988
	Média	0	1,4	3,5	5,9	8,0	8,5	8,5	2,21	0,9989
	SD	0	0,06	0,05	0,06	0,00	0,00	0,00	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	1,1	2,7	4,9	7,2	8,5	8,5	2,05	0,9936
	II	0	1,1	2,75	4,9	7,3	8,5	8,5	2,08	0,9934
	III	0	1,0	2,8	5,0	7,1	8,5	8,5	2,05	0,9983
	Média	0	1,1	2,8	4,9	7,2	8,5	8,5	2,06	0,9956
	SD	0	0,06	0,05	0,06	0,10	0,00	0,00	0,01	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,7	1,7	3,2	4,6	6,3	7,9	1,46	0,9946
	II	0	0,8	1,8	3,3	4,7	6,3	7,7	1,41	0,9966
	III	0	0,7	1,7	3,4	4,8	6,4	7,8	1,46	0,9969
	Média	0	0,7	1,7	3,3	4,7	6,3	7,8	1,44	0,9964
	SD	0	0,06	0,06	0,10	0,10	0,06	0,10	0,03	

Tabela A-4.30 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com 100 µM de **4a** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias							TCR (cm/dia)	R ²
		0	1	2	3	4	5	6		
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,8	2,0	3,1	4,2	5,3	6,4	1,11	0,9995
	II	0	0,9	2,0	3,1	4,4	5,5	6,6	1,15	0,9982
	III	0	0,9	1,9	3,0	4,2	5,3	6,5	1,13	0,9983
	Média	0	0,9	2,0	3,1	4,3	5,4	6,5	1,13	0,9995
	SD	0	0,06	0,06	0,06	0,12	0,12	0,10	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,2	2,9	4,9	7,0	8,2	8,5	1,94	0,9978
	II	0	1,1	3,0	5,0	7,1	8,2	8,5	2,00	0,9995
	III	0	1,2	3,0	5,1	7,2	8,2	8,5	2,01	0,9987
	Média	0	1,2	3,0	5,0	7,1	8,2	8,5	1,98	0,9988
	SD	0	0,06	0,06	0,10	0,10	0,00	0,00	0,04	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,8	1,6	2,6	3,8	5,0	6,05	1,00	0,9921
	II	0	0,9	1,6	2,6	3,9	4,9	6,2	1,00	0,9823
	III	0	0,8	1,7	2,7	3,9	5,0	6,1	1,03	0,9957
	Média	0	0,8	1,6	2,6	3,9	5,0	6,1	1,01	0,9909
	SD	0	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,08	0,02	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,6	1,6	2,8	4,2	5,5	6,8	1,26	0,9977
	II	0	0,7	1,6	2,8	4,1	5,4	6,8	1,23	0,9958
	III	0	0,6	1,7	2,8	4,3	5,6	6,9	1,28	0,9975
	Média	0	0,6	1,6	2,8	4,2	5,5	6,8	1,26	0,9973
	SD	0	0,06	0,06	0,00	0,10	0,10	0,06	0,02	

Tabela A-4.31 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com 100 μ M de **3a** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias							TCR (cm/dia)	R ²
		0	1	2	3	4	5	6		
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	1,0	2,7	4,9	7,3	8,5	8,5	2,11	0,9943
	II	0	1,1	2,8	4,9	7,4	8,5	8,5	2,10	0,9928
	III	0	1,0	2,7	4,9	7,4	8,5	8,5	2,14	0,9930
	Média	0	1,0	2,7	4,9	7,4	8,5	8,5	2,12	0,9934
	SD	0	0,06	0,06	0,00	0,06	0,00	0,00	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,4	3,4	5,8	8,0	8,5	8,5	2,22	0,9989
	II	0	1,5	3,4	5,8	8,0	8,5	8,5	2,19	0,9980
	III	0	1,4	3,4	5,85	8,0	8,5	8,5	2,23	0,9986
	Média	0	1,4	3,4	5,8	8,0	8,5	8,5	2,21	0,9986
	SD	0	0,06	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	1,1	2,5	4,6	6,9	8,5	8,5	1,95	0,9888
	II	0	1,1	2,5	4,5	6,8	8,5	8,5	1,91	0,9888
	III	0	1,0	2,5	4,55	6,8	8,5	8,5	1,95	0,9923
	Média	0	1,1	2,5	4,6	6,8	8,5	8,5	1,94	0,9901
	SD	0	0,06	0,00	0,05	0,06	0,00	0,00	0,02	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,7	1,9	3,1	4,6	6,3	7,8	1,43	0,9952
	II	0	0,8	1,7	3,1	4,6	6,2	7,7	1,41	0,9936
	III	0	0,7	1,8	3,1	4,6	6,3	7,8	1,44	0,9950
	Média	0	0,7	1,8	3,1	4,6	6,3	7,8	1,43	0,9949
	SD	0	0,06	0,10	0,00	0,00	0,06	0,06	0,01	

Tabela A-4.32 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com 100 μ M de **2a** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias							TCR (cm/dia)	R ²
		0	1	2	3	4	5	6		
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	1,0	2,5	4,5	6,7	8,5	8,5	1,91	0,9931
	II	0	1,0	2,4	4,5	6,8	8,5	8,5	1,95	0,9888
	III	0	1,0	2,4	4,5	6,8	8,5	8,5	1,95	0,9888
	Média	0	1,0	2,4	4,5	6,8	8,5	8,5	1,94	0,9903
	SD	0	0,00	0,06	0,00	0,06	0,00	0,00	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,4	3,3	5,6	8,2	8,5	8,5	2,27	0,9952
	II	0	1,5	3,3	5,7	8,2	8,5	8,5	2,25	0,9947
	III	0	1,4	3,3	5,7	8,2	8,5	8,5	2,28	0,9962
	Média	0	1,4	3,3	5,7	8,2	8,5	8,5	2,27	0,9955
	SD	0	0,06	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	1,1	2,6	4,7	7,0	8,5	8,5	1,98	0,9915
	II	0	1,1	2,5	4,6	7,0	8,5	8,5	1,98	0,9870
	III	0	1,0	2,6	4,7	6,9	8,5	8,5	1,98	0,9950
	Média	0	1,1	2,6	4,7	7,0	8,5	8,5	1,98	0,9915
	SD	0	0,06	0,06	0,06	0,06	0,00	0,00	0,00	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,7	1,7	3,0	4,7	6,2	7,8	1,45	0,9939
	II	0	0,8	1,7	3,1	4,6	6,3	7,8	1,44	0,9926
	III	0	0,7	1,7	3,2	4,7	6,2	7,7	1,43	0,9967
	Média	0	0,7	1,7	3,1	4,7	6,2	7,8	1,44	0,9947
	SD	0	0,06	0,00	0,10	0,06	0,06	0,06	0,01	

Tabela A-4.33 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com 100 µM de **4b** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias							TCR (cm/dia)	R ²
		0	1	2	3	4	5	6		
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	1,0	2,6	4,8	7,0	8,5	8,5	2,02	0,9947
	II	0	1,1	2,7	4,8	7,1	8,5	8,5	2,01	0,9938
	III	0	1,0	2,5	4,6	6,9	8,5	8,5	1,98	0,9915
	Média	0	1,0	2,6	4,7	7,0	8,5	8,5	2,00	0,9935
	SD	0	0,06	0,10	0,12	0,10	0,00	0,00	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,2	3,2	5,6	7,9	8,5	8,5	2,25	0,9986
	II	0	1,2	3,2	5,5	7,9	8,5	8,5	2,24	0,9983
	III	0	1,3	3,2	5,5	7,8	8,5	8,5	2,18	0,9980
	Média	0	1,2	3,2	5,5	7,9	8,5	8,5	2,22	0,9984
	SD	0	0,06	0,00	0,06	0,06	0,00	0,00	0,04	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	1,1	2,6	4,7	7,0	8,5	8,5	1,98	0,9915
	II	0	1,1	2,6	4,7	7,0	8,5	8,5	1,98	0,9915
	III	0	1,0	2,6	4,7	6,9	8,5	8,5	1,98	0,9950
	Média	0	1,1	2,6	4,7	7,0	8,5	8,5	1,98	0,9928
	SD	0	0,06	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,7	1,7	3,1	4,7	6,2	7,7	1,43	0,9958
	II	0	0,8	1,65	3,0	4,5	6,0	7,5	1,37	0,9931
	III	0	0,7	1,7	3,0	4,6	6,1	7,6	1,41	0,9950
	Média	0	0,7	1,7	3,0	4,6	6,1	7,6	1,40	0,9948
	SD	0	0,06	0,03	0,06	0,10	0,10	0,10	0,03	

Tabela A-4.34 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com 100 µM de **3b** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias							TCR (cm/dia)	R ²
		0	1	2	3	4	5	6		
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	1,0	2,6	4,8	7,2	8,5	8,5	2,08	0,9923
	II	0	1,0	2,6	4,75	7,2	8,5	8,5	2,08	0,9915
	III	0	1,0	2,6	4,7	7,3	8,5	8,5	2,10	0,9888
	Média	0	1,0	2,6	4,8	7,2	8,5	8,5	2,09	0,9910
	SD	0	0,00	0,00	0,05	0,06	0,00	0,00	0,01	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,4	3,2	5,6	8,0	8,5	8,5	2,22	0,9956
	II	0	1,5	3,2	5,5	8,0	8,5	8,5	2,18	0,9930
	III	0	1,4	3,1	5,5	8,0	8,5	8,5	2,22	0,9928
	Média	0	1,4	3,2	5,5	8,0	8,5	8,5	2,21	0,9939
	SD	0	0,06	0,06	0,06	0,00	0,00	0,00	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	1,1	2,5	4,8	7,3	8,5	8,5	2,09	0,9852
	II	0	1,1	2,5	4,7	7,2	8,5	8,5	2,05	0,9852
	III	0	1,0	2,5	4,7	7,1	8,5	8,5	2,05	0,9899
	Média	0	1,1	2,5	4,7	7,2	8,5	8,5	2,06	0,9869
	SD	0	0,06	0,00	0,06	0,10	0,00	0,00	0,02	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,7	1,6	3,0	4,6	6,2	7,7	1,44	0,9933
	II	0	0,8	1,6	3,0	4,7	6,4	7,8	1,46	0,9901
	III	0	0,7	1,7	3,1	4,7	6,2	7,7	1,43	0,9958
	Média	0	0,7	1,6	3,0	4,7	6,3	7,7	1,44	0,9933
	SD	0	0,06	0,06	0,06	0,06	0,12	0,06	0,01	

Tabela A-4.35 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com 100 µM de **2b** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias							TCR (cm/dia)	R ²
		0	1	2	3	4	5	6		
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	1,0	2,5	4,6	7,0	8,5	8,5	2,01	0,9899
	II	0	1,1	2,6	4,8	7,4	8,5	8,5	2,11	0,9864
	III	0	1,0	2,6	4,8	7,5	8,5	8,5	2,17	0,9873
	Média	0	1,0	2,6	4,7	7,3	8,5	8,5	2,10	0,9879
	SD	0	0,06	0,06	0,12	0,26	0,00	0,00	0,08	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,4	3,3	5,6	8,0	8,5	8,5	2,21	0,9973
	II	0	1,5	3,3	5,6	8,0	8,5	8,5	2,18	0,9959
	III	0	1,4	3,3	5,6	8,0	8,5	8,5	2,21	0,9973
	Média	0	1,4	3,3	5,6	8,0	8,5	8,5	2,20	0,9968
	SD	0	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	1,1	2,6	4,8	7,4	8,5	8,5	2,11	0,9864
	II	0	1,1	2,6	4,75	7,3	8,5	8,5	2,08	0,9872
	III	0	1,0	2,6	4,7	7,2	8,5	8,5	2,07	0,9906
	Média	0	1,1	2,6	4,8	7,3	8,5	8,5	2,09	0,9881
	SD	0	0,06	0,00	0,05	0,10	0,00	0,00	0,02	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,7	1,8	3,2	4,8	6,4	7,9	1,47	0,9965
	II	0	0,8	1,7	3,1	4,7	6,3	7,8	1,44	0,9933
	III	0	0,7	1,7	3,1	4,6	6,1	7,7	1,42	0,9954
	Média	0	0,7	1,7	3,1	4,7	6,3	7,8	1,44	0,9953
	SD	0	0,06	0,06	0,06	0,10	0,15	0,10	0,02	

Tabela A-4.36 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com DMSO a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias							TCR (cm/dia)	R ²
		0	1	2	3	4	5	6		
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	1,0	2,7	5,1	7,4	8,5	8,5	2,16	0,9948
	II	0	1,1	2,75	5,2	7,5	8,5	8,5	2,17	0,9936
	III	0	1,0	2,8	5,2	7,6	8,5	8,5	2,22	0,9956
	Média	0	1,0	2,8	5,2	7,5	8,5	8,5	2,18	0,9947
	SD	0	0,06	0,05	0,06	0,10	0,00	0,00	0,03	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,4	3,4	5,9	8,1	8,5	8,5	2,26	0,9984
	II	0	1,5	3,45	5,9	8,1	8,5	8,5	2,23	0,9982
	III	0	1,4	3,45	6,0	8,1	8,5	8,5	2,27	0,9982
	Média	0	1,4	3,4	5,9	8,1	8,5	8,5	2,25	0,9984
	SD	0	0,06	0,03	0,06	0,00	0,00	0,00	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	1,1	2,8	4,9	7,2	8,5	8,5	2,04	0,9956
	II	0	1,0	2,7	4,9	7,2	8,5	8,5	2,08	0,9955
	III	0	1,1	2,7	4,8	7,1	8,5	8,5	2,01	0,9938
	Média	0	1,1	2,7	4,9	7,2	8,5	8,5	2,04	0,9950
	SD	0	0,06	0,06	0,06	0,06	0,00	0,00	0,04	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,7	1,7	3,2	4,8	6,4	7,8	1,46	0,9960
	II	0	0,8	1,7	3,1	4,7	6,4	7,8	1,45	0,9928
	III	0	0,7	1,8	3,2	4,7	6,3	7,8	1,44	0,9968
	Média	0	0,7	1,7	3,2	4,7	6,4	7,8	1,45	0,9954
	SD	0	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,00	0,01	

Tabela A-4.37 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com 200 µM de **4a** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias							TCR (cm/dia)	R ²
		0	1	2	3	4	5	6		
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,8	1,8	2,9	3,9	4,9	6,0	1,04	0,9996
	II	0	0,9	1,8	3,0	4,0	4,9	6,0	1,02	0,9973
	III	0	0,8	1,9	3,0	4,1	5,0	6,1	1,05	1,0000
	Média	0	0,8	1,8	3,0	4,0	4,9	6,0	1,04	0,9995
	SD	0	0,06	0,06	0,06	0,10	0,06	0,06	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,0	2,6	4,25	6,0	7,7	8,5	1,68	0,9996
	II	0	1,0	2,6	4,3	6,2	7,8	8,5	1,72	0,9985
	III	0	1,1	2,7	4,4	6,2	7,8	8,5	1,69	0,9993
	Média	0	1,0	2,6	4,3	6,1	7,8	8,5	1,70	0,9992
	SD	0	0,06	0,06	0,08	0,12	0,06	0,00	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,7	1,1	1,8	2,6	3,6	4,5	0,78	0,9799
	II	0	0,7	1,1	1,8	2,7	3,6	4,6	0,80	0,9727
	III	0	0,7	1,3	1,9	2,7	4,0	4,6	0,81	0,9945
	Média	0	0,7	1,2	1,8	2,7	3,7	4,6	0,80	0,9846
	SD	0	0,00	0,12	0,06	0,06	0,23	0,06	0,02	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,8	1,6	2,6	3,8	5,0	6,2	1,10	0,9949
	II	0	0,8	1,6	2,6	3,8	4,9	6,1	1,07	0,9959
	III	0	0,8	1,6	2,6	3,8	4,9	6,0	1,06	0,9967
	Média	0	0,8	1,6	2,6	3,8	4,9	6,1	1,08	0,9959
	SD	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,10	0,02	

Tabela A-4.38 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com 200 µM de **3a** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias							TCR (cm/dia)	R ²
		0	1	2	3	4	5	6		
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	1,0	2,7	4,8	7,1	8,5	8,5	2,04	0,9956
	II	0	1,1	2,8	4,9	7,3	8,5	8,5	2,07	0,9943
	III	0	1,0	2,7	4,8	7,2	8,5	8,5	2,07	0,9943
	Média	0	1,0	2,7	4,8	7,2	8,5	8,5	2,06	0,9947
	SD	0	0,06	0,06	0,06	0,10	0,00	0,00	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,4	3,4	5,7	8,0	8,5	8,5	2,21	0,9989
	II	0	1,5	3,4	5,8	8,0	8,5	8,5	2,19	0,9980
	III	0	1,4	3,3	5,7	8,0	8,5	8,5	2,22	0,9977
	Média	0	1,4	3,4	5,7	8,0	8,5	8,5	2,21	0,9983
	SD	0	0,06	0,06	0,06	0,00	0,00	0,00	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	1,0	2,5	4,6	6,8	8,5	8,5	1,95	0,9929
	II	0	1,0	2,5	4,5	6,7	8,5	8,5	1,91	0,9931
	III	0	1,0	2,4	4,4	6,6	8,5	8,5	1,88	0,9906
	Média	0	1,0	2,5	4,5	6,7	8,5	8,5	1,91	0,9923
	SD	0	0,00	0,06	0,10	0,10	0,00	0,00	0,04	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,7	1,8	3,2	4,8	6,3	7,8	1,45	0,9972
	II	0	0,8	1,7	3,1	4,7	6,3	7,8	1,44	0,9933
	III	0	0,7	1,7	3,0	4,6	6,1	7,7	1,42	0,9943
	Média	0	0,7	1,7	3,1	4,7	6,2	7,8	1,44	0,9951
	SD	0	0,06	0,06	0,10	0,10	0,12	0,06	0,01	

Tabela A-4.39 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com 200 µM de **2a** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	1,0	2,4	4,4	6,3	8,0	8,5	1,79	0,9946
	II	0	1,1	2,4	4,5	6,3	8,0	8,5	1,77	0,9922
	III	0	1,0	2,4	4,45	6,4	8,0	8,5	1,83	0,9938
	Média	0	1,0	2,4	4,5	6,3	8,0	8,5	1,80	0,9937
	SD	0	0,06	0,00	0,05	0,06	0,00	0,00	0,03	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,4	3,2	5,5	8,0	8,5	8,5	2,21	0,9948
	II	0	1,5	3,2	5,6	8,0	8,5	8,5	2,19	0,9939
	III	0	1,4	3,2	5,6	8,0	8,5	8,5	2,22	0,9956
	Média	0	1,4	3,2	5,6	8,0	8,5	8,5	2,21	0,9949
	SD	0	0,06	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	1,1	2,6	4,6	6,8	8,2	8,5	1,91	0,9931
	II	0	1,0	2,4	4,5	6,5	8,2	8,5	1,86	0,9930
	III	0	1,1	2,5	4,4	6,5	8,2	8,5	1,81	0,9923
	Média	0	1,1	2,5	4,5	6,6	8,2	8,5	1,86	0,9930
	SD	0	0,06	0,10	0,10	0,17	0,00	0,00	0,05	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,7	1,6	3,0	4,6	6,1	7,6	1,42	0,9941
	II	0	0,8	1,7	3,1	4,7	6,2	7,6	1,40	0,9946
	III	0	0,7	1,7	3,0	4,6	6,1	7,6	1,41	0,9950
	Média	0	0,7	1,7	3,0	4,6	6,1	7,6	1,41	0,9946
	SD	0	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,00	0,01	

Tabela A-4.40 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com 200 µM de **4b** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,8	2,2	4,1	6,4	8,1	8,5	1,87	0,9885
	II	0	0,9	2,2	4,1	6,2	8,1	8,5	1,78	0,9895
	III	0	0,8	2,1	4,0	6,3	8,0	8,5	1,84	0,9853
	Média	0	0,8	2,2	4,1	6,3	8,1	8,5	1,83	0,9879
	SD	0	0,06	0,06	0,06	0,10	0,06	0,00	0,05	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,1	3,0	5,3	7,5	8,5	8,5	2,15	0,9985
	II	0	1,2	3,0	5,3	7,6	8,5	8,5	2,15	0,9968
	III	0	1,2	3,0	5,3	7,5	8,5	8,5	2,12	0,9974
	Média	0	1,2	3,0	5,3	7,5	8,5	8,5	2,14	0,9976
	SD	0	0,06	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	1,0	2,5	4,8	7,1	8,5	8,5	2,06	0,9910
	II	0	1,0	2,5	4,7	7,0	8,5	8,5	2,02	0,9914
	III	0	1,0	2,4	4,6	6,9	8,5	8,5	1,99	0,9887
	Média	0	1,0	2,5	4,7	7,0	8,5	8,5	2,02	0,9904
	SD	0	0,00	0,06	0,10	0,10	0,00	0,00	0,04	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,6	1,5	2,8	4,2	5,6	7,1	1,32	0,9947
	II	0	0,6	1,5	3,0	4,5	5,9	7,4	1,39	0,9957
	III	0	0,7	1,5	2,8	4,2	5,6	7,0	1,29	0,9936
	Média	0	0,6	1,5	2,9	4,3	5,7	7,2	1,33	0,9949
	SD	0	0,06	0,00	0,12	0,17	0,17	0,21	0,05	

Tabela A-4.41 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com 200 µM de **3b** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	1,0	2,5	4,5	6,8	8,5	8,5	1,94	0,9915
	II	0	1,1	2,4	4,45	6,7	8,5	8,5	1,89	0,9866
	III	0	1,0	2,4	4,5	6,8	8,5	8,5	1,95	0,9888
	Média	0	1,0	2,4	4,5	6,8	8,5	8,5	1,93	0,9891
	SD	0	0,06	0,06	0,03	0,06	0,00	0,00	0,03	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,4	3,1	5,4	7,8	8,5	8,5	2,15	0,9942
	II	0	1,5	3,1	5,4	7,8	8,5	8,5	2,12	0,9921
	III	0	1,4	3,1	5,35	7,8	8,5	8,5	2,15	0,9937
	Média	0	1,4	3,1	5,4	7,8	8,5	8,5	2,14	0,9934
	SD	0	0,06	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	1,1	2,5	4,75	7,2	8,5	8,5	2,06	0,9861
	II	0	1,0	2,5	4,7	7,1	8,5	8,5	2,05	0,9899
	III	0	1,1	2,5	4,6	7,0	8,5	8,5	1,98	0,9870
	Média	0	1,1	2,5	4,7	7,1	8,5	8,5	2,03	0,9878
	SD	0	0,06	0,00	0,08	0,10	0,00	0,00	0,04	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,7	1,6	2,95	4,6	6,2	7,6	1,43	0,9931
	II	0	0,8	1,7	3,0	4,5	6,0	7,5	1,37	0,9936
	III	0	0,7	1,7	3,0	4,6	6,1	7,7	1,42	0,9943
	Média	0	0,7	1,7	3,0	4,6	6,1	7,6	1,41	0,9938
	SD	0	0,06	0,06	0,03	0,06	0,10	0,10	0,03	

Tabela A-4.42 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em YES suplementado com 200 µM de **2b** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,8	2,6	4,5	6,9	8,5	8,5	2,02	0,9952
	II	0	0,9	2,5	4,5	7,0	8,5	8,5	2,03	0,9902
	III	0	0,8	2,5	4,5	7,0	8,5	8,5	2,06	0,9924
	Média	0	0,8	2,5	4,5	7,0	8,5	8,5	2,04	0,9928
	SD	0	0,06	0,06	0,00	0,06	0,00	0,00	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,3	3,2	5,45	7,8	8,5	8,5	2,18	0,9977
	II	0	1,3	3,3	5,5	7,9	8,5	8,5	2,20	0,9983
	III	0	1,4	3,2	5,5	7,9	8,5	8,5	2,18	0,9959
	Média	0	1,3	3,2	5,5	7,9	8,5	8,5	2,19	0,9975
	SD	0	0,06	0,06	0,03	0,06	0,00	0,00	0,01	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	1,1	2,7	4,9	7,5	8,5	8,5	2,14	0,9891
	II	0	1,0	2,65	4,85	7,4	8,5	8,5	2,14	0,9911
	III	0	1,1	2,6	4,7	7,2	8,5	8,5	2,04	0,9880
	Média	0	1,1	2,7	4,8	7,4	8,5	8,5	2,11	0,9895
	SD	0	0,06	0,05	0,10	0,15	0,00	0,00	0,06	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,7	1,7	2,95	4,4	6,0	7,5	1,38	0,9940
	II	0	0,8	1,7	2,9	4,5	5,9	7,4	1,35	0,9929
	III	0	0,7	1,7	3,0	4,6	6,1	7,6	1,41	0,9950
	Média	0	0,7	1,7	3,0	4,5	6,0	7,5	1,38	0,9941
	SD	0	0,06	0,00	0,05	0,10	0,10	0,10	0,03	

Tabela A-4.43 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com DMSO a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,5	1,4	2,6	3,9	5,1	6,3	1,23	0,9998
	II	0	0,5	1,4	2,55	3,9	4,9	6,2	1,20	0,9985
	III	0	0,5	1,4	2,6	3,9	5,0	6,2	1,20	0,9994
	Média	0	0,5	1,4	2,6	3,9	5,0	6,2	1,21	0,9995
	SD	0	0,00	0,00	0,03	0,00	0,10	0,06	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	0,5	1,0	1,9	3,1	4,3	5,4	1,12	0,9978
	II	0	0,5	0,9	1,8	3,0	4,2	5,4	1,14	0,9972
	III	0	0,5	1,0	1,9	3,0	4,2	5,4	1,11	0,9968
	Média	0	0,5	1,0	1,9	3,0	4,2	5,4	1,12	0,9974
	SD	0	0,00	0,06	0,06	0,06	0,06	0,00	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,4	1,1	2,2	3,5	4,8	6,5	1,34	0,9938
	II	0	0,4	1,0	2,2	3,5	4,8	6,5	1,36	0,9955
	III	0	0,4	1,1	2,2	3,5	4,8	6,5	1,34	0,9938
	Média	0	0,4	1,1	2,2	3,5	4,8	6,5	1,35	0,9944
	SD	0	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,3	0,9	1,6	2,7	3,8	5,1	1,06	0,9901
	II	0	0,3	0,8	1,4	2,5	3,6	5,0	1,06	0,9829
	III	0	0,4	0,8	1,5	2,6	3,7	5,0	1,06	0,9901
	Média	0	0,3	0,8	1,5	2,6	3,7	5,0	1,06	0,9879
	SD	0	0,06	0,06	0,10	0,10	0,10	0,06	0,00	

Tabela A-4.44 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 50 µM de **4a** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,5	1,2	2,5	3,8	4,9	6,2	1,24	0,9992
	II	0	0,5	1,2	2,5	3,9	5,0	6,3	1,27	0,9988
	III	0	0,5	1,2	2,5	3,9	5,0	6,3	1,27	0,9988
	Média	0	0,5	1,2	2,5	3,9	5,0	6,3	1,26	0,9990
	SD	0	0,00	0,00	0,00	0,06	0,06	0,06	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	0,5	1,0	1,9	3,0	4,2	5,3	1,09	0,9977
	II	0	0,5	1,0	1,9	3,0	4,2	5,2	1,07	0,9980
	III	0	0,5	1,1	1,9	3,0	4,2	5,3	1,07	0,9956
	Média	0	0,5	1,0	1,9	3,0	4,2	5,3	1,08	0,9973
	SD	0	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,06	0,01	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,4	1,0	2,0	3,1	4,0	5,1	1,02	0,9992
	II	0	0,4	1,0	1,95	3,1	4,1	5,1	1,04	0,9993
	III	0	0,4	1,1	1,95	3,0	4,0	5,0	0,99	0,9990
	Média	0	0,4	1,0	2,0	3,1	4,0	5,1	1,01	0,9995
	SD	0	0,00	0,06	0,03	0,06	0,06	0,06	0,03	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,3	0,7	1,4	2,5	3,7	4,7	1,03	0,9934
	II	0	0,3	0,8	1,5	2,4	3,4	4,5	0,93	0,9932
	III	0	0,4	0,7	1,4	2,6	3,6	4,7	1,02	0,9946
	Média	0	0,3	0,7	1,4	2,5	3,6	4,6	0,99	0,9946
	SD	0	0,06	0,06	0,06	0,10	0,15	0,12	0,06	

Tabela A-4.45 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 50 μM de **3a** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias							TCR (cm/dia)	R ²
		0	1	2	3	4	5	6		
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,5	1,3	2,5	3,7	5,1	6,3	1,26	0,9992
	II	0	0,5	1,2	2,5	3,8	5,0	6,3	1,27	0,9998
	III	0	0,5	1,3	2,6	3,9	5,0	6,2	1,22	0,9989
	Média	0	0,5	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	1,25	1,0000
	SD	0	0,00	0,06	0,06	0,10	0,06	0,06	0,03	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	0,5	0,9	1,7	2,9	4,2	5,3	1,13	0,9945
	II	0	0,5	1,0	1,8	3,0	4,1	5,3	1,09	0,9957
	III	0	0,5	1,0	1,8	3,0	4,2	5,3	1,10	0,9957
	Média	0	0,5	1,0	1,8	3,0	4,2	5,3	1,11	0,9955
	SD	0	0,00	0,06	0,06	0,06	0,06	0,00	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,4	1,0	2,1	3,5	4,5	5,7	1,18	0,9980
	II	0	0,4	1,1	2,3	3,7	4,9	6,1	1,26	0,9992
	III	0	0,4	1,0	2,1	3,5	4,6	5,8	1,21	0,9987
	Média	0	0,4	1,0	2,2	3,6	4,7	5,9	1,22	0,9988
	SD	0	0,00	0,06	0,12	0,12	0,21	0,21	0,04	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,3	0,7	1,4	2,6	3,8	4,9	1,08	0,9928
	II	0	0,3	0,7	1,4	2,6	3,7	4,7	1,03	0,9945
	III	0	0,4	0,7	1,4	2,6	3,8	4,8	1,06	0,9933
	Média	0	0,3	0,7	1,4	2,6	3,8	4,8	1,06	0,9936
	SD	0	0,06	0,00	0,00	0,00	0,06	0,10	0,03	

Tabela A-4.46 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 50 μM de **2a** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias							TCR (cm/dia)	R ²
		0	1	2	3	4	5	6		
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,5	1,3	2,5	3,6	4,9	6,0	1,18	0,9994
	II	0	0,5	1,3	2,55	3,7	5,0	6,2	1,23	0,9998
	III	0	0,5	1,3	2,55	3,7	5,1	6,2	1,24	0,9990
	Média	0	0,5	1,3	2,5	3,7	5,0	6,1	1,21	0,9995
	SD	0	0,00	0,00	0,03	0,06	0,10	0,12	0,03	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	0,5	1,0	1,6	3,0	4,1	5,3	1,11	0,9888
	II	0	0,5	1,0	1,7	3,0	4,2	5,4	1,13	0,9920
	III	0	0,5	1,0	1,7	3,0	4,2	5,4	1,13	0,9920
	Média	0	0,5	1,0	1,7	3,0	4,2	5,4	1,12	0,9911
	SD	0	0,00	0,00	0,06	0,00	0,06	0,06	0,01	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,4	0,9	2,2	3,6	4,8	6,1	1,30	0,9995
	II	0	0,4	1,0	2,3	3,6	4,9	6,2	1,30	1,0000
	III	0	0,4	1,0	2,2	3,6	4,7	6,1	1,27	0,9988
	Média	0	0,4	1,0	2,2	3,6	4,8	6,1	1,29	0,9997
	SD	0	0,00	0,06	0,06	0,00	0,10	0,06	0,02	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,3	0,7	1,4	2,6	3,8	4,7	1,04	0,9930
	II	0	0,3	0,7	1,6	2,6	3,7	4,8	1,03	0,9982
	III	0	0,4	0,7	1,5	2,6	3,7	4,7	1,02	0,9973
	Média	0	0,3	0,7	1,5	2,6	3,7	4,7	1,03	0,9970
	SD	0	0,06	0,00	0,10	0,00	0,06	0,06	0,01	

Tabela A-4.47 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 50 µM de **4b** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,5	1,4	2,5	3,8	4,9	6	1,16	0,9991
	II	0	0,5	1,4	2,5	3,8	4,9	6,2	1,20	0,9992
	III	0	0,5	1,4	2,6	3,9	5,0	6,2	1,20	0,9994
	Média	0	0,5	1,4	2,5	3,8	4,9	6,1	1,19	0,9995
	SD	0	0,00	0,00	0,06	0,06	0,06	0,12	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	0,5	1,1	1,95	3,1	4,4	5,5	1,13	0,9956
	II	0	0,5	1,1	1,95	3,1	4,4	5,5	1,13	0,9956
	III	0	0,5	1,1	2,0	3,1	4,3	5,5	1,11	0,9968
	Média	0	0,5	1,1	2,0	3,1	4,4	5,5	1,12	0,9962
	SD	0	0,00	0,00	0,03	0,00	0,06	0,00	0,01	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,4	1,1	2,2	3,6	4,8	6,3	1,30	0,9976
	II	0	0,4	1,1	2,3	3,6	4,9	6,3	1,30	0,9993
	III	0	0,4	1,1	2,3	3,7	4,8	6,3	1,29	0,9981
	Média	0	0,4	1,1	2,3	3,6	4,8	6,3	1,30	0,9986
	SD	0	0,00	0,00	0,06	0,06	0,06	0,00	0,01	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,3	0,7	1,35	2,5	3,6	4,8	1,05	0,9908
	II	0	0,3	0,7	1,4	2,7	3,9	5,0	1,11	0,9927
	III	0	0,4	0,7	1,4	2,6	3,6	4,8	1,04	0,9934
	Média	0	0,3	0,7	1,4	2,6	3,7	4,9	1,07	0,9927
	SD	0	0,06	0,00	0,03	0,10	0,17	0,12	0,04	

Tabela A-4.48 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 50 µM de **3b** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,5	1,3	2,5	3,7	4,9	6,0	1,18	0,9997
	II	0	0,5	1,35	2,6	3,8	4,9	6,2	1,20	0,9994
	III	0	0,5	1,4	2,6	3,9	5,0	6,2	1,20	0,9994
	Média	0	0,5	1,4	2,6	3,8	4,9	6,1	1,19	0,9998
	SD	0	0,00	0,05	0,06	0,10	0,06	0,12	0,01	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	0,5	1,1	2,0	3,1	4,3	5,7	1,15	0,9935
	II	0	0,5	1,1	2,0	3,1	4,3	5,5	1,11	0,9968
	III	0	0,5	1,1	2,0	3,1	4,2	5,5	1,10	0,9960
	Média	0	0,5	1,1	2,0	3,1	4,3	5,6	1,12	0,9957
	SD	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,12	0,03	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,4	1,2	2,4	3,7	5,0	6,5	1,32	0,9984
	II	0	0,4	1,0	2,4	4,0	5,0	6,7	1,40	0,9955
	III	0	0,4	1,2	2,4	3,8	5,0	6,6	1,34	0,9976
	Média	0	0,4	1,1	2,4	3,8	5,0	6,6	1,35	0,9980
	SD	0	0,00	0,12	0,00	0,15	0,00	0,10	0,04	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,3	0,8	1,7	2,7	3,7	4,8	1,00	0,9988
	II	0	0,3	0,8	1,7	2,6	3,8	4,7	0,99	0,9973
	III	0	0,4	0,8	1,7	2,7	3,8	4,8	1,01	0,9989
	Média	0	0,3	0,8	1,7	2,7	3,8	4,8	1,00	0,9988
	SD	0	0,06	0,00	0,00	0,06	0,06	0,06	0,01	

Tabela A-4.49 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 50 μ M de **2b** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,5	1,4	2,6	3,8	5,0	6,3	1,22	0,9997
	II	0	0,5	1,4	2,5	3,8	5,0	6,3	1,23	0,9993
	III	0	0,5	1,4	2,5	3,8	5,0	6,3	1,23	0,9993
	Média	0	0,5	1,4	2,5	3,8	5,0	6,3	1,23	0,9995
	SD	0	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,01	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	0,5	1,1	1,9	3,1	4,2	5,3	1,07	0,9966
	II	0	0,5	1,0	1,9	3,1	4,3	5,3	1,10	0,9977
	III	0	0,5	1,1	1,9	3,1	4,2	5,3	1,07	0,9966
	Média	0	0,5	1,1	1,9	3,1	4,2	5,3	1,08	0,9972
	SD	0	0,00	0,06	0,00	0,00	0,06	0,00	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,4	1,1	2,2	3,5	4,9	6,2	1,29	0,9984
	II	0	0,4	1,1	2,3	3,5	4,8	6,3	1,29	0,9977
	III	0	0,4	1,1	2,2	3,5	4,9	6,2	1,29	0,9984
	Média	0	0,4	1,1	2,2	3,5	4,9	6,2	1,29	0,9985
	SD	0	0,00	0,00	0,06	0,00	0,06	0,06	0,00	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,3	0,8	1,6	2,7	3,8	4,9	1,04	0,9967
	II	0	0,3	0,8	1,5	2,6	3,7	4,7	1,00	0,9948
	III	0	0,4	0,8	1,5	2,7	3,7	4,7	1,00	0,9952
	Média	0	0,3	0,8	1,5	2,7	3,7	4,8	1,01	0,9959
	SD	0	0,06	0,00	0,06	0,06	0,06	0,12	0,02	

Tabela A-4.50 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com DMSO a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,5	1,4	2,6	3,9	4,9	6	1,15	0,9980
	II	0	0,5	1,4	2,55	3,9	4,9	6,3	1,22	0,9980
	III	0	0,5	1,4	2,6	3,9	4,9	6,1	1,17	0,9986
	Média	0	0,5	1,4	2,6	3,9	4,9	6,1	1,18	0,9987
	SD	0	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,15	0,03	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	0,5	1,0	2,0	3,0	4,2	5,3	1,08	0,9986
	II	0	0,5	1,0	1,95	3,0	4,2	5,2	1,07	0,9986
	III	0	0,5	1,0	2,0	3,0	4,2	5,3	1,08	0,9986
	Média	0	0,5	1,0	2,0	3,0	4,2	5,3	1,08	0,9987
	SD	0	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,06	0,01	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,4	1,1	2,2	3,5	4,8	6,2	1,28	0,9983
	II	0	0,4	1,1	2,3	3,6	4,9	6,2	1,28	0,9998
	III	0	0,4	1,0	2,3	3,6	4,9	6,4	1,34	0,9991
	Média	0	0,4	1,1	2,3	3,6	4,9	6,3	1,30	0,9993
	SD	0	0,00	0,06	0,06	0,06	0,06	0,12	0,03	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,3	0,7	1,7	2,8	3,9	4,9	1,06	0,9996
	II	0	0,3	0,7	1,6	2,7	3,8	4,9	1,06	0,9986
	III	0	0,3	0,7	1,7	2,8	3,9	5	1,08	0,9997
	Média	0	0,3	0,7	1,7	2,8	3,9	4,9	1,07	0,9995
	SD	0	0,00	0,00	0,06	0,06	0,06	0,06	0,01	

Tabela A-4.51 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 100 µM de **4a** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,5	1,2	2,5	3,8	5,0	6,3	1,27	0,9998
	II	0	0,5	1,2	2,5	3,9	5,1	6,4	1,30	0,9995
	III	0	0,5	1,2	2,5	3,9	5,0	6,3	1,27	0,9988
	Média	0	0,5	1,2	2,5	3,9	5,0	6,3	1,28	0,9995
	SD	0	0,00	0,00	0,00	0,06	0,06	0,06	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	0,5	1,0	1,9	3,1	4,3	5,5	1,14	0,9972
	II	0	0,5	1,0	1,8	3,0	4,1	5,3	1,09	0,9957
	III	0	0,5	1,0	1,8	3,0	4,1	5,2	1,07	0,9966
	Média	0	0,5	1,0	1,8	3,0	4,2	5,3	1,10	0,9966
	SD	0	0,00	0,00	0,06	0,06	0,12	0,15	0,04	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,4	0,8	1,8	2,9	4,0	5,1	1,08	0,9997
	II	0	0,4	0,9	1,8	2,9	3,9	4,9	1,01	0,9993
	III	0	0,4	1,0	1,8	2,9	3,9	4,8	0,97	0,9980
	Média	0	0,4	0,9	1,8	2,9	3,9	4,9	1,02	0,9992
	SD	0	0,00	0,10	0,00	0,00	0,06	0,15	0,06	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,3	0,7	1,2	2,3	3,4	4,5	0,98	0,9852
	II	0	0,3	0,7	1,3	2,5	3,6	4,7	1,03	0,9904
	III	0	0,3	0,7	1,3	2,3	3,4	4,7	1,01	0,9839
	Média	0	0,3	0,7	1,3	2,4	3,5	4,6	1,01	0,9874
	SD	0	0,00	0,00	0,06	0,12	0,12	0,12	0,03	

Tabela A-4.52 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 100 µM de **3a** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,5	1,2	2,4	3,7	5,0	6,1	1,24	0,9992
	II	0	0,5	1,2	2,5	3,9	5,1	6,3	1,28	0,9990
	III	0	0,5	1,2	2,5	3,7	4,9	6,2	1,24	0,9997
	Média	0	0,5	1,2	2,5	3,8	5,0	6,2	1,25	0,9998
	SD	0	0,00	0,00	0,06	0,12	0,10	0,10	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	0,5	1,1	1,9	3,0	4,2	5,4	1,09	0,9944
	II	0	0,5	1,0	1,9	3,0	4,1	5,3	1,08	0,9976
	III	0	0,5	1,0	1,9	3,0	4,1	5,3	1,08	0,9976
	Média	0	0,5	1,0	1,9	3,0	4,1	5,3	1,08	0,9967
	SD	0	0,00	0,06	0,00	0,00	0,06	0,06	0,01	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,4	1,0	2,0	3,2	4,3	5,5	1,13	0,9991
	II	0	0,4	1,0	2,0	3,3	4,4	5,5	1,14	0,9988
	III	0	0,4	1,0	2,0	3,2	4,4	5,5	1,14	0,9991
	Média	0	0,4	1,0	2,0	3,2	4,4	5,5	1,14	0,9992
	SD	0	0,00	0,00	0,00	0,06	0,06	0,00	0,01	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,3	0,7	1,5	2,7	3,8	4,9	1,07	0,9966
	II	0	0,3	0,7	1,5	2,7	3,8	4,9	1,07	0,9966
	III	0	0,3	0,7	1,5	2,7	3,9	4,9	1,08	0,9959
	Média	0	0,3	0,7	1,5	2,7	3,8	4,9	1,07	0,9965
	SD	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,01	

Tabela A-4.53 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 100 µM de **2a** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,5	1,2	2,5	3,7	4,9	6,0	1,20	0,9992
	II	0	0,5	1,3	2,45	3,7	5,1	6,2	1,25	0,9987
	III	0	0,5	1,2	2,45	3,7	5,0	6,2	1,26	0,9999
	Média	0	0,5	1,2	2,5	3,7	5,0	6,1	1,23	0,9996
	SD	0	0,00	0,06	0,03	0,00	0,10	0,12	0,03	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	0,5	1,0	1,9	3,1	4,3	5,4	1,12	0,9978
	II	0	0,5	1,0	1,9	3,1	4,2	5,4	1,11	0,9978
	III	0	0,5	0,9	1,9	3,1	4,2	5,4	1,13	0,9991
	Média	0	0,5	1,0	1,9	3,1	4,2	5,4	1,12	0,9984
	SD	0	0,00	0,06	0,00	0,00	0,06	0,00	0,01	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,4	1,1	2,2	3,6	4,9	6,3	1,31	0,9984
	II	0	0,4	1,0	2,2	3,5	4,8	6,1	1,28	0,9998
	III	0	0,4	1,0	2,1	3,6	4,7	6,0	1,26	0,9980
	Média	0	0,4	1,0	2,2	3,6	4,8	6,1	1,28	0,9992
	SD	0	0,00	0,06	0,06	0,06	0,10	0,15	0,03	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,3	0,8	1,5	2,7	3,8	4,9	1,05	0,9940
	II	0	0,3	0,8	1,4	2,5	3,6	4,6	0,98	0,9913
	III	0	0,3	0,8	1,45	2,6	3,6	4,7	1,00	0,9932
	Média	0	0,3	0,8	1,5	2,6	3,7	4,7	1,01	0,9930
	SD	0	0,00	0,00	0,05	0,10	0,12	0,15	0,04	

Tabela A-4.54 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 100 µM de **4b** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,5	1,4	2,5	3,9	4,9	6,1	1,18	0,9980
	II	0	0,5	1,4	2,6	3,8	5,0	6,1	1,18	0,9997
	III	0	0,5	1,4	2,6	3,9	4,9	6,2	1,19	0,9987
	Média	0	0,5	1,4	2,6	3,9	4,9	6,1	1,18	0,9993
	SD	0	0,00	0,00	0,06	0,06	0,06	0,06	0,01	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	0,5	1,1	2,0	3,2	4,3	5,5	1,11	0,9978
	II	0	0,5	1,1	1,9	3,2	4,3	5,4	1,10	0,9960
	III	0	0,5	1,1	2,0	3,1	4,2	5,4	1,08	0,9976
	Média	0	0,5	1,1	2,0	3,2	4,3	5,4	1,10	0,9975
	SD	0	0,00	0,00	0,06	0,06	0,06	0,06	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,4	1,2	2,2	3,5	4,9	6,2	1,27	0,9968
	II	0	0,4	1,1	2,4	3,7	4,9	6,3	1,29	0,9996
	III	0	0,4	1,1	2,3	3,7	4,8	6,3	1,29	0,9981
	Média	0	0,4	1,1	2,3	3,6	4,9	6,3	1,28	0,9992
	SD	0	0,00	0,06	0,10	0,12	0,06	0,06	0,01	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,3	0,7	1,3	2,4	3,5	4,5	0,98	0,9913
	II	0	0,3	0,7	1,4	2,5	3,5	4,5	0,97	0,9959
	III	0	0,3	0,7	1,4	2,5	3,5	4,5	0,97	0,9959
	Média	0	0,3	0,7	1,4	2,5	3,5	4,5	0,97	0,9946
	SD	0	0,00	0,00	0,06	0,06	0,00	0,00	0,01	

Tabela A-4.55 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 100 µM de **3b** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,5	1,4	2,6	3,9	5,1	6,2	1,21	0,9992
	II	0	0,5	1,4	2,6	3,8	5,0	6,2	1,20	1,0000
	III	0	0,5	1,4	2,6	3,9	5,2	6,3	1,24	0,9992
	Média	0	0,5	1,4	2,6	3,9	5,1	6,2	1,22	0,9997
	SD	0	0,00	0,00	0,00	0,06	0,10	0,06	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	0,5	1,1	2,0	3,1	4,3	5,3	1,07	0,9980
	II	0	0,5	1,1	1,9	3,1	4,3	5,3	1,08	0,9959
	III	0	0,5	1,1	2,0	3,1	4,2	5,3	1,06	0,9986
	Média	0	0,5	1,1	2,0	3,1	4,3	5,3	1,07	0,9978
	SD	0	0,00	0,00	0,06	0,00	0,06	0,00	0,01	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,4	1,1	2,3	3,7	5,0	6,4	1,33	0,9994
	II	0	0,4	1,2	2,4	3,8	5,0	6,4	1,30	0,9993
	III	0	0,4	1,1	2,4	3,8	4,9	6,4	1,31	0,9984
	Média	0	0,4	1,1	2,4	3,8	5,0	6,4	1,31	0,9993
	SD	0	0,00	0,06	0,06	0,06	0,06	0,00	0,02	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,3	0,8	1,6	2,7	3,8	4,8	1,02	0,9973
	II	0	0,3	0,8	1,7	2,7	3,8	4,8	1,01	0,9989
	III	0	0,3	0,8	1,6	2,6	3,6	4,7	0,98	0,9971
	Média	0	0,3	0,8	1,6	2,7	3,7	4,8	1,00	0,9981
	SD	0	0,00	0,00	0,06	0,06	0,12	0,06	0,02	

Tabela A-4.56 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 100 µM de **2b** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,5	1,3	2,4	3,6	4,8	5,8	1,14	0,9991
	II	0	0,5	1,3	2,4	3,7	4,9	5,9	1,17	0,9983
	III	0	0,5	1,3	2,4	3,6	4,8	5,9	1,16	0,9997
	Média	0	0,5	1,3	2,4	3,6	4,8	5,9	1,16	0,9992
	SD	0	0,00	0,00	0,00	0,06	0,06	0,06	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	0,5	1,1	2,1	3,1	4,2	5,3	1,05	0,9994
	II	0	0,5	1,1	2,0	3,1	4,2	5,2	1,04	0,9989
	III	0	0,5	1,1	2,0	3,1	4,2	5,3	1,06	0,9986
	Média	0	0,5	1,1	2,0	3,1	4,2	5,3	1,05	0,9992
	SD	0	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,06	0,01	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,4	1,1	2,3	3,8	4,9	6,4	1,32	0,9979
	II	0	0,4	1,1	2,4	3,7	5,0	6,5	1,34	0,9991
	III	0	0,4	1,1	2,4	3,8	5,0	6,5	1,34	0,9991
	Média	0	0,4	1,1	2,4	3,8	5,0	6,5	1,33	0,9990
	SD	0	0,00	0,00	0,06	0,06	0,06	0,06	0,01	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,3	0,7	1,6	2,5	3,7	4,7	1,01	0,9970
	II	0	0,3	0,7	1,7	3,0	4,0	4,8	1,05	0,9940
	III	0	0,3	0,7	1,7	2,6	3,7	4,8	1,02	0,9985
	Média	0	0,3	0,7	1,7	2,7	3,8	4,8	1,03	0,9995
	SD	0	0,00	0,00	0,06	0,26	0,17	0,06	0,02	

Tabela A-4.57 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com DMSO a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias							TCR (cm/dia)	R ²
		0	1	2	3	4	5	6		
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,5	1,4	2,6	3,9	5,0	6,3	1,22	0,9995
	II	0	0,5	1,4	2,6	3,9	4,9	6,2	1,19	0,9987
	III	0	0,5	1,4	2,6	3,9	4,9	6,2	1,19	0,9987
	Média	0	0,5	1,4	2,6	3,9	4,9	6,2	1,20	0,9990
	SD	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,06	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	0,5	1,0	2,0	3,1	4,2	5,4	1,10	0,9990
	II	0	0,5	1,0	2,0	3,0	4,2	5,4	1,10	0,9977
	III	0	0,5	1,0	2,0	3,0	4,2	5,4	1,10	0,9977
	Média	0	0,5	1,0	2,0	3,0	4,2	5,4	1,10	0,9983
	SD	0	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,4	1,1	2,5	3,7	5,0	6,2	1,27	0,9993
	II	0	0,4	1,1	2,3	3,7	4,9	6,2	1,28	0,9995
	III	0	0,4	1,1	2,4	3,7	5,0	6,1	1,26	0,9990
	Média	0	0,4	1,1	2,4	3,7	5,0	6,2	1,27	0,9997
	SD	0	0,00	0,00	0,10	0,00	0,06	0,06	0,01	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,3	0,8	1,7	2,8	3,9	4,9	1,04	0,9989
	II	0	0,3	0,7	1,6	2,8	3,9	4,8	1,05	0,9976
	III	0	0,3	0,7	1,7	2,8	3,9	4,8	1,04	0,9989
	Média	0	0,3	0,7	1,7	2,8	3,9	4,8	1,04	0,9987
	SD	0	0,00	0,06	0,06	0,00	0,00	0,06	0,01	

Tabela A-4.58 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 200 µM de **4a** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias							TCR (cm/dia)	R ²
		0	1	2	3	4	5	6		
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,5	1,2	2,3	3,8	4,8	6,2	1,25	0,9970
	II	0	0,5	1,1	2,3	3,8	4,9	6,2	1,28	0,9983
	III	0	0,5	1,1	2,3	3,7	4,9	6,1	1,26	0,9992
	Média	0	0,5	1,1	2,3	3,8	4,9	6,2	1,26	0,9985
	SD	0	0,00	0,06	0,00	0,06	0,06	0,06	0,02	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	0,5	1,0	1,9	3,0	3,9	5,1	1,02	0,9977
	II	0	0,5	1,1	1,9	3,0	3,9	5,0	0,98	0,9975
	III	0	0,5	1,0	1,9	2,9	3,9	4,9	0,98	0,9996
	Média	0	0,5	1,0	1,9	3,0	3,9	5,0	0,99	0,9986
	SD	0	0,00	0,06	0,00	0,06	0,00	0,10	0,02	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,4	0,8	1,5	2,5	3,5	4,4	0,92	0,9967
	II	0	0,4	0,8	1,5	2,6	3,6	4,5	0,95	0,9961
	III	0	0,4	0,8	1,5	2,6	3,6	4,5	0,95	0,9961
	Média	0	0,4	0,8	1,5	2,6	3,6	4,5	0,94	0,9964
	SD	0	0,00	0,00	0,00	0,06	0,06	0,06	0,02	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,3	0,7	1,2	2,4	3,5	4,6	1,01	0,9858
	II	0	0,3	0,7	1,2	2,4	3,4	4,5	0,98	0,9868
	III	0	0,3	0,7	1,2	2,4	3,5	4,6	1,01	0,9858
	Média	0	0,3	0,7	1,2	2,4	3,5	4,6	1,00	0,9862
	SD	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,06	0,02	

Tabela A-4.59 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 200 μ M de **3a** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,5	1,2	2,4	3,7	4,9	6,1	1,23	0,9998
	II	0	0,5	1,2	2,4	3,7	4,9	6,2	1,25	0,9998
	III	0	0,5	1,2	2,4	3,7	4,9	6,2	1,25	0,9998
	Média	0	0,5	1,2	2,4	3,7	4,9	6,2	1,24	0,9999
	SD	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,01
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	0,5	1,0	1,8	2,9	4,0	5,2	1,06	0,9954
	II	0	0,5	1,0	1,8	2,9	4,0	5,1	1,04	0,9967
	III	0	0,5	1,0	1,9	2,9	4,0	5,1	1,03	0,9982
	Média	0	0,5	1,0	1,8	2,9	4,0	5,1	1,04	0,9970
	SD	0	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,06	0,02
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,4	0,9	1,8	2,9	4,0	5,2	1,08	0,9976
	II	0	0,4	0,9	1,9	3,0	4,0	5,2	1,07	0,9990
	III	0	0,4	0,9	1,9	3,0	4,1	5,2	1,08	0,9997
	Média	0	0,4	0,9	1,9	3,0	4,0	5,2	1,08	0,9991
	SD	0	0,00	0,00	0,06	0,06	0,06	0,00	0,01	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,3	0,7	1,4	2,5	3,5	4,6	0,99	0,9948
	II	0	0,3	0,7	1,4	2,4	3,5	4,6	0,99	0,9932
	III	0	0,3	0,7	1,5	2,6	3,5	4,9	1,04	0,9912
	Média	0	0,3	0,7	1,4	2,5	3,5	4,7	1,01	0,9939
	SD	0	0,00	0,00	0,06	0,10	0,00	0,17	0,03	

Tabela A-4.60 Diâmetro (cm) das colônias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 200 μ M de **2a** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,5	1,2	2,4	3,6	4,9	6,1	1,23	0,9998
	II	0	0,5	1,2	2,4	3,6	4,9	6,2	1,25	0,9996
	III	0	0,5	1,2	2,4	3,6	4,9	6,2	1,25	0,9996
	Média	0	0,5	1,2	2,4	3,6	4,9	6,2	1,24	0,9997
	SD	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,01
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	0,5	1,0	2,0	3,2	4,2	5,3	1,08	0,9993
	II	0	0,5	1,1	2,0	3,2	4,3	5,4	1,09	0,9984
	III	0	0,5	1,1	2,0	3,1	4,2	5,3	1,06	0,9986
	Média	0	0,5	1,1	2,0	3,2	4,2	5,3	1,08	0,9991
	SD	0	0,00	0,06	0,00	0,06	0,06	0,06	0,06	0,02
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,4	0,9	2,1	3,4	4,5	5,9	1,24	0,9990
	II	0	0,4	0,9	2,0	3,3	4,6	5,9	1,26	0,9990
	III	0	0,4	1,0	2,1	3,4	4,6	5,8	1,21	0,9995
	Média	0	0,4	0,9	2,1	3,4	4,6	5,9	1,24	0,9995
	SD	0	0,00	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,03	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,3	0,8	1,45	2,5	3,6	4,7	1,00	0,9918
	II	0	0,3	0,8	1,5	2,7	3,7	4,8	1,02	0,9946
	III	0	0,3	0,8	1,4	2,5	3,5	4,5	0,95	0,9926
	Média	0	0,3	0,8	1,5	2,6	3,6	4,7	0,99	0,9934
	SD	0	0,00	0,00	0,05	0,12	0,10	0,15	0,04	

Tabela A-4.61 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 200 µM de **4b** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,5	1,2	2,4	3,5	4,9	6,0	1,21	0,9987
	II	0	0,5	1,3	2,4	3,6	4,9	6,2	1,23	0,9987
	III	0	0,5	1,3	2,4	3,7	4,9	6,2	1,23	0,9993
	Média	0	0,5	1,3	2,4	3,6	4,9	6,1	1,22	0,9994
	SD	0	0,00	0,06	0,00	0,10	0,00	0,12	0,01	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	0,5	1,1	2,1	3,3	4,5	5,8	1,18	0,9980
	II	0	0,5	1,1	2,1	3,3	4,5	5,8	1,18	0,9980
	III	0	0,5	1,1	2,1	3,3	4,5	5,7	1,16	0,9988
	Média	0	0,5	1,1	2,1	3,3	4,5	5,8	1,17	0,9983
	SD	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,01	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,4	1,2	2,4	3,7	4,9	6,3	1,27	0,9993
	II	0	0,4	1,1	2,2	3,5	4,8	6,2	1,28	0,9983
	III	0	0,4	1,1	2,2	3,5	4,9	6,1	1,27	0,9986
	Média	0	0,4	1,1	2,3	3,6	4,9	6,2	1,27	0,9992
	SD	0	0,00	0,06	0,12	0,12	0,06	0,10	0,01	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,3	0,7	1,4	2,6	3,6	4,6	1,00	0,9952
	II	0	0,3	0,7	1,3	2,4	3,4	4,5	0,97	0,9913
	III	0	0,3	0,7	1,3	2,5	3,5	4,5	0,98	0,9921
	Média	0	0,3	0,7	1,3	2,5	3,5	4,5	0,98	0,9933
	SD	0	0,00	0,00	0,06	0,10	0,10	0,06	0,02	

Tabela A-4.62 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 200 µM de **3b** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,5	1,3	2,5	3,7	5,0	6,3	1,25	0,9996
	II	0	0,5	1,3	2,6	3,7	5,0	6,3	1,24	0,9992
	III	0	0,5	1,3	2,5	3,7	5,0	6,3	1,25	0,9996
	Média	0	0,5	1,3	2,5	3,7	5,0	6,3	1,25	0,9995
	SD	0	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,01	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	0,5	1,1	2,0	3,2	4,3	5,5	1,11	0,9978
	II	0	0,5	1,1	2,0	3,1	4,4	5,5	1,12	0,9965
	III	0	0,5	1,1	2,0	3,1	4,3	5,5	1,11	0,9968
	Média	0	0,5	1,1	2,0	3,1	4,3	5,5	1,11	0,9974
	SD	0	0,00	0,00	0,00	0,06	0,06	0,00	0,01	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,4	1,1	2,2	3,6	4,9	6,3	1,31	0,9984
	II	0	0,4	1,1	2,4	3,8	4,9	6,5	1,33	0,9976
	III	0	0,4	1,1	2,3	3,6	4,9	6,3	1,30	0,9993
	Média	0	0,4	1,1	2,3	3,7	4,9	6,4	1,31	0,9989
	SD	0	0,00	0,00	0,10	0,12	0,00	0,12	0,02	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,3	0,8	1,6	2,8	3,9	5,1	1,09	0,9957
	II	0	0,3	0,8	1,5	2,7	3,8	4,9	1,05	0,9940
	III	0	0,3	0,8	1,5	2,7	3,8	4,9	1,05	0,9940
	Média	0	0,3	0,8	1,5	2,7	3,8	5,0	1,06	0,9947
	SD	0	0,00	0,00	0,06	0,06	0,06	0,12	0,02	

Tabela A-4.63 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em SNM suplementado com 200 µM de **2b** a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias						TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5			6
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,5	1,2	2,3	3,6	4,9	6	1,22	0,9989
	II	0	0,5	1,2	2,4	3,8	5,0	6,3	1,28	0,9995
	III	0	0,5	1,2	2,3	3,7	4,8	6,1	1,23	0,9987
	Média	0	0,5	1,2	2,3	3,7	4,9	6,1	1,24	0,9994
	SD	0	0,00	0,00	0,06	0,10	0,10	0,15	0,03	
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	0,5	1,1	2,2	3,3	4,3	5,5	1,09	0,9994
	II	0	0,5	1,1	2,1	3,2	4,3	5,4	1,08	0,9997
	III	0	0,5	1,1	2,0	3,1	4,3	5,3	1,07	0,9980
	Média	0	0,5	1,1	2,1	3,2	4,3	5,4	1,08	0,9997
	SD	0	0,00	0,00	0,10	0,10	0,00	0,10	0,01	
<i>A. alliaceus</i> MUM 03.55	I	0	0,4	1,2	2,4	3,8	5,0	6,6	1,34	0,9976
	II	0	0,4	1,1	2,3	3,9	5,0	6,6	1,37	0,9969
	III	0	0,4	1,1	2,4	3,8	5,0	6,5	1,34	0,9991
	Média	0	0,4	1,1	2,4	3,8	5,0	6,6	1,35	0,9981
	SD	0	0,00	0,06	0,06	0,06	0,00	0,06	0,02	
<i>A. ochraceus</i> MUM 03.56	I	0	0,3	0,7	1,5	2,6	3,5	4,6	0,98	0,9975
	II	0	0,3	0,7	1,5	2,6	3,5	4,6	0,98	0,9975
	III	0	0,3	0,7	1,5	2,7	3,5	4,6	0,98	0,9963
	Média	0	0,3	0,7	1,5	2,6	3,5	4,6	0,98	0,9973
	SD	0	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	

Tabela A-4.64 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em CYA a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias								TCR (cm/dia)	R ²	
		0	1	2	3	4	5	6	7			8
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	1,0	2,65	4,5	6,0	7,7	8,5	8,5	8,5	1,68	0,9992
	II	0	1,0	2,6	4,4	5,95	7,5	8,5	8,5	8,5	1,64	0,9992
	III	0	1,0	2,6	4,4	5,9	7,65	8,5	8,5	8,5	1,66	0,9994
	Média	0	1,0	2,6	4,4	5,95	7,6	8,5	8,5	8,5	1,66	0,9994
	SD	0	0,0	0,03	0,06	0,05	0,1	0,0	0,0	0,0	0,02	
<i>A. ibericus</i> MUM 03.49	I	0	1,0	2,5	4,6	6,7	8,3	8,5	8,5	8,5	1,88	0,9965
	II	0	1,0	2,4	4,6	6,6	8,3	8,5	8,5	8,5	1,88	0,9959
	III	0	1,0	2,5	4,6	6,6	8,3	8,5	8,5	8,5	1,87	0,9974
	Média	0	1,0	2,5	4,6	6,6	8,3	8,5	8,5	8,5	1,88	0,9967
	SD	0	0,0	0,06	0,0	0,06	0,0	0,0	0,0	0,0	0,01	
<i>A. niger</i> MUM 03.57	I	0	0,8	2,4	4,2	5,9	7,7	8,5	8,5	8,5	1,73	0,9996
	II	0	0,8	2,4	4,2	5,9	7,7	8,5	8,5	8,5	1,73	0,9996
	III	0	0,8	2,4	4,2	5,9	7,6	8,5	8,5	8,5	1,71	0,9998
	Média	0	0,8	2,4	4,2	5,9	7,6	8,5	8,5	8,5	1,72	0,9997
	SD	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,06	0,0	0,0	0,0	0,01	
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,8	2,2	3,6	4,9	6,3	7,6	8,5	8,5	1,37	0,9998
	II	0	0,8	2,1	3,6	4,95	6,3	7,7	8,5	8,5	1,39	0,9996
	III	0	0,8	2,1	3,6	4,9	6,3	7,6	8,5	8,5	1,38	0,9996
	Média	0	0,8	2,1	3,6	4,9	6,3	7,6	8,5	8,5	1,38	0,9998
	SD	0	0,0	0,06	0,0	0,03	0,0	0,06	0,0	0,0	0,01	

Tabela A-4.65 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em CYA+1mM a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias									TCR (cm/dia)	R ²
		0	1	2	3	4	5	6	7	8		
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	0,6	0,8	1,5	2,6	3,8	5,2	6,7	8,1	1,25	0,9895
	II	0	0,6	0,8	1,45	2,5	3,7	5,1	6,8	8,1	1,26	0,9853
	III	0	0,6	0,75	1,45	2,45	3,7	5,1	6,6	8,0	1,24	0,9880
	Média	0	0,6	0,8	1,5	2,5	3,7	5,1	6,7	8,1	1,25	0,9877
	SD	0	0,0	0,03	0,03	0,08	0,06	0,06	0,1	0,06	0,01	
<i>A. ibericus</i> MUM 03.49	I	0	0,6	0,95	1,7	2,1	2,7	3,7	4,8	6,8	0,91	0,9358
	II	0	0,6	0,95	1,6	2,1	2,6	3,5	4,8	6,8	0,91	0,9254
	III	0	0,6	0,95	1,7	2,1	2,6	3,6	4,7	6,8	0,89	0,9241
	Média	0	0,6	0,95	1,7	2,1	2,6	3,6	4,8	6,8	0,90	0,9287
	SD	0	0,0	0,00	0,06	0,0	0,06	0,1	0,06	0,0	0,01	
<i>A. niger</i> MUM 03.57	I	0	0,6	1,1	2,0	3,0	4,2	5,5	6,9	8,0	1,18	0,9955
	II	0	0,6	1,1	2,0	3,0	4,2	5,4	7,0	8,0	1,18	0,9939
	III	0	0,6	1,2	2,0	2,95	4,1	5,4	6,9	8,0	1,17	0,9916
	Média	0	0,6	1,1	2,0	3,0	4,2	5,4	6,9	8,0	1,18	0,9939
	SD	0	0,0	0,06	0,0	0,03	0,06	0,06	0,06	0,0	0,01	
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0,6	0,9	1,8	3,0	4,4	5,7	7,1	8,5	1,27	0,9972
	II	0	0,6	1,0	1,9	3,1	4,45	5,8	7,3	8,5	1,26	0,9962
	III	0	0,6	0,8	1,8	3,0	4,4	5,7	7,2	8,5	1,29	0,9976
	Média	0	0,6	0,9	1,8	3,0	4,4	5,7	7,2	8,5	1,27	0,9971
	SD	0	0,0	0,1	0,06	0,06	0,03	0,06	0,1	0,0	0,01	

Tabela A-4.66 Diâmetro (cm) das colónias medido ao longo do tempo quando crescidas em CYA+10mM a 25 °C no escuro e respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

		Dias									TCR (cm/dia)	R ²
		0	1	2	3	4	5	6	7	8		
<i>A. carbonarius</i> MUM 03.59	I	0	0	0	0	0,65	0,7	0,9	1,0	1,1	0,12	0,9730
	II	0	0	0	0	0,6	0,6	0,9	1,1	1,2	0,17	0,9383
	III	0	0	0	0	0,65	0,7	0,8	1,05	1,2	0,15	0,9429
	Média	0	0	0	0	0,6	0,7	0,9	1,1	1,2	0,15	0,9664
	SD	0	0	0	0	0,03	0,06	0,06	0,05	0,06	0,02	
<i>A. ibericus</i> MUM 03.49	I	0	0	0	0	0,7	0,8	1,0	1,1	1,3	0,15	0,9868
	II	0	0	0	0	0,65	0,8	1,0	1,1	1,2	0,14	0,9800
	III	0	0	0	0	0,7	0,9	1,1	1,2	1,3	0,15	0,9698
	Média	0	0	0	0	0,7	0,8	1,0	1,1	1,3	0,15	0,9888
	SD	0	0	0	0	0,03	0,06	0,06	0,06	0,06	0,01	
<i>A. niger</i> MUM 03.57	I	0	0	0	0	0,5	0,6	0,8	1,2	1,6	0,28	0,9423
	II	0	0	0	0	0,5	0,7	0,9	1,2	1,6	0,27	0,9746
	III	0	0	0	0	0,5	0,7	0,8	1,1	1,5	0,24	0,9474
	Média	0	0	0	0	0,5	0,7	0,8	1,2	1,6	0,26	0,9584
	SD	0	0	0	0	0,0	0,06	0,06	0,06	0,06	0,02	
<i>A. niger</i> MUM 03.58	I	0	0	0	0	0,6	0,9	1,0	1,3	1,6	0,24	0,9796
	II	0	0	0	0	0,6	0,8	1,0	1,3	1,6	0,25	0,9890
	III	0	0	0	0	0,6	0,8	0,9	1,2	1,5	0,22	0,9680
	Média	0	0	0	0	0,6	0,8	1,0	1,3	1,6	0,24	0,9823
	SD	0	0	0	0	0,0	0,06	0,06	0,06	0,06	0,02	