



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

DANIELLE CARDOSO GIMENES

**POTENCIAL DE LEVEDURAS NO BIOCONTROLE DE
DIFERENTES ESPÉCIES DE *ASPERGILLUS*
OCRATOXIGÊNICOS E DETOXIFICAÇÃO DE
OCRATOXINA A**

DANIELLE CARDOSO GIMENES

**Potencial de leveduras no biocontrole de diferentes
espécies de *Aspergillus* ocratoxigênicos e
detoxificação de ocratoxina A**

Tese apresentada ao Programa de
Doutorado em Biotecnologia, do
Departamento de Bioquímica e Biotecnologia,
da Universidade Estadual de Londrina como
requisito parcial para a obtenção do título de
Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Profa Dr^a Elisabete Yurie Satataque Ono

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

- D185 Gimenes, Danielle Cardoso.
Potencial de leveduras no biocontrole de diferentes espécies de *Aspergillus* ocratoxigênicos e detoxificação de ocratoxina A / Danielle Cardoso Gimenes. - Londrina, 2018.
105 f. : il.
- Orientador: Elisabete Yurie Sataque Ono Sataque ONO.
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2018.
Inclui bibliografia.
1. Controle Biológico - Tese. 2. Leveduras Antagonistas - Tese. 3. Micotoxina - Tese. 4. Inibição - Tese. I. Sataque ONO, Elisabete Yurie Sataque Ono. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 66

DANIELLE CARDOSO GIMENES

**Potencial de leveduras no biocontrole de diferentes
espécies de *Aspergillus* ocratoxigênicos e
detoxificação de ocratoxina A**

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Elisabete Yurie Sataque Ono
Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho
Departamento de Tecnologia de Alimentos - DAALM
UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Londrina

Prof^a. Dr^a. Joice Sifuentes dos Santos
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados
UNOPAR - Universidade Norte do Paraná

Prof^a. Dr^a. Márcia Cristina Furlaneto
Departamento de Microbiologia
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Dionísio Borsato
Departamento de Química
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 27 de Novembro de 2018.

*Dedico este trabalho ao meu marido Rafael Kutilak Gimenes e
aos meus pais, Josilda Camelo Cardoso e José Ferreira Cardoso,
pela compreensão, amor e apoio.*

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Elisabete Yurie Sataque Ono, pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação, por toda a dedicação e ensinamentos indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, à Fundação Araucária e CAPES, pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsa de doutorado.

Aos professores do Programa do Doutorado em Biotecnologia, pelos ensinamentos e colaboração em diversos aspectos.

À Drª Áurea Maria Lage de Moraes (Instituto Oswaldo Cruz), pela disponibilização das cepas de *Aspergillus ochraceus*.

À Profª Drª Maria Helena Pelegrinelli Fungaro, pela disponibilização das cepas de *Aspergillus ochraceus*, *A. westerdijkiae* e *A. carbonarius*.

Ao Prof. Dr. Mario Augusto Ono, pela disponibilização de materiais fundamentais para a realização deste trabalho.

À Drª Rafaela Macagnan, pela disponibilização de leveduras isoladas de solo.

À Profª Drª Daniele Sartori pela colaboração na identificação dos isolados de leveduras.

Ao Prof. Dr. Dionisio Borsato, pelo auxílio com a análise estatística dos dados do presente trabalho.

Ao Nilson Roberto Ladeia Carvalho (Emater- PR), pela disponibilização de amostras de frutos de café.

Aos técnicos do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LMEM) Oswaldo Capelo, Daiani Barbieri de Andrade e Edson Moreti, pelo auxílio na execução da análise de microscopia eletrônica de varredura.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (BBTEC/UEL): Nelson Rodriguez, Elda Aguiar, Silvia Borba, Sérgio Evangelista, Sandra Aparecida Defende, pela colaboração e auxílio.

Aos colegas de laboratório Melissa Tiemi Hirozawa, Andressa Jacqueline de Oliveira, Jaqueline Gozzi Bordini e Ismael Amador, pelo auxílio em diversas atividades e conhecimentos compartilhados.

Às estagiárias Bruna Castro Alves Plank e Ana Beatriz de Almeida Gomes, pelo auxílio na execução dos experimentos laboratoriais.

A todos que colaboraram para realização deste trabalho.

GIMENES, Danielle Cardoso. **Potencial de leveduras no biocontrole de diferentes espécies de *Aspergillus* ocratoxigênicos e detoxificação de ocratoxina A.** 2018. 105 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Aspergillus ochraceus, *A. westerdijkiae* e *A. carbonarius* contaminam culturas de grãos, cereais e frutas e podem produzir ocratoxina A (OTA), uma micotoxina prejudicial para animais e seres humanos. O uso de leveduras é uma alternativa promissora para controle de fungos e micotoxinas em alimentos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de leveduras no biocontrole de *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* e *A. carbonarius* e na detoxificação de OTA *in vitro*. *Hanseniaspora opuntiae* foi selecionada para um estudo detalhado sobre o biocontrole de *A. ochraceus in vitro* e em frutos de café. Foi analisada a inibição do crescimento de três cepas de *A. ochraceus* co-cultivadas com *H. opuntiae* e a influência dos compostos orgânicos voláteis, produzidos pela levedura, pela determinação da medida do diâmetro micelial. Foi avaliado o efeito inibitório do sobrenadante livre de células de *H. opuntiae* sobre os conídios e hifas de *A. ochraceus* através de análise microscópica. *H. opuntiae* foi aplicada em frutos de café pós-colheita, nas concentrações 10^5 , 10^7 e 10^9 células. mL⁻¹, após os frutos serem contaminados com *A. ochraceus* (10^5 conídios. mL⁻¹), a incidência de deterioramento no café foi observada nos dias 1, 3, 6, 9, e 12. As alterações morfológicas de *A. ochraceus* por ação de *H. opuntiae* foram observadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura. Foi avaliado a inibição do crescimento micelial dos fungos *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* e *A. carbonarius* co-cultivados com *H. opuntiae*, *Meyerozyma caribbica* e *Kluyveromyces marxianus* e a influência da OTA sobre a viabilidade das leveduras. A eficiência das leveduras na detoxificação de OTA foi avaliada usando um delineamento estatístico Box Behnken (3³) incompleto com triplicata no ponto central e as variáveis analisadas foram diferentes tamanhos de inóculo das leveduras, tempo de incubação e concentração de OTA. *H. opuntiae* inibiu o crescimento de *A. ochraceus* (82% a 87%) *in vitro*. Além disso, os compostos orgânicos voláteis reduziram o diâmetro micelial do fungo de 62% a 69%, enquanto que o sobrenadante livre de células inibiu a germinação de conídios, 77% a 93%, e o crescimento de hifas, 54% a 78%. *H. opuntiae* (10^7 e 10^9 células. mL⁻¹) aplicada nos frutos de café retardou o deterioramento dos frutos por *A. ochraceus* até o 9º dia e foram observadas nas micrografias hifas pequenas e tortuosas do fungo. As três leveduras antagonistas foram capazes de inibir o crescimento fúngico *in vitro* com taxas de inibição variando de 13 % a 86 %. *K. marxianus* (10^8 células. mL⁻¹) foi o mais eficiente na inibição das três espécies de *Aspergillus*, *A. ochraceus* (78%), *A. westerdijkiae* (81%) e *A. carbonarius* (84%). A análise de regressão múltipla mostrou que os três modelos quadráticos apresentaram uma boa predição, com $R^2 = 0,94$ (*H. opuntiae*), $R^2 = 0,87$ (*M. caribbica*) e $R^2 = 0,86$ (*K. marxianus*) e um desvio não significativo, $p = 0,30$, $p = 0,20$ e $p = 0,13$, respectivamente. Os modelos preditivos mostraram que a detoxificação máxima de OTA pelas três leveduras seria de 86,8% (*H. opuntiae*), 79,3% (*M. caribbica*) e 73,7% (*K. marxianus*). Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores preditos pelos modelos estatísticos e os resultados obtidos experimentalmente, indicando que os modelos podem ser aplicados para prever a detoxificação de OTA *in vitro* por estas leveduras.

Palavras-chave: Controle Biológico. Leveduras Antagonistas. Micotoxina. Inibição.

GIMENES, Danielle Cardoso. **Potential of yeasts for biocontrol of different ochratoxigenic *Aspergillus* species and ochratoxin A detoxification**. 2018.105 f. Thesis (Doctorate in Biotechnology) - State University of Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Aspergillus ochraceus, *A. westerdijkiae* and *A. carbonarius* contaminate crops of grains, cereals and fruits and can produce ochratoxin A (OTA), mycotoxin harmful to animals and humans. The use of yeasts has been proposed as a promising alternative for fungal and mycotoxin control in food. Therefore, the objective of this study was to evaluate the antagonistic potential of yeasts for inhibition of *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* and *A. carbonarius* growth and the efficiency for *in vitro* OTA detoxification. *Hanseniaspora opuntiae* was selected for a detailed study on the *in vitro* *A. ochraceus* biocontrol and on coffee fruits. The growth inhibition of three *A. ochraceus* strains co-cultured with *H. opuntiae* and the influence of the volatile organic compounds produced by the yeast were determined by the determination of the mycelial diameter measurement. The inhibitory effect of *H. opuntiae* cell free supernatant on the conidia and hyphae of *A. ochraceus* was assessed by microscopic analysis. *H. opuntiae* was applied to post-harvest coffee fruits at concentrations 10^5 , 10^7 and 10^9 cells. mL^{-1} , after the fruits were contaminated with *A. ochraceus* (10^5 conidia. mL^{-1}), the decay incidence of coffee was observed on days 1, 3, 6, 9, and 12. The *A. ochraceus* morphological alterations by *H. opuntiae* were observed through Scanning Electron Microscopy. Inhibition of mycelial growth of *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* and *A. carbonarius* co-cultivated with *H. opuntiae*, *Meyerozyma caribbica* and *Kluyveromyces marxianus* and the OTA influence on the viability of yeasts were evaluated. The efficiency of each yeast for OTA detoxification was evaluated using an incomplete Box Behnken (3^3) statistical design with triplicate at the central point and the variables analyzed were different yeast inoculum size, incubation time and OTA concentration. *H. opuntiae* inhibited *in vitro* the *A. ochraceus* growth (82% to 87%). In addition, the volatile organic compounds reduced the mycelial diameter of the fungus from 62% to 69%, while cell-free supernatant inhibited conidial germination, 77% to 93%, and hyphae growth, 54% to 78%. *H. opuntiae* (10^7 and 10^9 cells. mL^{-1}) applied in coffee fruit delayed fruit decay by *A. ochraceus* until the 9th day and short and tortuous *A. ochraceus* hyphae were observed in the micrographs. The three antagonistic yeasts were able to inhibit *in vitro* fungal growth with inhibition rates ranging from 13% to 86%. *K. marxianus* was the most efficient in inhibiting the three *Aspergillus* species, i.e., *A. ochraceus* (78%), *A. westerdijkiae* (81%) and *A. carbonarius* (84%). The multiple regression analysis showed that the three quadratic models presented a good prediction, with $R^2 = 0.94$ (*H. opuntiae*), $R^2 = 0.87$ (*M. caribbica*) and $R^2 = 0.86$ (*K. marxianus*) and a non-significant lack of fit, $p = 0.30$, $p = 0.20$ and $p = 0.13$, respectively. The predictive models showed that, under optimum conditions, the maximum OTA detoxification by the three yeasts would be 86.8% (*H. opuntiae*), 79.3% (*M. caribbica*) and 73.7% (*K. marxianus*). There was no significant difference ($p < 0.05$) between the values predicted by the statistical models and the results obtained experimentally, indicating that the models can be applied to predict the *in vitro* OTA detoxification by these yeasts.

Key Words: Biological control. Yeasts Antagonists. Mycotoxin. Inhibition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da ocratoxina A e seus principais análogos	15
Figura 2. Componentes da parede celular de leveduras.	29
Figura 3. Vias de biodegradação de OTA. (a) hidrólise da ligação amida de OTA; (b) hidrólise do anel lactona de OTA.	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 OCRATOXINA A	15
3.1.1 Fungos Produtores	16
3.1.2 Ocorrência Natural	17
3.1.3 Efeitos Toxicológicos	18
3.2 CONTROLE BIOLÓGICO DE FUNGOS PRODUTORES DE OTA COM A APLICAÇÃO DE LEVEDURAS ANTAGONISTAS	21
3.3 ESTRATÉGIAS PARA A DETOXIFICAÇÃO DE OTA	24
3.3.1 Métodos Físicos	25
3.3.2 Métodos Químicos	27
3.4 MÉTODOS BIOLÓGICOS PARA A DETOXIFICAÇÃO DE OTA	28
3.4.1 Adsorção Pela Parede Celular de Leveduras	28
3.4.2 Biodegradação de OTA por Leveduras	31
3.5 LEVEDURAS NÃO- <i>SACCHAROMYCES</i> ENCONTRADAS NATURALMENTE EM ALIMENTOS	33
3.5.1 <i>Hanseniaspora opuntiae</i>	34
3.5.2 <i>Meyerozyma caribbica</i>	36
3.5.3 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 CEPAS FÚNGICAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	38
4.2 TRIAGEM PRELIMINAR PARA A SELEÇÃO DE LEVEDURAS ANTAGONISTAS ISOLADAS DE SOLO E MILHO	39
4.3 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>A. OCHRACEUS</i> POR <i>H. OPUNTIAE</i>	39

4.3.1	Influência dos Compostos Orgânicos Voláteis Produzidos por <i>H. opuntiae</i> Sobre o Crescimento de <i>A. ochraceus</i> <i>in vitro</i>	40
4.3.2	Efeito do Sobrenadante Livre de Células Sobre a Germinação Conidial e Crescimento das Hifas de <i>A. ochraceus</i>	40
4.3.3	Ação de <i>H. opuntiae</i> no biocontrole de <i>A. ochraceus</i> em Frutos de Café Pós-Colheita	41
4.4	ESTUDO ULTRAESTRUTURAL DO EFEITO ANTAGONISTA DE <i>H. OPUNTIAE</i> SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>A. OCHRACEUS</i> POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	42
4.4.1	Avaliação da Interação de <i>A. ochraceus</i> em Co-Cultivo com <i>H. opuntiae</i>	42
4.4.2	Avaliação do Efeito do Sobrenadante Livre de Células de <i>H. opuntiae</i> sobre o Crescimento de <i>A. ochraceus</i>	43
4.4.3	Avaliação da Superfície de Frutos de Café	43
4.4.4	Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	43
4.5	INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>ASPERGILLUS</i> OCRATOXIGÊNICOS POR <i>H. OPUNTIAE</i> , <i>M. CARIBBICA</i> E <i>K. MARXIANUS</i> <i>IN VITRO</i>	44
4.6	CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE OCRATOXINA A	44
4.7	INFLUÊNCIA DA OTA NA VIABILIDADE DE <i>H. OPUNTIAE</i> , <i>M. CARIBBICA</i> E <i>K. MARXIANUS</i>	45
4.8	ENSAIO DE DETOXIFICAÇÃO DE OTA <i>IN VITRO</i> PELAS LEVEDURAS ANTAGONISTAS	45
4.8.1	Extração de OTA	45
4.8.2	Deteção e Quantificação de OTA.....	46
4.8.3	Ensaio de Recuperação.....	46
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
Artigo 1	Biocontrol of <i>Aspergillus ochraceus</i> by <i>Hanseniaspora opuntiae</i> <i>in vitro</i> and on coffee fruits	50
Artigo 2	Potential of antagonistic yeasts for biocontrol of ochratoxigenic <i>Aspergillus</i> species and optimization of ochratoxin A detoxification	69

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	92
REFERÊNCIAS.....	93

1 INTRODUÇÃO

Os fungos toxigênicos *Aspergillus ochraceus*, *A. westerdijkiae* e *A. carbonarius* contaminam culturas de grãos, cereais e frutas, além de produzir ocratoxina A (OTA), um metabólito secundário tóxico para animais e seres humanos. Essa micotoxina apresenta grande estabilidade química e térmica e pode persistir nos alimentos ou rações mesmo após a inativação dos fungos por processos de industrialização e, ao ser metabolizada pelos animais, pode estar presente na carne, ovos e leite, constituindo um risco para a saúde dos seres humanos. Além disso, pode acarretar grandes perdas econômicas pela redução da produtividade agrícola e pecuária (PINOTTI et al., 2016; SUN et al., 2017).

Várias estratégias para a detoxificação pós-colheita de grãos, cereais e frutas como aplicação de materiais adsorventes, o peróxido de hidrogênio e a amônia, vem sendo utilizadas, uma vez que a contaminação por micotoxinas no campo é difícil de evitar. As estratégias de detoxificação por métodos físicos e químicos apresentam alguns fatores limitadores, devido ao alto custo e as dificuldades envolvidas no processo. Muitos adsorventes físicos são estudados e estão disponíveis em preparações comerciais, como aditivos para ração animal. No entanto, muitos destes métodos físicos e químicos podem levar a significativas perdas no valor nutritivo e palatabilidade dos alimentos e rações (ABRUNHOSA; SANTOS; VENÂNCIO, 2006; SHETTY; JESPERSEN, 2006).

A utilização de métodos biológicos tem sido proposta como uma alternativa promissora para o controle de fungos e OTA em alimentos e rações. Entre os microrganismos com potencial para serem aplicados para esta finalidade destacam-se as leveduras. As leveduras apresentam características que as tornam boas ferramentas no controle biológico de fungos toxigênicos, como a capacidade de sobreviver a várias condições ambientais e não produzir compostos tóxicos para os seres humanos e animais (BLEVE et al., 2006). A ação antagonista das leveduras contra fungos toxigênicos pode ser atribuída à competição por nutrientes e espaço, secreção de compostos antifúngicos, parasitismo, formação de biofilme e indução de resistência na planta hospedeira por estimulação de uma resposta de defesa envolvendo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (LIU et al., 2013).

Além disso, a parede celular de algumas espécies de leveduras é capaz de adsorver OTA dos alimentos, descontaminando-os significativamente (BEJAOU et al.,

2004; CARIDI et al., 2012; PETRUZZI et al., 2015), e algumas leveduras podem degradar a OTA no seu metabólito não tóxico, a ocratoxina alfa (OT α) (PÉTERI et al., 2007; SCHATZMAYR et al., 2003). No entanto, existem leveduras que podem apresentar sensibilidade a certas micotoxinas, constituindo um sério problema na aplicação em processos fermentativos para produção de alimentos e no uso como aditivos alimentares (PFLIEGLER et al., 2015).

Um grande desafio ao explorar o potencial de novas espécies de leveduras, especialmente para aplicação no processamento de alimentos e rações, é garantir a biossegurança (STEENSELS; VERSTREPEN, 2014). As leveduras *Hanseniaspora opuntiae*, *Meyerozyma caribbica* e *Kluyveromyces marxianus* são encontradas naturalmente em alimentos e já foram descritas por alguns autores como seguras para a aplicação em alimentos (NIARÉ-DOUMBO et al., 2014; SAUCEDO- LUNA et al., 2011; LANE; MORRISSEY, 2010).

Apesar de *H. opuntiae* e *M. caribbica* já terem sido descritas com potencial para o controle biológico de alguns fitopatógenos (DE PAIVA et al., 2017; RUIZ –MOYANO et al., 2016; BAUTISTA–ROSALES et al., 2013) e *K. marxianus* ser considerada uma levedura com potencial biotecnológico (FONSECA et al., 2008), não há estudos sobre a ação dessas leveduras no controle biológico de fungos produtores de OTA e na detoxificação de OTA.

Portanto, considerando o grande potencial dessas leveduras como novos agentes de biocontrole de fungos produtores de OTA e na detoxificação de OTA, esse trabalho avaliou a ação antagonista das leveduras *H. opuntiae*, *M. caribbica* e *K. marxianus* contra os fungos *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* e *A. carbonarius* e a capacidade de detoxificação de OTA por essas leveduras *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi analisar o potencial de inibição de leveduras sobre o crescimento dos fungos ocratoxigênicos *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae* e avaliar a capacidade de detoxificação de ocratoxina A (OTA) por essas leveduras.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma triagem preliminar *in vitro* para selecionar leveduras com potencial de inibição sobre o crescimento de diferentes espécies de *Aspergillus* ocratoxigênicos;
- Avaliar o potencial de inibição do crescimento de *A. ochraceus* (cepas AO 14, IOC 4417 e IOC 4462) pela levedura *H. opuntiae* *in vitro*.
- Avaliar a influencia de compostos orgânicos voláteis (COVs) e do extrato livre de células (ELC) do cultivo de *H. opuntiae* sobre o crescimento de *A. ochraceus* *in vitro*;
- Avaliar o efeito antagonista da levedura *H. opuntiae* no biocontrole de *A. ochraceus* em frutos de café pós-colheita;
- Analisar a organização celular de *A. ochraceus*, sob ação antagonista de *H. opuntiae*, por Microscopia Eletrônica de Varredura;
- Avaliar a inibição do crescimento de *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* e *A. carbonarius* pelas leveduras *H. opuntiae*, *M. caribbica* e *K. marxianus* *in vitro*;
- Avaliar a influência de OTA sobre a viabilidade das leveduras;
- Avaliar a capacidade de detoxificação de OTA pelas leveduras antagonistas, otimizando diferentes fatores com a aplicação de um modelo estatístico.

3 REVISÃO DE LITERATURA

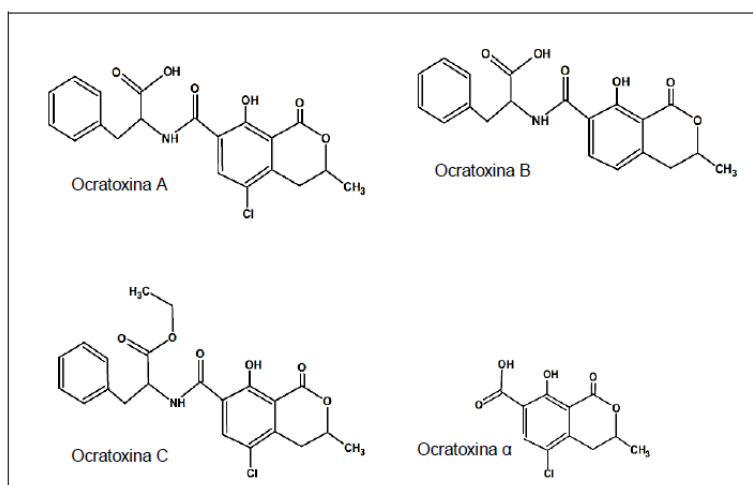
3.1 OCRATOXINA A

As micotoxinas são metabólitos secundários, produzidos por fungos filamentosos que causam diversos efeitos tóxicos para seres humanos e animais. Entre as micotoxinas, destaca-se a Ocratoxina A (OTA), produzida por fungos dos gêneros *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.*

OTA é composta pela estrutura 7-carboxil-5-cloro-8-hidroxi-3,4-diidro-3-R-metilisocumarina (ocratoxina α) e uma molécula de L- β -fenilalanina ligada ao grupo 7-carboxil por uma ligação amida (ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2010; WU et al., 2011).

Ao menos 20 diferentes análogos de ocratoxinas foram caracterizados, como as ocratoxinas A, B, C, α , β , metiléster de OT α , 4-hidroxi-OTA, sendo a ocratoxina A a mais tóxica e de ocorrência natural (XIAO et al., 1995). A presença do átomo de cloro em um dos anéis diidroisocumarínicos da estrutura da OTA contribui para a sua atividade tóxica (Figura 1). A ocratoxina B, que contém um hidrogênio ao invés do átomo de cloro, é aproximadamente dez vezes menos tóxica que a OTA, enquanto que os produtos da hidrólise da OTA e da ocratoxina B, a ocratoxina α e β , respectivamente, não são tóxicas (XIAO et al., 1996).

Figura 1 – Estrutura da ocratoxina A e seus principais análogos



Fonte: Duarte, Lino, Pena (2011).

OTA é um cristal incolor de fórmula empírica $C_{20}H_{18}O_6NCl$, que tem a massa molar de 403,822 Da. Os pontos de fusão são 94 - 96 °C quando cristalizado a partir de benzeno. Essa micotoxina tem propriedades de ácidos fracos com pK_{a1} 4,2 - 4,4 e pK_{a2} 7,0 - 7,3, do grupo carboxila da fenilalanina e do grupo hidroxila fenólica da isocumarina, respectivamente. OTA produz uma fluorescência verde-azulada quando excitados por luz ultravioleta (366 nm) que muda para uma fluorescência azul escuro quando exposta a vapores de amoníaco, $NaHCO_3$ ou $NaOH$. As propriedades de fluorescência são comumente usadas para fins de detecção e identificação em Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS) pode ser utilizada para detectar a OTA. A identidade de OTA pode ser confirmada através da conversão para o éster metílico, e/ ou para $OT\alpha$ utilizando carboxipeptidase A. OTA é altamente solúvel em solventes orgânicos polares, solúvel em carbonato de hidrogênio e sódio aquoso e ligeiramente solúvel em água (ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2010).

3.1.1 Fungos Produtores

Um grande número de espécies de *Aspergillus* é conhecido por serem produtores de OTA. Alguns fungos da espécie *A. ochraceus* foram reclassificados com um nome científico diferente, como *A. westerdijkiai*, e muitas outras cepas de *A. ochraceus* como *A. steynii* (ABRUNHOSA, PATERSON, VENÂNCIO, 2010). Essas duas novas espécies de *Aspergillus sp.* tem sido consideradas as principais espécies produtoras, uma vez que produziram maiores níveis de OTA em relação ao *A. ochraceus*, considerado como principal produtor por um longo período de tempo (CAST, 2003; GIL-SERNA et al., 2011).

A. westerdijkiai, *A. steynii* e *A. ochraceus* são considerados os principais produtores de OTA pertencentes à seção *Circumdati*, apresentam crescimento em temperaturas entre 24 - 31 °C e altos valores de atividade de água a_w (0,95 – 0,99) (CABAÑES et al., 2008; GIL-SERNA et al., 2011).

O segundo grupo de *Aspergillus* ocratoxigênicos é *Aspergillus* seção *Nigri*, sendo o *A. carbonarius* o principal produtor de OTA do grupo. Foi relatado que em temperaturas entre 20 – 35 °C e a_w de 0,98, ocorre crescimento e produção de OTA por *A. niger* e *A. carbonarius* em milho em apenas 5 dias (ALBORCH et al, 2011).

Espécies de *Penicillium* também produzem OTA, sendo *P. verrucosum* e *P. nordicum* os maiores produtores, as condições ótimas de crescimento e produção de OTA é temperatura de 20° C e a_w de 0,95. Estas condições são encontradas geralmente em regiões de clima temperado, como o Norte da Europa e o Canadá e ocasionalmente na região do Mediterrâneo, como Espanha, Itália, França e Portugal (CAIRS-FULLER; ALDRED; MAGAN, 2005).

3.1.2 Ocorrência Natural

As espécies de *Aspergillus* ocratoxigênicos, como *A. westerdijkii*, *A. steynii*, *A. ochraceus* e *A. carbonarius*, contaminam principalmente produtos tropicais e subtropicais (CABAÑAS et al., 2008; GIL-SERNA et al., 2011). As espécies de *Penicillium* ocratoxigênicos, como *P. verrucosum* e *P. nordicum*, contaminam cereais produzidos em regiões de clima temperado, principalmente os cereais armazenados que não foram adequadamente secos (ALDRED; CAIRS-FULLER; MAGAN, 2008).

Os alimentos nos quais já foram detectados OTA são os cereais (milho, trigo, arroz, sorgo, cevada, aveia e centeio) (DUARTE; LINO; PENA, 2010; LIM et al., 2015; SUN et al., 2017), produtos derivados de cereais (pão, farinha e massa) (SHEN et al., 2014), vinho (QUINTELA et al., 2013; FREIRE et al., 2017), produtos lácteos (leite e queijo), carne (porco, peixe e aves), ovos (DAI et al., 2014), frutas (uvas, maçãs, pêssegos, peras, morangos, laranjas, melancias, mangas e figos) (MARIN, TARANU, 2015; FREIRE et al., 2017), legumes (inhame, alho, cebola, batata e tomates) (PFOHL–LESZKOWICZ; MANDERVILLE, 2007; ZHAO et al., 2017), grãos (grãos de café, amendoim, grão de bico e soja) (PFOHL–LESZKOWICZ; MANDERVILLE, 2012; WANG et al., 2017), produtos secos (grãos secos, carne seca e uvas passas), nozes, semente de gergelim, especiarias (ABRUNHOSA, PATERSON, VENÂNCIO, 2010; BUI–KLIMKE, WU, 2015), cereais infantis (CAPPOZZO et al., 2017) e fórmulas infantis à base de leite (RAIOLA et al., 2015; ZHAO et al., 2017).

A concentração máxima de OTA, de acordo com os estudos de 2006 até 2016, foi de 1.164 $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ em grãos de cereais crus e com uma incidência de 29% (LEE, RYU, 2017). Portanto, é difícil evitar completamente a contaminação de OTA nos alimentos.

A ocorrência de OTA não é restrita somente a matérias-primas, mas inclusive,

nos alimentos processados, devido a estabilidade térmica da micotoxina (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007). No entanto, as concentrações da micotoxina encontradas nos alimentos processados são mais baixas em relação às concentrações encontradas na matéria prima, uma vez que algumas etapas do processamento podem contribuir ativamente para a eliminação de OTA (ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2010).

A OTA também é encontrada na ração, em concentrações superiores a encontrada nos alimentos. Etapas do processamento, como por exemplo, a extrusão pode contribuir para reduzir as concentrações, no entanto, outras práticas podem aumentar a concentração de OTA na ração, como o uso de alguns subprodutos derivados do processamento de cereais, tais como grãos quebrados, a falta de limpeza dos cereais, trigo e farelo de milho. Muitas vezes estas são as frações mais contaminadas com OTA, e geralmente direcionadas para a ração animal. Além disso, é uma prática comum direcionar os produtos com baixa contaminação por OTA para a alimentação humana, enquanto que a maior parte contaminada é destinada a produção de ração (SCUDAMORE; BANKS; GUY, 2004; SCUDAMORE, 2005).

A ração animal contaminada com OTA também representa um risco à saúde humana, devido ao consumo de alimentos de origem animal. Produtos como carne de frango e suíno, salsichas e leite também podem estar contaminados devido à transferência de OTA para os tecidos dos animais (DUARTE; LINO; PENA, 2011).

3.1.3 Efeitos Toxicológicos

OTA é a mais tóxica e relevante entre as ocratoxinas conhecidas. No entanto, alguns consideram que OTC é igualmente tóxica à OTA, já que, quando ingerida, é convertida rapidamente em OTA, que se torna disponível na corrente sanguínea (PFOHL-LESZKOWICZ; MANDERVILLE, 2007).

Em 1993, a OTA foi classificada como um carcinógeno pertencente ao grupo 2B (possível carcinógeno humano) pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 1993). É conhecido que a OTA é um poderoso carcinógeno para roedores e aves (BONDY et al., 2015), no entanto, são escassas as evidências epidemiológicas em seres humanos (BUI-KLIMKE; WU, 2015).

Em vários experimentos com animais e células, foi observado que a exposição à OTA pode resultar em vários efeitos toxicológicos, como o rompimento da

homeostase da microbiota intestinal (LIEW; MOHD-REDZWAN, 2018), teratogenicidade, carcinogenicidade (PFOHL–LESZKOWICZ; MANDERVILLE, 2012), mutagenicidade, hepatotoxicidade (ZHENG et al., 2013; QI et al., 2014), genotoxicidade (PFOHL–LESZKOWICZ; MANDERVILLE, 2007), imunotoxicidade (MARIN; TARANU, 2015), embriotoxicidade (HONG et al., 2000), neurotoxicidade (BHAT et al., 2016), toxicidade testicular (SCHWARTZ, 2002), danos na barreira hematoencefálica (JACKSON; RYU, 2017) e especialmente nefrotoxicidade (ZHAO et al., 2017).

O principal órgão alvo da OTA é o rim (ZHANG et al., 2014). Embora exista pouca evidência epidemiológica humana, pode haver uma associação entre exposição à OTA e nefropatia endêmica dos Balcãs (BEN), nefropatia intersticial crônica (CIN) e outras doenças renais (BUI-KLIMKE; WU, 2015; ZHAO et al., 2017).

Os efeitos tóxicos da OTA são atribuídos principalmente à diminuição do metabolismo das proteínas. A estrutura da OTA é similar à molécula de fenilalanina e, consequentemente, compete com a fenilalanina pelos sítios de ligação das enzimas fenilalanina – tRNA sintase e da fenilalanina hidroxilase, inibindo a síntese de proteínas, causando a perda de peso, redução da conversão alimentar, diminuição da produção de ovos, entre outros. Esta competição também causa hipoproteïnemia e hipoalbuminemia, ainda mais agravadas pela depleção renal de albumina causada pelos danos renais relacionados à OTA. A alteração do metabolismo das proteínas eventualmente pode causar um aumento da suscetibilidade a várias infecções. Além disso, devido à inibição da síntese de proteínas, a OTA também afeta indiretamente a atividade de várias outras enzimas, como a fosfoenolpiruvato carboxilase citosólica, enzima chave na gliconeogênese, alterando o metabolismo dos carboidratos (DUARTE; LINO; PENA, 2011; RINGOT et al., 2006).

A toxicocinética e a toxicodinâmica são os fatores que determinam a toxicidade da OTA (RINGOT et al., 2006). Ao ser ingerido, a OTA é absorvida pelo trato gastrointestinal, e ao atingir a corrente sanguínea é ligada, em mais de 99%, a proteínas plasmáticas (principalmente a albumina - BSA). OTA é considerada como um composto tóxico acumulativo, pois é facilmente absorvida através do estômago e do intestino delgado, mas dificilmente eliminada através da via biliar e vias urinárias. As meias-vidas orais de OTA são 35,5 dias para os seres humanos, 21 dias para macacos, 72-120 horas para porcos, 55-120 horas para ratos e 40 horas para os camundongos. A elevada meia-vida de eliminação observada em algumas espécies é

devido à forte afinidade de OTA pelas proteínas séricas, que limitam a sua transferência a partir do sangue para as células hepáticas e renais (ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2010).

O mecanismo de toxicidade e carcinogenicidade de OTA não está totalmente esclarecido e existem resultados controversos sobre o mecanismo de ação (MALLY et al., 2005). De acordo com Aleo, Wyatt e Schnellmann (1991), a nefrotoxicidade da OTA pode estar relacionada com a disfunção mitocondrial que causa escassez de energia gerando espécies reativas de oxigênio. Em ratos, a nefrotoxicidade foi caracterizada por poliúria e alterações histopatológicas nos epitélios dos túbulos proximais, sendo que a patologia de OTA é geralmente restrita à medula externa e consiste na desorganização do arranjo dos túbulos e na degeneração celular (MALLY et al., 2005).

A concentração de OTA nos tecidos e no sangue depende da espécie animal, da dose administrada, da composição da alimentação, bem como do estado de saúde do animal. Os principais tecidos nos quais a OTA se acumula são rim, fígado, músculo, tecido adiposo e também tem sido encontrada no leite (FERRUFINO-GUARDIA et al., 2000; RINGOT et al., 2006).

A toxicidade de OT α ainda é pouco conhecida. No entanto, alguns estudos indicam que é essencialmente não-tóxica. Por exemplo, OT α foi ineficaz como imunossupressor quando testada em camundongos e foi considerada mil vezes menos tóxica do que a OTA em culturas de células cerebrais. Além disso, OT α tem uma meia-vida de 9,6 h em ratos, o que é bem inferior a de OTA (103 h). Portanto, os processos que levam à conversão de OTA em OT α contribuem substancialmente para reduzir os efeitos tóxicos de OTA e, portanto, são consideradas vias para a detoxificação de OTA (LI et al., 1997; ABRUNHOSA, PATERSON, VENÂNCIO, 2010).

A dose diária tolerável de OTA recomendada pela Organização Mundial da Saúde é de 5 ng OTA / kg de peso corporal / dia, além disso, recomenda-se que os níveis de OTA em alimentos e rações sejam reduzidos conforme as possibilidades técnicas (PFOHL-LESZKOWICZ; MANDERVILLE, 2007; ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2010).

3.2 CONTROLE BIOLÓGICO DE FUNGOS PRODUTORES DE OTA COM A APLICAÇÃO DE LEVEDURAS ANTAGONISTAS

O controle biológico consiste na utilização de agentes vivos para controlar pragas ou patógenos de plantas. Esta abordagem é considerada pela comunidade científica como uma alternativa confiável à utilização de agrotóxicos no campo e na fase pós-colheita, além de que esta estratégia biológica é muito importante para se controlar o crescimento de fungos em cereais e grãos, bem como minimizar a contaminação por micotoxinas (BLEVE et al., 2006).

A aplicação de leveduras tem grande potencial na redução do dano econômico causado por fungos toxigênicos na agricultura. Algumas leveduras podem atuar como agentes de biocontrole, inibindo o crescimento de fungos filamentosos. Essas espécies também podem ganhar importância na preservação de produtos e na redução da contaminação por micotoxinas (PFLIEGLER; PUSZTAHELYI; PÓCSI, 2015). Prevenir a ocorrência de fungos toxigênicos é a maneira mais simples de evitar a contaminação por micotoxinas. Nas duas últimas décadas, as leveduras tornaram-se ferramentas primárias na pesquisa de biocontrole (depois das bactérias) porque muitas espécies mostram propriedades antagonistas promissoras contra os fungos filamentosos comuns que contaminam os frutos, legumes, grãos ou carnes, e muitas dessas espécies se enquadram na categoria de fungos toxigênicos (LIU et al., 2013; KABAK; DOBSON, 2009).

As leveduras são estudadas como agentes de biocontrole devido às suas características que as tornam eficazes quando aplicadas em produtos agrícolas frescos, bem como outros alimentos. Leveduras são tolerantes a condições ambientais extremas, prevalecendo antes e depois da colheita, por exemplo, resistem em baixas e altas temperaturas, dessecação, ampla faixa de umidade relativa, baixos níveis de oxigênio, flutuações de pH e radiação UV. Além disso, as leveduras se adaptam facilmente a microambientes como os das frutas (alta concentração de açúcar, alta pressão osmótica e baixo pH). As leveduras podem crescer rapidamente em substratos baratos em fermentadores e são, portanto, fáceis de produzir em grandes quantidades. Além disso, elas não produzem esporos alergênicos ou micotoxinas, ao contrário dos fungos filamentosos, e possuem exigências nutricionais que lhes permitem colonizar superfícies secas por longos períodos de tempo (LIU et al., 2013; SPADARO; DROBY, 2016).

As características antagônicas de leveduras contra fungos filamentosos podem ser principalmente atribuídas à competição por nutrientes e espaço, secreção de compostos antifúngicos, parasitismo e formação de biofilme (LIU et al., 2013).

Frequentemente, mais de um mecanismo de ação antagonista está envolvido e compreender esses modos de ação é muito importante para o desenvolvimento de biofungicidas relevantes e com formulações apropriadas (SPADARO; DROBY; 2016).

Competição por nutrientes (por exemplo, carboidratos, nitrogênio, oxigênio) e espaço é considerada o principal modo de ação de leveduras antagonistas contra patógenos fúngicos pós-colheita. A competição pode ser um mecanismo eficaz de biocontrole quando o antagonista está presente em quantidades suficientes e é capaz de usar recursos limitados de forma mais eficiente que o patógeno. Leveduras e algumas bactérias podem competir com sucesso contra o patógeno no local da ferida em frutas ou *in vitro* para limitar os fatores nutricionais, inibindo o crescimento do patógeno, mas muitas vezes deixando-o vivo (ZHANG et al., 2010). Na competição por espaço, as leveduras costumam ter a vantagem do crescimento rápido e formação de uma cápsula extracelular de polissacarídeo que pode promover a adesão à superfície da fruta e formar biofilmes cobrindo toda a área da ferida (SPADARO; DROBY, 2016).

Leveduras podem produzir compostos antifúngicos, como toxinas Killer, peptídeos e metabólitos antibióticos (SELITRENNIKOFF, 2001). Algumas leveduras com um fenótipo Killer produzem proteínas extracelulares designadas como toxinas Killer ou proteínas Killer, que são letais a células microbianas sensíveis pertencentes a mesma espécie ou a uma espécie diferente, mas são imunes a toxinas Killer produzidas por elas mesmas. Os exemplos mais estudados são as toxinas K1, K2 e K28 de *S. cerevisiae* (BREINIG; TIPPER; SCHMITT, 2002).

Leveduras capazes de produzir compostos orgânicos voláteis (COVs) com ação antifúngica apresentam potencial para serem aplicadas como agentes de biocontrole. *Pichia anomala*, quando aplicado em feridas de frutas, inicialmente pode consumir grande parte do oxigênio disponível, mas depois, durante a fase estacionária, pode usar a fermentação alcoólica para produzir COVs antifúngicos, como etanol ou acetato de etila (KWASIBORSKI et al., 2014), que poderia estar envolvido na atividade antimicrobiana contra *B. cinerea* (FREDLUND et al., 2004). *Candida intermedia* foi capaz de suprimir a germinação de conídios e crescimento micelial de *B. cinerea* em morangos devido a produção de uma variedade de COVs, incluindo 2-etil-1-hexanol (HUANG et al., 2012).

O parasitismo é um modo de ação antagonista apresentado por algumas leveduras contra fungos filamentosos no qual esta se alimenta do patógeno,

resultando em uma destruição direta ou lise de propágulos fúngicos e estruturas. A produção de hidrolases como as glucanases, chitinases e proteases contribuem para que leveduras possam clivar a parede celular de fungos e danificar a estrutura de hifas (SPADARO; DROBY, 2016).

Alguns estudos relacionaram diretamente a inibição de fungos toxigênicos por leveduras com a diminuição dos níveis de micotoxinas em diferentes alimentos ou em condições de laboratório. Armando et al. (2013) observou que leveduras *S. cerevisiae* foram eficazes na inibição do crescimento de *A. carbonarius* e *Fusarium graminearum* e na detoxificação de OTA, zearalenona (ZEA) e desoxinevalenol (DON) sob condições de laboratório. Velmourougane et al. (2011) relataram que *S. cerevisiae* inibiu o crescimento dos fungos *A. ochraceus* e *A. niger* e contaminação por OTA no café. Blevé et al. (2006) relataram que leveduras isoladas de uvas *Issatchenkia orientalis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Issatchenkia terricola* e *Candida incommunis* diminuíram o crescimento de *A. carbonarius* e *A. niger* em uvas. Outras leveduras como *Hanseniaspora uvarum*, *P. anomala* e *P. kluyveri* produziram COVs que inibiram o crescimento de *A. ochraceus* e produção de OTA durante o processamento do café (MASOUD; POLL; JAKOBSEN, 2005).

Alguns produtos a base de leveduras estão disponíveis comercialmente e são aplicados como agentes de biocontrole em frutas e cereais nas fases pré e pós colheita contra fungos toxigênicos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, por exemplo, os produtos Aspire® e NEX0101® são constituídos a base da levedura *Candida oleophila* e Yield Plus® foi produzido a partir de *Cryptococcus albidus* (PFLIEGLER, PUSZTAHELYI, PÓCSI, 2015). Outras leveduras que também são bem conhecidas quanto ao potencial como agentes de biocontrole são *Cryptococcus laurentii*, *M. pulcherrima* and *P. guilliermondii* (OLIVEIRA et al., 2015).

3.3 ESTRATÉGIAS PARA A DETOXIFICAÇÃO DE OTA

Várias estratégias podem ser empregadas para reduzir os níveis de OTA nos alimentos e rações. Os métodos mais importantes são os preventivos uma vez que evitam, primeiramente, a contaminação das matérias-primas. O uso de boas práticas agrícolas, variedades de culturas resistentes a fungos, a aplicação correta de fungicidas e o armazenamento adequado dos produtos, são medidas comuns que

poderiam contribuir para minimizar os níveis de micotoxinas (ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2010).

Os procedimentos de descontaminação ou detoxificação podem ser utilizados para eliminar ou reduzir os níveis de OTA. Estas medidas, que são tecnologicamente diversificadas, são geralmente classificadas em física, química ou biológica e tem como finalidade destruir, modificar ou adsorver micotoxina (AMEZQUETA et. al., 2009).

Quando a contaminação não pode ser evitada, é necessária a detoxificação antes do uso das matérias-primas para fins de alimentação humana ou animal. Qualquer que seja a estratégia de detoxificação usada, ela deve atender alguns critérios básicos (RODRIGUEZ, MAHONEY, 1994; BEAVER, 1991):

- A micotoxina deve ser inativada ou destruída por transformação para compostos não tóxicos;
- Esporos de fungos e micélios devem ser destruídos, para que novas toxinas não sejam formadas;
- Os produtos destinados à alimentação humana ou animal devem manter o seu valor nutritivo e permanecer com palatabilidade;
- As propriedades físicas da matéria-prima não devem mudar significativamente, e devem ser economicamente viáveis, ou seja, o custo de detoxificação deve ser inferior ao valor da mercadoria contaminada.

3.3.1 Métodos Físicos

Os métodos físicos consistem de segregação, limpeza e processos que visam retirar as frações mais contaminadas dos produtos. Eles também podem envolver a utilização de adsorventes (ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2010).

O tratamento térmico é um método físico pouco eficaz na detoxificação de micotoxinas, uma vez que são compostos muito estáveis e difíceis de serem degradados por calor. O nível inicial de contaminação, o tipo de micotoxina e sua concentração, a temperatura e o tempo de aquecimento, teor de umidade e pH do alimento, todos esses fatores desempenham um papel significativo na degradação da micotoxina (JARD et al., 2011). Foi observado em estudos anteriores que tratamentos térmicos não afetam a concentração de OTA (GAMBUTI et al., 2005; ROUSSEAU, 2004).

A extrusão é um método que permite a degradação de micotoxinas como Aflatoxinas, Desoxinevalenol (DON), Zearalenona (ZEA) e Fumonisina B1 (FB1) e estas podem ser removidas do milho (RUSTOM, 1997; CAZZANIGA et al., 2001; VOSS et al., 2008). No entanto, este método implica em modificações moleculares tais como desnaturação de proteínas e inibição de atividade enzimática.

A maioria das micotoxinas tem estruturas moleculares complexas e muitas vezes não são afetadas por radiação. Micro-ondas podem reduzir o conteúdo de aflatoxina em amendoins (FARAG et al., 1996) e também de tricotecenos em milhos (SCOTT, 1998).

A técnica mais usada para minimizar a exposição à micotoxinas, e diminuir sua biodisponibilidade, é a aplicação de agentes que se ligam a micotoxinas conhecidos como adsorventes. Estes reduzem sua absorção e consequente distribuição para o sangue e órgãos alvos. Os adsorventes são eficientes quando complexados com as micotoxinas e permanecem estáveis no trato digestório animal, sendo eliminados pela urina ou fezes. A estabilidade da ligação entre o adsorvente e a micotoxina depende das propriedades químicas e físicas de ambas as moléculas. Importantes critérios devem ser utilizados para avaliar diferentes adsorventes de micotoxinas, como a eficiência em diferentes níveis de pH e a carga total da molécula, as características físicas do adsorvente incluindo tamanho de poro, superfície de contato e tamanho molecular do adsorvente (JARD et al., 2011). Por outro lado, as características das micotoxinas, como polaridade e solubilidade também desempenham um papel importante na adsorção (HUWIG et al., 2001).

Os adsorventes podem ser classificados como polímeros orgânicos e inorgânicos. Os polímeros inorgânicos incluem as argilas, quimicamente compostas por silicatos e aluminosilicatos. Este grupo de adsorventes inclui uma grande variedade de produtos como aluminossilicato hidratado de cálcio e sódio (HSCAS), filossilicatos, bentonitas e zeolitas (origem vulcânica), e montmorillonitas (HSCAS hidratado de magnésio) (JOUANY, 2007). Outro tipo de adsorvente inorgânico com alta eficiência na ligação com micotoxinas é o carvão ativado, que é um pó não solúvel formado por pirólise de diferentes tipos de materiais orgânicos. Devido à sua grande área de superfície de contato e a sua porosidade, o carvão ativado possui excelente capacidade de adsorção a várias substâncias tóxicas, além de aumentar sua eliminação direta (JARD et al., 2011).

Em trabalhos anteriores foi observado que o carvão ativado pode remover uma quantidade significativa da concentração de OTA em vinho (QUINTELA et al., 2013). Var, Kabak e Erginkaya (2008) testaram este adsorvente em vinhos em diferentes concentrações (20, 40 e 100 g. hL⁻¹), tempo de incubação (0, 4 e 24 h) e concentrações de OTA (5, 10 e 20 ng. mL⁻¹). Estes autores observaram que a capacidade de adsorção do carvão ativado variou entre 13 e 98% dependendo das concentrações do carvão ativado e da micotoxina, em conjunto, e com o período de incubação aplicado. De acordo com o regulamento (EC) N° 1493/1999 a utilização de carvão ativado só é permitida para o tratamento de vinhos brancos (EC, 1999). Por outro lado, uma pesquisa concluiu que um carvão ativado preparado a partir de pedras de cereja por ativação com KOH foi capaz de reduzir a concentração de OTA no vinho tinto em até 54%, no entanto, este adsorvente também diminuiu a concentração total de polifenóis, a intensidade da cor e tonalidade em 8%, 6% e 1%, respectivamente (OLIVARES – MARÍN et al., 2009).

Apesar dos adsorventes inorgânicos apresentarem alta eficiência na ligação com micotoxinas, exibem propriedades de adsorção a certos nutrientes e contaminação com metais pesados, não são biodegradáveis e podem acumular-se no ambiente. Devido às desvantagens dos adsorventes inorgânicos em alimentos e rações, a utilização de adsorventes orgânicos, está sendo proposta. Os polímeros orgânicos incluem os derivados de vegetais fibrosos (casca de aveia, farelo de trigo e fibras de alfafa), celulose, hemicelulose, pectina e extratos de parede celular de leveduras. Além do valor nutricional associado, a parede celular de levedura ou seus componentes, são potenciais adsorventes para micotoxinas (JOANNIS-CASSAN et al., 2011; JOUANY, 2007; YANNIKOURIS et al., 2004).

3.3.2 Métodos Químicos

Os métodos químicos consistem na utilização de compostos para destruir micotoxinas: alguns processos utilizam amônia, hidrólise alcalina, bissulfitos e ozônio. Estes são geralmente referidos como eficazes na eliminação de OTA e outras micotoxinas. No entanto, a segurança toxicológica do produto final não é sempre garantida uma vez que alguns resíduos químicos podem permanecer nos produtos e a toxicidade dos produtos de reação formados geralmente não é estudada. Além

disso, há uma redução significativa na palatabilidade e qualidade nutritiva de produtos tratados (ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2010).

Alguns agentes oxidantes como ozônio e o peróxido de hidrogênio foram usados para detoxificação de micotoxinas em alimentos, estes agentes químicos de oxidação podem reagir com numerosos grupos funcionais. Foi relatada a eficácia de um processo chamado Oxygreen usando ozônio em cereais contaminados com OTA, este processo foi capaz de reduzir a contaminação microbiológica e da micotoxina, mas induziu alguns efeitos secundários, tais como adutos de DNA em trigo (JARD et al., 2011).

Agentes redutores, como o ácido ascórbico, NaHSO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, diminuem os níveis de micotoxinas, particularmente aflatoxina B1 (AFB1) e DON (KABAK; DOBSON; VAR, 2006).

A utilização de amônia como processo químico de detoxificação é aplicada principalmente no milho para diminuir os níveis de aflatoxinas em rações (PARK et al., 1988). Este processo é eficaz contra AFB1 quando realizado a alta temperatura e pressão. Um dos produtos de degradação é AFD1, que é menos tóxico do que o AFB1, no entanto, este método é ineficaz contra outras micotoxinas e pode prejudicar a qualidade dos alimentos devido ao excessivo nível de amônia no alimento processado (HUWIG et al., 2001).

3.4 MÉTODOS BIOLÓGICOS PARA A DETOXIFICAÇÃO DE OTA

Os métodos biológicos utilizam microrganismos, que podem biodegradar ou adsorver OTA para detoxificar produtos contaminados ou para evitar os efeitos tóxicos quando micotoxinas são ingeridas. Estas são as tecnologias de escolha para a detoxificação, pois apresentam várias vantagens como a de poder ser mediada por reações enzimáticas. São muito específicas, eficientes e ambientalmente corretas, e preservam a qualidade nutritiva dos alimentos. No entanto, é necessário a não-patogenicidade do microrganismo e a inexistência de toxicidade dos produtos de reação formados (ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2010).

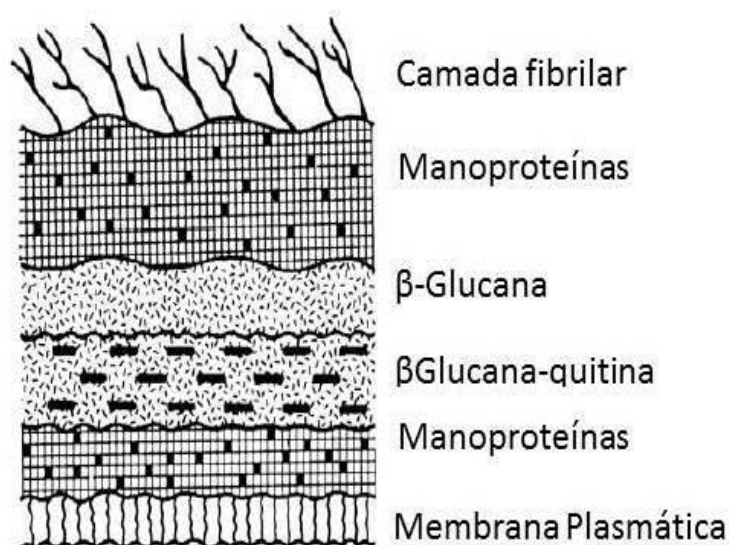
3.4.1 Adsorção de OTA Pela Parede Celular de Leveduras

A parede celular de levedura torna as células capazes de absorver compostos do ambiente. Células viáveis, células não viáveis e produtos de parede celular de leveduras probióticas com alta capacidade de adsorção são capazes de reduzir a biodisponibilidade de toxinas em alimentos e rações. As espécies de levedura diferem na composição da parede celular e, não surpreendentemente, na capacidade de adsorção (PFLIEGLER; PUSZTAHELYI; PÓCSI, 2015).

Aproximadamente 75% do peso seco da parede celular de leveduras são constituídos por polissacarídeos. A superfície da parede é formada por moléculas de β -(1,3)-D-glucanas com alto grau de polimerização, ramificado com cadeias laterais lineares de β -(1,6)-D-glucana e quitina, enquanto que os componentes amorfos da matriz, bem como a camada fibrilar localizada sob a superfície da parede celular, são compostos por manoproteínas (Figura 2). As β -D-glucanas e a quitina são responsáveis pela rigidez da parede celular e definem a morfologia e a forma da levedura (KOGAN; KOCHER, 2007). Com base na composição química e natureza física da parede celular de leveduras, é razoável pensar que a superfície celular apresenta inúmeros sítios para a adsorção física de moléculas. E isto mostra a possível capacidade desses microrganismos em adsorver micotoxinas como a OTA. O mecanismo de adsorção de micotoxinas por parede celular de leveduras não está totalmente esclarecido, porém, estudos demonstram que esta possui diferentes centros de adsorção, ligando-se às micotoxinas por meio de ligações de hidrogênio ou interações iônicas ou hidrofóbicas (JOANNIS-CASSAN et al., 2011).

Os fatores que mais influenciam na capacidade de leveduras em adsorver OTA são os componentes da parede celular. Contudo, há controvérsias entre diferentes pesquisadores sobre quais componentes especificamente seriam responsáveis pelo mecanismo de adsorção, pois os componentes como os glucogalactanos e os b-glucanos, manoproteínas (CARIDI et al., 2012), b-glucanos e mananos (PEREYRA et al., 2015) já demonstraram ser responsáveis pela adsorção de micotoxinas.

Figura 2 - Componentes da parede celular de leveduras



Fonte: Kogan, Kocher (2007)

Algumas leveduras apresentaram diferenças na capacidade de adsorção de OTA em diferentes condições de cultivo (ARMANDO et al., 2012; PIOTROWSKA et al., 2013; CECCHINI et al., 2006). Armando et al. (2012) avaliaram a capacidade de adsorção de OTA por quatro cepas de *S. cerevisiae* em caldo extrato de levedura, peptona e dextrose (YPD), pH 2 e 7, e YPD com 0,5% de sais biliares (pH 7), todos adicionados de 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de OTA. Os resultados mostraram que as cepas de *S. cerevisiae* adsorveram OTA entre 80-82 % em caldo YPD (pH 2), 74-78 % em YPD com 0,5% de sais biliares (pH 7), 56-67 % no caldo YPD (pH 7), indicando que mesmo nas condições gastrointestinais simuladas de mamíferos (YPD com 0,5% de sais biliares, pH 7) as leveduras apresentaram boa capacidade de adsorção de OTA.

Piotrowska et al. (2013) certificaram que duas cepas de *S. cerevisiae* removeram 85,1 e 82,8% de OTA (1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) em suco de uva branca e 65,2 e 10,7% de OTA (1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) em suco de groselha após 10 dias de incubação, respectivamente. Cecchini et al. (2006) verificaram durante os ensaios de vinificação que até 70% da OTA poderiam ser retirados do vinho e que uma percentagem significativa da OTA removida foi encontrada em borras de leveduras. A percentagem de diminuição da OTA durante a fermentação foi entre 46,83% e 52,16% em vinho branco e entre 53,21% e 70,13% no vinho tinto. A ausência de produtos de degradação de OTA sugeriu um mecanismo de adsorção.

A integridade da parede celular também pode estar envolvida na capacidade de adsorção de algumas espécies de leveduras. Péteri et al. (2007) relataram que

células viáveis e mortas de *Phaffia rhodozyma* foram capazes de remover 23 e 45% da OTA ($3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) em 2 h, respectivamente. Fiori et al. (2014) avaliaram a capacidade de adsorção de OTA de diferentes leveduras viáveis e mortas. Os resultados demonstraram que células viáveis e mortas de *Candida friedrichii*, *Candida intermedia*, *Lachancea thermotolerans* e *Cyberlindnera jadinii* poderia adsorver 70, 73, 75 e 0% de OTA ($0,02 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e 72, 74, 84 e 82% da OTA em 8 dias, respectivamente.

A adsorção de OTA por cepas de *Saccharomyces* enológicas foi demonstrada por Bejaoui et al. (2004) que sugerem que estas cepas podem ser utilizadas para a detoxificação de OTA em sucos de uva naturais ou sintéticos. Células após tratamento a quente mostraram maior adsorção 90% quando comparado à utilização de células viáveis (35%), indicando que a ligação de natureza física e a densidade celular desempenham um importante papel na eficiência da adsorção. Neste trabalho também foi observado que o processo de adsorção foi muito rápido, a micotoxina foi ligada a 90% das células de levedura nos primeiros 5 minutos, demonstrando que as leveduras podem ser um potencial agente de detoxificação para a OTA em sucos de uva.

Células mortas por tratamento térmico ou ácido apresentam ser mais eficazes do que leveduras vivas na capacidade de adsorção, como relatado em alguns trabalhos (NUNEZ et al., 2008; BEJAOUII et al., 2004; VAR; ERGINKAYA; KABAK, 2009). No entanto, as células vivas têm um grande potencial e vantagens na adsorção de OTA. As células vivas de leveduras podem ser selecionadas por múltiplas características favoráveis, por exemplo, boa capacidade de fermentação, menos mudanças marcantes em caracteres organolépticos de produtos tratados, efeitos probióticos na ração e biodegradação de toxinas. Além disso, alguns trabalhos já relataram que a aplicação de células de leveduras inativadas pode afetar a qualidade do vinho (NUNEZ et al., 2008).

Schatzmayr et al. (2006) avaliaram o potencial de detoxificação de OTA por *Trichosporon mycotoxinivorans* utilizando um modelo *in vitro* com pedaços de intestino de porco e esta levedura apresentou grande potencial para ser aplicada como aditivo de ração. Devido ao excelente desempenho na detoxificação da OTA, *T. mycotoxinivorans* foi transformado no produto chamado Mycofix^R Plus^{MTVINSIDE} produzida por Biomin GmbH (Áustria) (HANIF et al., 2008). Embora Mycofix^R Plus^{MTVINSIDE} apresente muitas vantagens na detoxificação da OTA, *T.*

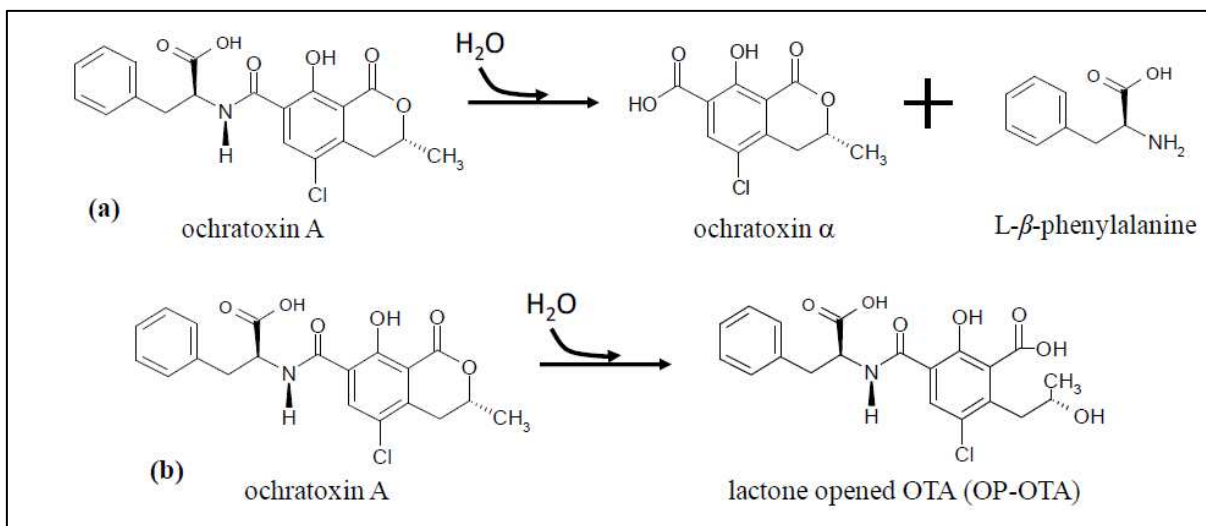
mycotoxinivorans foi reconhecido em 2009 como um novo patógeno humano que está relacionado com a fibrose cística (HICKEY et al., 2009). Portanto, *T. mycotoxinivorans* merece mais investigações para reduzir possíveis efeitos deletérios e deve ser usado com cautela nas indústrias de alimentos ou rações. A aplicação de microrganismos nas indústrias de alimentos e rações deve ser cautelosa, com especial atenção aos riscos para a saúde dos seres humanos e animais (SPANIO, CAPOZZI, 2011; CAPOZZI et al., 2017).

3.4.2 Biodegradação de OTA por Leveduras

A biodegradação é uma das características mais promissoras de leveduras com potencial para serem aplicadas como agentes de detoxificação de OTA. Duas vias podem estar envolvidas na degradação de OTA por microrganismos (Figura 3). Em primeiro lugar, a OTA pode ser biodegradada por meio da hidrólise da ligação amida que liga a molécula de L- β -fenilalanina à porção ocratoxina α . Essa ligação amida é semelhante a uma ligação peptídica, portanto, torna-se suscetível à ação de proteases hidrolíticas, como a carboxipeptidase A, carboxipeptidase PJ_1540, protease A, lipase A, ocratoxinase, etc. (STANDER et al., 2000; ABRUNHOSA et al., 2006; DOBRITZSCH et al., 2014; LIUZZI et al., 2016). Os dois produtos formados (a L- β -fenilalanina e ocratoxina α) são praticamente atóxicos, Rodrigues et al. (2009) relataram que a OT α não é tóxica, ou pelo menos 500 vezes menos tóxica que OTA, portanto, essa via pode ser considerada uma via de detoxificação.

Uma segunda via seria a OTA ser degradada pela hidrólise do anel lactona. Neste caso, a degradação do produto final é a OTA com o anel lactona aberto, que apresenta uma toxicidade semelhante à OTA. A abertura do anel de lactona de OTA é reversível e a micotoxina pode ser regenerada sob condições ácidas. É provável que microrganismos produzam lactonahidrolases que realizam essa transformação (ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2010).

Figura 3 – Vias de biodegradação de OTA. **(a)** hidrólise da ligação amida de OTA; **(b)** hidrólise do anel lactona de OTA.



Fonte: Abrunhosa, Paterson, Venâncio (2010)

Semelhante a outros microrganismos, as leveduras podem degradar e/ou adsorver OTA e esses mecanismos já foram caracterizados. No entanto, como observado na revisão de Abrunhosa, Paterson, Venâncio (2010), nem todos os artigos diferem claramente o mecanismo de detoxificação entre biodegradação e adsorção. A biodegradação de OTA por leveduras já foi associada a várias cepas de *S. cerevisiae* (ANGIONI et al., 2007), e também a algumas leveduras não *Saccharomyces* como *Hanseniaspora* (anamorfo: *Kloeckera*), *Trichosporon*, *Rhodotorula* e *Cryptococcus* spp. (ANGIONI et al., 2007; SCHATZMAYR et al., 2003). *Trichosporon*, *Rhodotorula* e *Cryptococcus* spp. foram capazes de quebrar a ligação amida da molécula de OTA e liberar a OT α não tóxica (SCHATZMAYR et al., 2003).

Péteri et al. (2007) observaram a capacidade de degradação de OTA por isolados de *Phaffia rhodozyma* e *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *P. rhodozyma* CBS 5905 foi capaz de degradar 90% da OTA (7,5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) em 15 dias e adsorver 23% de OTA (3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) em 2 h, respectivamente. Os estudos sobre a degradação da micotoxina indicaram a presença de OT α , e esta degradação é possivelmente mediada por uma enzima relacionada às carboxipeptidases.

Patharajan et al. (2011) observaram, sob condições *in vitro*, que as leveduras *M. pulcherrima* (MACH1), *P. guilliemondii* (M8) e *Rhodococcus erythropolis* (AR14) degradaram a OTA, mas não foi detectado a presença de OT α como metabólito de degradação. Dessa forma os autores concluíram que a OTA foi diretamente degradada em produtos desconhecidos.

3.5 LEVEDURAS NÃO- *SACCHAROMYCES* ENCONTRADAS NATURALMENTE EM ALIMENTOS

Um grande desafio ao explorar o potencial de leveduras não convencionais, especialmente para aplicação no processamento de alimentos, é garantir a biossegurança. O conhecimento sobre leveduras não convencionais é ainda limitado, e a lista de espécies de leveduras aprovadas pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos ou pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos é extremamente restrita (STEENSELS; VERSTREPEN; 2014).

Parece razoável supor que espécies de leveduras que são naturalmente encontradas em processos de fermentação espontânea, cujos produtos são consumidos sem os devidos cuidados com questões de saúde, são geralmente seguras para uso em fermentações controladas ou como aditivos alimentares. No entanto, algumas leveduras isoladas de fermentações espontâneas podem ser consideradas patogênicas para seres humanos e animais. Portanto, novas espécies de leveduras que apresentam uma diversidade potencial para serem aplicadas no processamento de alimentos devem ser cuidadosamente estudadas quanto aos possíveis riscos à saúde (BUDRONI et al., 2017; BASSO; ALCARDE; PORTUGAL, 2016).

Geralmente, na fermentação natural das uvas para a produção do vinho o processo fermentativo é iniciado pelo rápido consumo de glicose por leveduras não-*Saccharomyces* como *H. uvarum*, *Candida stellata*, *C. zemplinina*, e *M. pulcherrima*, a maioria dos quais são freqüentemente associados com a superfície da uva (CIANI et al., 2010; STEENSELS et al., 2014). No cacau, mais de 50 espécies de leveduras foram detectadas durante o processo de fermentação natural, pertencentes a 16 gêneros, mais notadamente *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces* e *Wickerhamomyces* (STEENSELS, VERSTREPEN, 2014). Em estudos anteriores com amostras de café coletadas em diferentes etapas do processamento úmido do café arábica na Tanzânia, três espécies de leveduras predominantes foram isoladas (MASOUD et al., 2004), incluindo *P. anomala*, que foi encontrada em maior quantidade no início da fermentação e durante o processo de secagem, *P. kluyveri*, que predominou durante todo o processo e *H. uvarum* que foi detectada em maior quantidade durante a fermentação, mas diminuiu expressivamente no processo de secagem (MASOUD et al., 2004).

Alguns pesquisadores observaram que várias espécies de leveduras não-*Saccharomyces* encontradas naturalmente durante estes processos fermentativos contribuem na melhoria da qualidade do produto final por liberação de compostos aromáticos que ajudam na qualidade do sabor e aroma dos alimentos (CIANI et al., 2010; BUDRONI et al., 2017). Alguns desses compostos aromáticos inclusive podem ter ação antifúngica contra fungos toxigênicos e contribuir para minimizar a produção de micotoxinas nos alimentos. Masoud et al. (2005) estudaram o efeito dos compostos voláteis produzidos pelas leveduras *P. anomala*, *P. kluyveri* e *H. uvarum* durante o processamento do café e observaram que os principais ésteres e álcoois produzidos pelas três leveduras foram acetato de etila, acetato de isobutila, 2-fenil, etil acetato, propionato de etila e álcool isoamílico e estes ésteres e álcoois individualmente inibiram o crescimento de fungos toxigênicos presentes no café.

3.5.1 *Hanseniaspora opuntiae*

H. opuntiae é uma levedura fermentadora que foi isolada pela primeira vez do arbusto *Opuntia megacantha* no Havaí (CADEZ et al., 2003). É uma espécie de levedura encontrada em solos, frutas e árvores. Essa levedura faz parte do grupo restrito de espécies de leveduras presentes durante a fermentação do cacau, e também já foi isolada durante o processo de fermentação do café e na produção de vinho (PEREIRA et al., 2016; SANTOS et al., 2016).

Embora *H. opuntiae* não apresente uma boa capacidade de produção de etanol durante a fermentação do vinho e tenha um período de fermentação menor, em comparação com *S. cerevisiae*, contribui com características sensoriais, pois desempenha um papel importante na formação de compostos voláteis que contribuem para a aceitação do aroma do vinho (SANTOS et al., 2016).

Varela e Borneman (2014) descrevem o potencial de várias leveduras não-*Saccharomyces*, presentes no estágio inicial do processo de vinificação e destaca os benefícios da aplicação de leveduras do gênero *Hanseniaspora* durante a fermentação das uvas. Essas leveduras contribuem para melhorar o aroma e sabor do vinho, pois produzem as enzimas β -glucosidase e β -xilosidase que podem aumentar a liberação de alguns componentes voláteis durante a fermentação da uva, destacando-se as espécies *H. uvarum* e *H. vineae* com essas características. A espécie *H. opuntiae* destaca-se, principalmente, pelo seu potencial como agente de

controle biológico. Alguns pesquisadores relataram o potencial de *H. opuntiae* para o controle biológico de *B. cinerea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Monilinia fructicola*, *M. laxa* e *Penicillium expansum* (GUZZON et al., 2014; JANISIEWICZ et al., 2014; DE PAIVA et al., 2017; RUIZ-MOYANO et al., 2016).

Pereira et al. (2014) isolou uma cepa de *H. opuntiae* durante a etapa inicial do processo fermentativo de grãos de café arábica, estágio cereja, e observou o potencial dessa levedura em resistir a condições de estresse durante todo o processamento do café como: a capacidade de crescer diante de altas variações de pH (pH 2 a pH 8); tolerância a pressão osmótica (crescimento detectado na presença de até 50% de glicose e frutose); tolerância térmica (habilidade para crescer em temperaturas de 37 a 43°C); e tolerância ao acúmulo de metabólitos (crescimento na presença de 12 a 15% de etanol, 2% de ácido lático e 2% de ácido acético).

No trabalho realizado por Martins et al. (2017) foi observada a produção de uma possível proteína do choque térmico (heat shock protein - HSP) pela levedura *H. opuntiae*, quando em condições de estresse e concentrações de etanol no meio superiores a 3%, indicando que essa levedura é uma das espécies não-*Saccharomyces* mais resistentes a processos fermentativos, e essa proteína poderia servir como um marcador molecular de resistência para estudos posteriores de melhoramento genético de cepas de leveduras fermentadoras.

Avaliando a comunidade microbiana presente em toda a etapa de fermentação e secagem do cacau, Hamdouche et al. (2015) identificaram, através da técnica molecular PCR-DGGE usando o perfil 26S rRNA, a predominância da espécie de levedura *H. opuntiae* em todas as etapas do processamento, desde a etapa inicial da fermentação até a etapa final de secagem dos grãos de cacau.

Além de *H. opuntiae* ser encontrada naturalmente em alguns alimentos (PEREIRA et al., 2016; SANTOS et al., 2016), segundo alguns pesquisadores essa levedura nunca esteve envolvida em infecções humanas (NIARÉ-DOUMBO et al., 2014), indicando que *H. opuntiae* é uma levedura com muito potencial para ser aplicada no processamento de alimentos devido a suas inúmeras qualidades.

3.5.2 *Meyerozyma caribbica*

Meyerozyma é um gênero de levedura anamorfo do gênero *Candida*. O nomeado gênero *Meyerozyma* inclui *C. guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*) e *C. fermentati* (*Meyerozyma caribbica*) e *C. carpophila*, que é uma espécie intimamente relacionada (BRANDT, LOCKHART, 2012). *M. caribbica* foi originalmente isolada da cana de açúcar em Cuba (VAUGHAN – MARTINI et al., 2005). Essa espécie de levedura pode ser encontrada como constituinte da fermentação natural de grãos de cacau (PAPALEXANDRATOU, VUYST, 2011).

M. caribbica foi caracterizada por alguns pesquisadores como uma levedura com atividades antifúngicas e como um potencial agente de biocontrole (BAUTISTA - ROSALES et al., 2013). Essa levedura foi avaliada quanto a sua eficácia contra o fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* em mangas e mostrou um alto potencial antagônico *in vivo*, com significativa inibição de 86,7% do fitopatógeno, apresentando diferentes mecanismos de ação antagonista como a competição por espaço e nutrientes, produção de enzimas hidrolíticas, parasitismo e formação de biofilme (BAUTISTA- ROSALES et al., 2013).

Essa espécie de levedura foi descrita por alguns pesquisadores como sendo não tóxica e, inclusive, já é aplicada na indústria de bebidas alcóolicas para a produção de tequila (SAUCEDO- LUNA et al., 2011) e tchapalo, uma bebida tradicional de sorgo preparada na Costa do Marfim (N'GUESSAN et al., 2011).

3.5.3 *Kluyveromyces marxianus*

K. marxianus é uma levedura que foi originalmente isolada de uvas e recebeu o nome de *Saccharomyces marxianus*, sendo primeiramente descrita em 1888 por E.C. Hansen (LODDER; KREGER, 1952).

K. marxianus é filogeneticamente relacionada a *S. cerevisiae*, e é uma espécie filogeneticamente próxima da mais conhecida *Kluyveromyces lactis* (LACHANCE, 1998; LLORENTE et al., 2000). A principal característica comum de *K. lactis* e *K. marxianus* é a capacidade de assimilar lactose e usar este açúcar como fonte de carbono. Esta característica, ausente em *S. cerevisiae*, faz com que essas leveduras sejam frequentemente isoladas de fontes lácteas, por exemplo, leites fermentados, iogurte e queijos (LANE; MORRISSEY, 2010).

A longa história de associação segura com produtos alimentícios ajudou essas duas leveduras a alcançar o status GRAS (Geralmente Considerado Seguro) e QPS

(Qualificação da Presunção de Segurança) nos Estados Unidos e na União Europeia, respectivamente. Esta designação significa que existem algumas restrições na aplicação e garante o uso potencial dessas leveduras no setor de biotecnologia (LANE; MORRISSEY, 2010; FONSECA et al., 2008).

K. marxianus, tem sido amplamente adotada pela indústria por apresentar características que são desejáveis para aplicações em biotecnologia. Estas incluem a capacidade de assimilar açúcares como a lactose; uma taxa de crescimento extremamente rápida, com tempos de geração de 70 min e termotolerância, com a capacidade de crescer em até 52 °C (LANE; MORRISSEY, 2010, FONSECA et al., 2008).

Várias aplicações biotecnológicas diferentes já foram investigadas com essa levedura, como a produção de enzimas (β - galactosidase, β - glucosidase, inulinase e poligalacturonases, entre outras), produção de compostos aromáticos e etanol, redução do teor de lactose em produtos alimentícios, produção de bioingredientes de soro de queijo, biorremediação, como um agente anticolesterolêmico e como hospedeiro para a produção de proteínas heterólogas (FONSECA et al., 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CEPAS FÚNGICAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As cepas de *A. ochraceus* (IOC 4417, IOC 4462) foram fornecidas pela Coleção de Culturas Micológicas do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. A cepa IOC 4417 foi isolada de um mosquito em Belo Horizonte, Minas Gerais, enquanto a cepa IOC 4462 foi isolada de um inseto pertencente à ordem Hemiptera, no Rio de Janeiro (MORAES et al., 2006).

A. ochraceus (AO 24), *A. westerdijkiae* (AW 91) e *A. carbonarius* (AC 188) foram fornecidos pela Coleção de Culturas Micológicas do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. *A. ochraceus* (AO 14), isolado de grãos de café no estado de São Paulo, é uma cepa produtora de OTA (FUNGARO et al., 2004), *A. westerdijkiae* (AW 91) é uma cepa produtora de OTA isolada de grãos de café no estado do Paraná (SARTORI et al., 2013) e *A. carbonarius* (AC 188) é uma cepa mutante, produtora de OTA, obtida a partir da cepa tipo selvagem (ITAL 187) isolada de grãos de café no estado de São Paulo (LUNARDI et al., 2006).

H. opuntiae, isolado de milho verde e *K. marxianus*, isolado do germe de milho, pertence à Coleção de Culturas Micológicas do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. *M. caribbica*, isolada de amostras de solo de uma reserva natural privada, localizada na Região Norte do Paraná, pertence à Coleção de Culturas Micológicas do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

Para o preparo do inóculo, os fungos foram cultivados em placas de ágar batata dextrose (BDA; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 25 ± 1 °C. As suspensões de conídios de cada fungo foram preparadas recolhendo os conídios de 7 dias de cultivo (crescidos em BDA a 25 ± 1 °C) em água esterilizada com Tween 80 a 0,015% adicionado para auxiliar na dispersão dos conídios em suspensão. As concentrações de conídios foram estimadas por um hemocitômetro e as suspensões foram diluídas para concentrações finais de 1×10^6 conídios. mL⁻¹ para as análises posteriores.

As leveduras foram cultivadas em placas de ágar extrato de levedura, peptona e dextrose (YPD). As células de levedura foram transferidas para caldo YPD e incubadas a 150 rpm, 28 ± 1 °C, durante 48 h, para as análises posteriores.

4.2 TRIAGEM PRELIMINAR PARA A SELEÇÃO DE LEVEDURAS ANTAGONISTAS ISOLADAS DE SOLO E MILHO

Foi realizada uma triagem preliminar *in vitro*, como parâmetro discriminativo, para selecionar somente as leveduras que apresentassem potencial de inibição as espécies de *Aspergillus* ocratoxigênicos. Foi analisado um total de 38 leveduras, isoladas de solo e milho. Para análise foi utilizada a técnica de Walker, Mcleod, Hodgson (1995) com algumas modificações, 1 mL de uma suspensão de conídios, de cada cepa fúngica, contendo 10^6 conídios. mL^{-1} foi inoculado em profundidade com 20 mL de ágar Sabouraud (Sigma-Aldrich). Após solidificação do ágar, uma alça de células de cada isolado de leveduras, previamente cultivados em ágar YPD (por 48 h a 28 °C), foi estriada na superfície do ágar. As placas foram incubadas a 25 °C por 7 dias. O efeito inibitório das leveduras sobre os fungos ocratoxigênicos foi considerado positivo quando observado uma zona clara ao redor da estria das leveduras.

As três leveduras que apresentaram maior potencial antagonista, identificadas como *H. opuntiae* (isolado de milho verde), *M. caribbica* (isolado de solo) e *K. marxianus* (isolado de gérmen do milho), foram selecionadas para as análises posteriores.

4.3 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *A. OCHRACEUS* POR *H. OPUNTIAE*

As contagens de células da levedura foram determinadas com um hemocítômetro e a concentração do inóculo foi ajustada para 1×10^6 e 1×10^7 células. mL^{-1} . Uma alíquota contendo 1 mL da suspensão de células da levedura (1×10^6 e 1×10^7 células. mL^{-1}) foi inoculada em profundidade em placas de Petri com 20 mL de ágar YPD. As placas foram inoculadas no centro com um disco micelial de 8 mm de cada cepa de *A. ochraceus*, cultivadas por sete dias em BDA a 25 ± 1 °C. O diâmetro do crescimento fúngico foi medido no 7º dia. A inibição do crescimento fúngico foi calculada a partir da inibição do diâmetro (ID) pela equação:

$$\text{ID (\%)} = [(C - T)/C] \times 100$$

Onde C (controle) foi o diâmetro médio (em mm) das colônias fúngicas na ausência de *H. opuntiae* e T (tratamento) foi o diâmetro médio (em mm) das colônias

fúngicas nas placas co-cultivadas. O experimento foi realizado em triplicata de acordo com Medina-Córdova et al. (2016), com modificações.

4.3.1 Influência dos Compostos Orgânicos Voláteis Produzidos por *H. opuntiae* Sobre o Crescimento de *A. ochraceus* *in vitro*

O efeito dos compostos orgânicos voláteis produzidos pela levedura no crescimento micelial de *A. ochraceus* foi avaliado aplicando o ensaio de placa de Petri dupla (QIN et al., 2017). As placas de ágar BDA foram inoculadas espalhando 100 µL de suspensão celular de levedura (1×10^9 células .mL⁻¹). Volumes equivalentes de água destilada estéril foram usados nas placas controle. A tampa da placa foi substituída por uma placa base contendo ágar BDA inoculada no centro com um disco de ágar (8 mm) de *A. ochraceus*. As duas placas base foram seladas imediatamente com dupla camada de parafilme e incubadas por 7 dias a 25 ± 1 °C. O experimento foi realizado em triplicata. A inibição do crescimento fúngico foi calculada a partir da inibição do diâmetro (ID) pela equação descrita no item 4.3.

4.3.2 Efeito do Sobrenadante Livre de Células Sobre a Germinação Conidial e Crescimento das Hifas de *A. ochraceus*

Considerando que a levedura possa produzir algumas substâncias antifúngicas que podem inibir a germinação de conídios e o crescimento das hifas de *A. ochraceus*, o sobrenadante livre de células de *H. opuntiae* foi usado para cultivar conídios fúngicos com caldo fresco de YPD, seguido por análise microscópica. O teste foi realizado de acordo com Coelho et al. (2009), com modificações.

H. opuntiae foi ativada em caldo YPD a 28 ± 1 °C por 48 h (150 rpm) e dois tipos de cultivo foram realizados: o cultivo da levedura sozinha e co-cultivada com o fungo. Uma suspensão de células da levedura contendo 1×10^7 células .mL⁻¹ foi inoculada em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de caldo YPD e também foram co-cultivadas com as cepas de *A. ochraceus* (10^6 conídios .mL⁻¹), sob as mesmas condições. Após 72 h de incubação a 25 ± 1 °C (150 rpm), os cultivos foram interrompidos por centrifugação ($6.500 \times g$ por 15 min) e filtrados em membrana estéril (0,22 µm, Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA). Um volume de 5 mL do

sobrenadante estéril foi adicionado a 5 mL de caldo YPD, em frascos Erlenmeyer de 50 mL, e foram inoculadas as cepas de *A. ochraceus* (10^6 conídios .mL⁻¹).

Os cultivos foram incubados a 25 ± 1 °C, 150 rpm por 18 h, e a porcentagem de germinação dos conídios e o crescimento das hifas foram determinados por um microscópio óptico equipado com Motic^R imagens (Advanced 3.2, Motic China Group Co., Ltd.). O controle negativo foi realizado com 10^6 conídios. mL⁻¹ de cada cepa de *A. ochraceus*, sem o sobrenadante livre de células da levedura, e adicionado de água destilada estéril. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição.

A porcentagem de germinação de conídios no cultivo com sobrenadante (X) foi calculada como:

$$X = \frac{\text{Média da germinação conidial no sobrenadante}}{\text{Média da germinação conidial no controle}} \times 100$$

A % de inibição da germinação de conídios foi calculada como $100 - X$. O comprimento das hifas no cultivo com sobrenadante (Y) foi calculado como:

$$Y = \frac{\text{Média do comprimento da hifa no sobrenadante}}{\text{Média do comprimento da hifa no controle}} \times 100$$

A % de inibição do crescimento de hifas foi calculada como $100 - Y$. Cada tratamento foi realizado em triplicata. Os dados de germinação de conídios foram baseados na contagem de 100 conídios por repetição. Os conídios foram considerados germinados quando o comprimento do tubo germinativo era igual ou maior que o comprimento dos conídios. Os comprimentos médios de hifas foram obtidos pela medida de 20 hifas aleatórias (em μm) por repetição. O experimento foi repetido três vezes.

4.3.3 Ação de *H. opuntiae* no biocontrole de *A. ochraceus* em Frutos de Café Pós-Colheita

A capacidade da levedura em inibir o crescimento de *A. ochraceus in vivo* foi avaliada em frutos de café destacados de acordo com Zhu et al. (2015) com algumas modificações.

Frutos de café (*Coffea arabica*), cultivar IPR 107, em estágio naturalmente maduro, foram obtidos do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) em Londrina, Paraná, Brasil. Os frutos do café foram superficialmente desinfetados com hipoclorito de sódio 1% por 2 min e enxaguados duas vezes com água destilada estéril. Em seguida, os frutos de café foram submersos em suspensões de células de levedura contendo diferentes concentrações, 1×10^5 células. mL⁻¹, 1×10^7 células. mL⁻¹ e 1×10^9 células. mL⁻¹, e colocados em uma placa de Petri estéril para secagem. Em seguida, os frutos foram contaminados com as cepas de *A. ochraceus* por imersão dos frutos na suspensão de conídios (10^5 conídios. mL⁻¹). Um controle positivo foi realizado com frutos de café contaminados somente com suspensão de *A. ochraceus* (10^5 conídios. mL⁻¹), para cada cepa analisada.

Cada tratamento consistiu de 10 frutos de café que foram colocados em caixas plásticas sob alta umidade relativa (100%). Foram realizadas três repetições individuais para cada cepa de *A. ochraceus* e as caixas plásticas foram incubadas por 12 dias a 25 ± 1 °C. Os frutos de café contaminados foram contados no dia 1, 3, 6, 9 e 12 e a incidência de deterioração foi calculada de acordo com a equação:

$$\text{Incidência de deterioração (\%)} = \frac{\text{frutos de café deteriorados}}{\text{frutos de café totais}} \times 100$$

Foram determinadas as médias de três experimentos independentes.

4.4 ESTUDO ULTRAESTRUTURAL DO EFEITO ANTAGONISTA DE *H. OPUNTIAE* SOBRE O CRESCIMENTO DE *A. OCHRACEUS* POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

4.4.1 Avaliação da Interação de *A. ochraceus* em Co-Cultivo com *H. opuntiae*

Um volume de suspensão de *H. opuntiae* foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de caldo YPD para obter uma concentração final de 10^7 células. mL⁻¹, juntamente com uma suspensão de conídios de *A. ochraceus* (10^6 conídios. mL⁻¹). Os cultivos foram incubados a 150 rpm, 25 ± 1 °C por sete dias. Após o tempo de incubação, os cultivos foram interrompidos por centrifugação (6500 xg, durante 15 min a 0 °C). O sedimento celular foi coletado para análise por microscopia eletrônica de varredura.

4.4.2 Avaliação do Efeito do Sobrenadante Livre de Células de *H. opuntiae* sobre o Crescimento de *A. ochraceus*

Um volume de 1 mL da suspensão de *A. ochraceus* (10^6 conídios.mL⁻¹) foi inoculada em cultivo contendo o sobrenadante livre de células do cultivo de *H. opuntiae* sozinha e em cultivo contendo o sobrenadante livre de células do co-cultivo da levedura e fungo, como descrito no item 4.3.2. Os cultivos foram incubados a 150 rpm, 25 ± 1 °C por sete dias. Em seguida, os cultivos foram interrompidos por centrifugação (6500 *xg*, durante 15 min a 0 °C). O micélio de *A. ochraceus* foi coletado para análise por microscopia eletrônica de varredura.

4.4.3 Avaliação da Superfície de Frutos de Café

As respostas dos testes (levedura 1×10^7 células .mL⁻¹ e 1×10^9 células .mL⁻¹ co-cultivada com *A. ochraceus* IOC 4417, 10^5 conídios. mL⁻¹) foram selecionadas para o estudo ultraestrutural, após um período de sete dias de incubação. Um pedaço da superfície do fruto de café (1 cm) foi cortado usando uma lâmina de bisturi estéril. O material foi submetido à análise por microscopia eletrônica de varredura.

4.4.4 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A metodologia utilizada foi adaptada de Zhao et al. (2014) e Miguel et al. (2015). As amostras contendo o sedimento celular de *H. opuntiae* e micélio de *A. ochraceus*, e as amostras contendo apenas o micélio de *A. ochraceus* foram fixadas com 2,5% de glutaraldeído a 25 °C, durante a noite, lavadas 3 vezes com tampão fosfato (0,1 M) pH 7,2. As amostras da superfície do fruto de café foram fixadas com 2,5% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído a 25 °C, durante a noite, enxaguadas 3 vezes com tampão de cacodilato de sódio (0,1 M).

Subsequentemente, todas as amostras foram tratadas com 1% de tetróxido de ósmio por 1 hora a 20 ± 1 °C. As amostras foram submetidas a desidratação gradual em concentrações de etanol (70%, 80%, 90% e 100%) durante 15 min cada e secas ao ponto crítico em aparelho de ponto crítico (CPD 030 Critical Point BALTEC Dryer, Leica Microsystems, Liechtenstein). O material foi montado sobre suporte metálico (*stubs*) e metalizado com ouro (Sputter Coater BALTEC SDC 050, Leica

Microsystems, Liechtenstein). A ação antagonista de *H. opuntiae* sobre a estrutura celular de *A. ochraceus* foi visualizada em MEV FEI Quanta 200 do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LMEM) da Universidade Estadual de Londrina.

4.5 INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *ASPERGILLUS* OCRATOXIGÊNICOS POR *H. OPUNTIAE*, *M. CARIBBICA* E *K. MARXIANUS* IN VITRO

As contagens de células das leveduras *H. opuntiae*, *M. caribbica* e *K. marxianus* foram determinadas com um hemocítômetro e a concentração do inóculo foi ajustada para 1×10^6 e 1×10^8 células. mL⁻¹. Um volume de 1 mL de cada suspensão de células de levedura (1×10^6 e 1×10^8 células. mL⁻¹) foi inoculada em profundidade em placas de Petri com 20 mL de agar YPD. As placas foram inoculadas no centro com um disco micelial de 8 mm de cada espécie de *Aspergillus*, cultivadas por sete dias em BDA a 25 ± 1 °C. O diâmetro do crescimento fúngico foi medido no 7º dia. A inibição do crescimento fúngico foi calculada a partir da inibição do diâmetro (ID) pela equação descrita no item 4.3.

4.6 CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE OCRATOXINA A

Para determinar a concentração do padrão de ocratoxina A, foi realizada a calibração de acordo com a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008), utilizando espectrofotômetro UV/VIS. O padrão de Ocratoxina A foi dissolvido em 1 mL de metanol grau HPLC e a absorvância da solução foi determinada a 334 nm, sendo a concentração calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\mu\text{g micotoxina/ml} = \frac{(A \times FC \times MM \times 1000)}{E}$$

Sendo:

A = absorvância

FC = fator de correção do espectrofotômetro

MM = massa molar da micotoxina (ocratoxina A = 403)

E = absortividade molar da micotoxina (ocratoxina A= 6337)

4.7 INFLUÊNCIA DA OTA NA VIABILIDADE DE *H. OPUNTIAE*, *M. CARIBBICA* E *K. MARXIANUS*

O efeito da OTA no crescimento das leveduras foi investigado. Para isso, o caldo YPD foi utilizado para o cultivo de leveduras a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 150 rpm. As leveduras (10^6 células. mL^{-1}) foram incubadas com a adição de 100 ng. mL^{-1} de OTA (Sigma-Aldrich Chemical Co., EUA) e as unidades formadoras de colônias (UFC) foram determinadas antes da adição da micotoxina e após 24 h, 48 h e 72 h de fermentação com OTA. As UFC foram determinadas como se segue: 1 mL do cultivo de cada levedura foi diluído em série em caldo YPD e espalhado na superfície do ágar YPD. As placas foram incubadas a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas e o número de colônias formadas foi contado. As investigações foram realizadas em triplicata para cada levedura juntamente com os controles (sem a adição de OTA) (PATHARAJAN et al., 2011, com modificações).

4.8 ENSAIO DE DETOXIFICAÇÃO DE OTA *IN VITRO* PELAS LEVEDURAS ANTAGONISTAS

O ensaio de detoxificação de OTA foi realizado de acordo com Bejaoui et al. (2004) e Patharajan et al. (2011) com algumas modificações. Um volume de 10 mL de caldo YPD contendo 10, 55 e 100 ng. mL^{-1} de OTA foram inoculados com 100 μL da suspensão celular de *H. opuntiae*, *M. caribbica* e *K. marxianus* contendo individualmente 10^3 , 10^6 e 10^9 células. mL^{-1} e incubados a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 150 rpm. Os cultivos foram interrompidos em intervalos de 5, 10 e 15 dias por centrifugação do cultivo (9620 xg a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min) para obter o extrato livre de células.

4.8.1 Extração de OTA

A ocratoxina A foi extraída do extrato livre de células usando a coluna Ochra TestTM (VICAM, Milfort, MA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Um volume de 5 mL do extrato livre de células foi diluído 1:5 por adição de tampão PBS (10 mM) pH 7,4. Em seguida, 10 mL do extrato diluído foram passados através da coluna de imunoafinidade OchraTest. Depois de lavar a coluna com 10 mL de PBS e 10 mL de água ultrapura, a ocratoxina A foi eluída com 1,5 mL de metanol grau HPLC (1-2 gota/s). O eluato foi seco a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob fluxo de N_2 gasoso e armazenado à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise.

4.8.2 Detecção e Quantificação de OTA

A ocratoxina A foi analisada de acordo com Fujii et al. (2007). Os resíduos da amostra foram dissolvidos em 200 µL de acetonitrila: água (1:1), agitados durante 1 minuto e uma alíquota (20 µL) foi injectada em HPLC. A OTA foi analisada por um sistema HPLC isocrático de fase reversa (bomba Shimadzu LC-10 AD e detector de fluorescência RF-10A XL), utilizando uma coluna C-18 Luna Phenomenex (250 x 4,6 mm, 5 µm, Scharlau, Barcelona, Espanha). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram de 335 e 475 nm, respectivamente. A fase móvel foi acetonitrila: água: ácido acético (99: 99: 2) e a taxa de fluxo foi de 1 mL. min⁻¹. A OTA foi identificada pelo seu tempo de retenção (13 min) de acordo com um padrão obtido da Sigma e quantificada pela medida da área do pico.

A porcentagem de detoxificação da OTA foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Taxa de detoxificação (\%)} = \frac{(C - T)}{C} \times 100$$

Onde:

C = concentração de OTA detectada (ng. mL⁻¹) no controle (sem a levedura);

T = concentração de OTA detectada (ng. mL⁻¹) no extrato livre de células dos testes.

O limite de detecção e o limite de quantificação foram calculados como 3 vezes e 5 vezes o desvio padrão de 7 replicatas do branco de uma amostra (INMETRO, 2007).

4.8.3 Ensaio de Recuperação

Para o teste de recuperação, O caldo de YPD foi contaminado com três concentrações de OTA (1, 5 e 10 ng. mL⁻¹). Após 1 h de incubação a 30 °C e 150 rpm, as amostras foram processadas de acordo com os procedimentos detalhados nos itens 4.8.1 e 4.8.2 para extração e quantificação de OTA. Cada concentração analisada nos testes de recuperação foi realizada em nove repetições.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças nas médias dos testes de inibição do crescimento de *A. ochraceus* por *H. opuntiae* *in vitro* (item 4.3), influência dos compostos orgânicos voláteis (item 4.3.1) e sobrenadantes livre de células de *H. opuntiae* na germinação de conídios e crescimento de hifas de *A. ochraceus* (item 4.3.2), os testes de inibição de *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* e *A. carbonarius* por *H. opuntiae*, *M. caribbica* e *K. marxianus* *in vitro* (item 4.5), e a influência da OTA na viabilidade das leveduras antagonistas (item 4.7) foram avaliadas estatisticamente utilizando ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05$).

A ação antagonista da levedura *H. opuntiae* sobre *A. ochraceus* em frutos de café (item 4.3.3) foi avaliada estatisticamente pelo teste t de Student para amostras simples ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica, versão 7 (Stat Soft, Inc., Tulsa, OK, EUA).

Para analisar o potencial de detoxificação de OTA pelas leveduras *H. opuntiae*, *M. caribbica* e *K. marxianus* *in vitro* foi avaliada a influência de três fatores: tamanho do inóculo da levedura, tempo de incubação e concentração de OTA (item 4.8). A fim de fazer todas as combinações necessárias dos fatores avaliados, foi aplicada a metodologia de superfície de resposta com um delineamento experimental Box and Behnken (1960), Tabela 1. Este delineamento levou ao estudo do efeito dos três fatores em um único bloco de 15 conjuntos de condições teste incluindo 3 pontos centrais. A ordem dos experimentos foi totalmente aleatória. Três níveis foram atribuídos a cada fator, codificados como -1, 0, +1 (Tabela 1). Os efeitos combinados são representados por meio de um modelo polinomial quadrático para cada levedura estudada:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_I + \beta_2 X_T + \beta_3 X_{OTA} + \beta_{11} (X_I)^2 + \beta_{22} (X_T)^2 + \beta_{33} (X_{OTA})^2 + \beta_{12} X_I X_T + \beta_{13} X_I X_{OTA} + \beta_{23} X_T X_{OTA}$$

Onde Y é a resposta detoxificação de OTA expressa em porcentagem (%) e β_0 é um coeficiente constante do modelo. Os coeficientes de regressão (β_1 , β_2 e β_3), (β_{11} , β_{22} e β_{33}) e (β_{12} , β_{13} e β_{23}) representam respectivamente os efeitos lineares, quadráticos e de interação do modelo, estimados por análise de regressão múltipla. X_I (tamanho do inóculo), X_T (tempo de incubação) e X_{OTA} (concentração de OTA) são variáveis codificadas, variando de -1 a +1. A interpretação dos dados baseou-se nos

sinais (efeito positivo ou negativo sobre a resposta) e significância estatística dos coeficientes ($p < 0,05$). Interações entre dois fatores podem aparecer como um efeito antagonista (coeficiente negativo) ou um efeito sinérgico (coeficiente positivo).

Para a validação das equações obtidas no modelo estatístico as condições ótimas preditas por cada equação foram avaliadas experimentalmente em três repetições e a comparação entre os resultados observados e os resultados preditos pelo modelo estatístico foi avaliada pelo teste t de Student para amostras simples.

Tabela 1 - Níveis do planejamento estatístico Box Behnken (3^3) com três pontos centrais, com variáveis codificadas e decodificadas, para avaliar o efeito do tamanho do inóculo da levedura (X_I), tempo de incubação (X_T) e concentração de OTA (X_{OTA}) na detoxificação de OTA pelas leveduras antagonistas *in vitro*.

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas		
	X_I	X_T	X_{OTA}	Tamanho do inóculo (log células. ml ⁻¹)	Tempo de incubação (dias)	Concentração de OTA (ng. ml ⁻¹)
1	-1	-1	0	3	5	55
2	1	-1	0	9	5	55
3	-1	1	0	3	15	55
4	1	1	0	9	15	55
5	-1	0	-1	3	10	10
6	1	0	1	9	10	100
7	-1	0	1	3	10	100
8	1	0	1	9	10	100
9	0	-1	-1	6	5	10
10	0	1	-1	6	15	10
11	0	-1	1	6	5	100
12	0	1	1	6	15	100
13	0	0	0	6	10	55
14	0	0	0	6	10	55
15	0	0	0	6	10	55

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão deste trabalho estão apresentados na forma dos artigos 1 e 2.

Artigo 1 intitulado: **Biocontrol of *Aspergillus ochraceus* by *Hanseniaspora opuntiae* *in vitro* and on coffee fruits**. Elaborado conforme normas da revista Food Microbiology.

Artigo 2 intitulado: **Potential of antagonistic yeasts for biocontrol of ochratoxigenic *Aspergillus* species and optimization of ochratoxin A detoxification**. Elaborado conforme normas da revista Food Microbiology.

Biocontrol of *Aspergillus ochraceus* by *Hanseniaspora opuntiae* *in vitro* and on coffee fruits

Abstract

A. ochraceus is an ochratoxin-producing fungus which contaminates coffee. In this study the antagonistic action of *H. opuntiae* on *A. ochraceus* *in vitro* and on coffee fruits was evaluated. *H. opuntiae* (10^6 and 10^7 cells. mL⁻¹) reduced *in vitro* the fungal growth, from 82% to 87%, when co-cultivated with *A. ochraceus*. The volatile organic compounds (VOCs) and the yeast cell free supernatant (CFS) showed antifungal activity. The VOCs reduced *in vitro* the fungal growth from 62% to 69%, whereas CFS inhibited conidial germination, from 77% to 93%, and hyphae growth, from 54% to 78%. The yeast (10^7 and 10^9 cells. mL⁻¹) applied in coffee fruit delayed fruit decay by *A. ochraceus* until the 9th day, with significant difference ($p < 0.05$) from the controls. Furthermore, short and tortuous *A. ochraceus* hyphae were observed in the micrographs. Based on the results, *H. opuntiae* showed efficacy as biocontrol agent and, to the best of our knowledge, this is the first study on the antifungal activity of *H. opuntiae* on *A. ochraceus* strains in coffee fruits. The antibiosis and competition for space and nutrients were suggested as the main mechanisms of action of this yeast.

Keywords: biological control; antagonistic yeast; coffee; inhibition; food safety; structural analysis

1. Introduction

Brazil is the largest producer and exporter of coffee and the second largest consumer of the product in the world (ICO 2017). Coffee production in 2017 reached two million, six hundred and ninety-eight thousand and two hundred tons of coffee beans and the export profit was US \$ 441 million for an exported volume of coffee beans of 159 thousand tons (National Company of Supply, 2017).

Before coffee is marketed and processed into the final product in the industry, mature coffee fruits undergo post-harvest processing on farms, which can have a direct impact on the cost and quality of coffee. Several fungal species can contaminate coffee during processing and can cause loss of quality, producing odors and unpleasant taste, in addition to producing mycotoxins, mainly ochratoxin A (OTA) (Pereira et al., 2016a; Chalfoun, 2010). In the international coffee trade, one of the required safety indicators

is the minimization of OTA contamination, a toxic secondary metabolite, which was shown to be genotoxic, nephrotoxic, teratogenic and immunotoxic for animals and humans, and possibly carcinogenic for humans (Pfohl-Leszkowicz, Manderville, 2007).

In Brazil, *A. ochraceus* is the most frequently detected OTA-producing fungus in coffee (Batista et al. 2009; Vilela et al. 2010) which causes great economic loss for agricultural producers and for industries due to reducing yields and depreciation of the coffee value. Therefore, preventing the occurrence of toxigenic fungi is the main strategy to prevent mycotoxin contamination (Pfliegler et al., 2015).

Usually the control of coffee contamination is performed by the pesticide application, which poses a serious risk to the environment and to those handling these products. In addition the intensive use of chemicals at the field can cause the gradual emergence of resistant microorganisms (Oliveira et al., 2015). Biological methods which use yeasts have been proposed as a promising approach for fungal control in agricultural products. Besides acting as biocontrol agents inhibiting filamentous fungi growth, yeasts can also gain importance for food preservation and reduction of mycotoxin contamination (Bleve et al., 2006; Chalfoun, 2010; Pfliegler et al., 2015).

Some yeast species have the ideal characteristics to be applied and several biological control products derived from yeasts are available commercially (Droby et al., 2009). The antagonistic species most frequently applied as biocontrol agents are *Aureobasidium pullulans*, *Candida oleophila*, *Cryptococcus laurentii*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* (Oliveira et al., 2015).

H. opuntiae is a fermenting yeast found in soils, fruits and trees (Cadez et al., 2003), and is part of the restricted group of yeast species present during the natural fermentation of coffee, cocoa and grapes (Pereira et al., 2016b; Varela and Borneman, 2017). There are few studies on the antagonistic activity of *H. opuntiae* (Guzzon et al., 2014; Janisiewicz et al., 2014; de Paiva et al., 2017; Ruiz-Moyano et al., 2016) and its mode of action is not well understood.

Considering that several studies have reported occurrence of *A. ochraceus* in coffee (Velmourougane et al., 2006; Velmourougane and Bhat, 2009; Varga et al., 2010), the objective of this study was to evaluate the effect of *H. opuntiae* on biocontrol of *A. ochraceus in vitro* and on coffee fruits, as well as to evaluate the mode of antagonistic action of this yeast.

2. Materials and Methods

2.1. Fungal strains and growth conditions

A. ochraceus strains (IOC 4417, IOC 4462) were provided by the Mycological Culture Collection of the Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil. The strain IOC 4417 was isolated from a mosquito in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, while strain IOC 4462 was isolated from an insect belonging to the order Hemiptera, in Rio de Janeiro (Moraes et al., 2006). *A. ochraceus* strain AO 14 was provided by the Mycological Culture Collection of Department of General Biology, State University of Londrina, Paraná, Brazil, isolated from coffee grains from São Paulo state and is OTA producer (Fungaro et al., 2004).

H. opuntiae strain, isolated from green maize, belongs to the Mycological Culture Collection of the Department of Biochemistry and Biotechnology, State University of Londrina, Paraná, Brazil.

A. ochraceus strains were cultivated on potato dextrose agar slants (PDA; Sigma- Aldrich, St. Louis, USA) at 25 ± 1 °C. Conidia suspensions of *A. ochraceus* were prepared by collecting conidia from 7-day-old colonies (grown on PDA at 25 ± 1 °C) in sterile water with 0.015% Tween 80 added to assist the dispersion of conidia in the suspension. The conidia concentrations were estimated by a hemocytometer and the suspensions were diluted to final concentrations of 1×10^6 conidia. mL⁻¹ for further testing.

H. opuntiae strain was cultivated on yeast extract, peptone and dextrose (YPD) agar slants. The yeast cells were transferred to YPD broth and incubated at 150 rpm, 28 ± 1 °C for 48 h, for further testing.

2.2. *In vitro* inhibition of *A. ochraceus* growth by *H. opuntiae*

The experiment was performed according to Medina-Córdova et al. (2016), with modifications. Yeast cell counts were determined with a hemocytometer and the inoculum concentration was adjusted to 1×10^6 and 1×10^7 cells. mL⁻¹. An aliquot of 1 mL yeast cell suspension (1×10^6 and 1×10^7 cells. mL⁻¹) was poured into Petri dishes with 20 mL YPD agar. The plates were inoculated at the center with a 8 mm mycelial disc of each *A. ochraceus* strain, cultured for seven days on PDA at 25 ± 1 °C. The diameter of fungal growth was measured at 7th day. The experiment was performed in triplicate. The diameter inhibition (DI) was calculated as follows:

$$DI (\%) = [(C - T)/C] \times 100$$

Where C (control) was the average diameter (in mm) of fungal colonies in the absence of *H. opuntiae* and T (treatment) was the average diameter (in mm) of fungal colonies in the cocultured plates.

2.3. Influence of volatile organic compounds (VOCs) produced by *H. opuntiae* on *in vitro* growth of *A. ochraceus*

The effect of the VOCs produced by the yeast on the mycelium growth of *A. ochraceus* was evaluated using the double Petri dish assay (Qin et al., 2017). The PDA plates were inoculated spreading 100 μ L of yeast cell suspension (1×10^9 cells. mL⁻¹). Equivalent volumes of sterile distilled water were used in control plates. The lid of plate was replaced, by a base plate of PDA inoculated with an agar plug (8 mm) from the periphery of an actively growing culture of *A. ochraceus*. The two base plates were sealed immediately with double layer of parafilm and incubated for 7 days at 25 ± 1 °C. The experiment was performed in triplicate. The diameter of fungal growth was measured at 7th day. The diameter inhibition (DI) was calculated as follows:

$$DI (\%) = [(C - T)/C] \times 100$$

2.4. Effect of cell free supernatant (CFS) on conidia germination and growth of *A. ochraceus* hyphae

Considering that yeasts produce some antifungal substances inhibiting *A. ochraceus* conidia germination, the cell free culture of yeast in YPD broth was used to cultivate fungal conidia with fresh YPD broth, followed by the microscopic analysis. The test was performed according to Coelho et al. (2009), with modifications.

H. opuntiae was activated in YPD broth at 28 ± 1 °C for 48 h (150 rpm) and two types of cultivation were performed: (1) only yeast and (2) co-cultured yeast with fungus. A suspension containing 1×10^7 cells. mL⁻¹ was inoculated in 250 mL Erlenmeyer flasks with 50 mL of YPD broth and co-cultured with *A. ochraceus* strains (10^6 conidia. mL⁻¹), under the same conditions. After 72 h incubation at 25 ± 1 °C (150 rpm), the culture was centrifuged (6,500 xg for 15 min) and passed through a sterile membrane (0.22 μ m, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). An aliquot (5.0 mL) of the sterilized supernatant was added to 5 mL of YPD broth in 50 mL Erlenmeyer flasks,

and inoculated with fungal strains (10^6 conidia . mL⁻¹). The Erlenmeyer flasks were incubated at 25 ± 1 °C for 18 h, and conidial germination percentage and hyphae growth were determined by an optical microscope equipped with Motic^R Images (Advanced 3.2, Motic China Group Co., Ltd.). Negative control was performed with 10^6 conidia. mL⁻¹ of *A. ochraceus*, without yeast culture cell free supernatant, and added with 5 mL sterile distilled water. The results were expressed as percent inhibition.

The conidial germination percentage in the culture with supernatant (X) was calculated as:

$$X = \frac{\text{Mean conidia germination in supernatant}}{\text{Mean conidia germination in control}} \times 100$$

Then, the % inhibition of conidia germination was calculated as $100 - X$. The hyphal length in culture with supernatant (Y) was calculated as:

$$Y = \frac{\text{Mean hyphal length in supernatant}}{\text{Mean hyphal length in control}} \times 100$$

Then, the % inhibition of hyphal growth was calculated as $100 - Y$.

Each treatment was performed in triplicate. Conidia germination data was based on counts of 100 conidia per replicate. Conidia were considered germinated when the germ tube length was equal to or longer than the conidia length. The mean hyphal lengths were obtained by measuring 20 random hyphae (in μm) per replicate. The experiment was repeated three times.

2.5. Action of *H. opuntiae* on biocontrol of *A. ochraceus* in postharvest coffee fruits

The capability of the yeast to inhibit *in vivo* *A. ochraceus* growth was evaluated in detached coffee fruits according to Zhu et al. (2015) with some modifications.

Coffee (*Coffea arabica*) fruits, IPR 107 cultivar, in a naturally mature stage, were obtained from the Agronomic Institute of Paraná (IAPAR) in Londrina, Paraná, Brazil. The coffee fruits were surface disinfected with 1% sodium hypochlorite for 2 min and rinsed twice with sterile distilled water. Then, the coffee fruits were submerged in yeast cell suspensions containing different concentrations, 1×10^5 cells. mL⁻¹, 1×10^7 cells. mL⁻¹ and 1×10^9 cells. mL⁻¹, and placed in a sterile Petri dish for drying. In addition, the fruits were contaminated with *A. ochraceus* strains by immersing the fruits in a

conidia suspension (10^5 conidia. mL⁻¹). A positive control was performed with coffee fruits contaminated only with *A. ochraceus* suspension (10^5 conidia. mL⁻¹), for each strain analyzed.

Each treatment consisted of 10 coffee fruits placed in a plastic box under high relative humidity (100%). Three individual replicates for every *A. ochraceus* strain were performed and the plastic boxes were incubated for 12 days at 25 ± 1 °C. The decayed coffee fruits were counted at days 1, 3, 6, 9, and 12 and decay incidence was calculated according to the equation:

$$\text{Decay incidence (\%)} = (\text{decayed coffee fruits} / \text{total coffee fruits}) \times 100$$

The means of three independent experiments were determined.

2.6. Ultrastructural study of the antagonistic effect of *H. opuntiae* on the mycelial growth of *A. ochraceus* by Scanning Electron Microscopy (SEM)

2.6.1. Evaluation of the interaction of *A. ochraceus* in co-cultivation with *H. opuntiae*

An aliquot of *H. opuntiae* suspension was inoculated in 250 mL Erlenmeyer flasks with 50 mL of YPD broth to obtain a final concentration of 10^7 cells. mL⁻¹, along with a suspension of *A. ochraceus* conidia (10^6 conidia . mL⁻¹). The Erlenmeyer flasks were incubated at 150 rpm, 25 ± 1 °C for seven days. After the incubation time the culture was stopped by centrifugation (6,500 xg for 15 min at 0 °C). The cell pellet was collected for scanning electron microscopy analysis.

2.6.2. Evaluation of coffee fruit surface

The test with yeast inoculum 1×10^7 cells. mL⁻¹ and 1×10^9 cells. mL⁻¹ and *A. ochraceus* IOC 4417 (10^5 conidia. mL⁻¹) were selected for the ultrastructural study, after a period of seven day incubation. A piece of the coffee fruit surface (1 cm) was cut using a sterile scalpel blade. The material was submitted to scanning electron microscopy analysis.

2.6.3. Scanning electron microscopy (SEM) analysis

The methodology used was adapted from Zhao et al. (2014). The samples containing the yeast and mycelium cell pellet, and the samples containing only *A.*

ochraceus mycelium were fixed with 2.5 % glutaraldehyde at 25 °C, overnight, rinsed 3 times with phosphate-saline buffer (PBS) (0.1 M), while, the coffee surface samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde at 25 ° C, overnight, rinsed 3 times with sodium cacodylate buffer (0.1 M). Subsequently, all the samples were treated with 1 % osmium tetroxide for 1 h at $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$. The samples were subjected to gradual dehydration at ethanol concentrations (70 %, 80 %, 90 % and 100 %) for 15 min each and dried to the critical point (CPD 030 Critical Point BALTEC Dryer, Leica Microsystems, Liechtenstein). After drying, the samples were glued on stubs using carbon tape and coated with gold (Sputter Coater BALTEC SDC 050, Leica Microsystems, Liechtenstein) and analyzed using a FEI Quanta 200 scanning electron microscope.

2.7. Statistical analysis

Differences in means of *in vitro* inhibition of *A. ochraceus* growth by *H. opuntiae*, influence of VOCs and CFS on conidia germination and growth of *A. ochraceus* hyphae were evaluated statistically using ANOVA followed by the Tukey's multiple-range test ($p < 0.05$). Yeast antagonist action on *A. ochraceus* in coffee fruits was evaluated statistically using Student's t-test for simple samples ($p < 0.05$). Statistical analysis was performed by Statistic software, version 7 (Stat Soft, Inc., Tulsa, OK, USA).

3. Results and Discussion

Several yeast species have shown inhibition effects on ochratoxigenic fungi (Ramos et al., 2010; Ponsone et al., 2011; Armando et al., 2013; Andrade et al., 2014; Fiori et al., 2014). *In vitro* inhibition of *A. ochraceus* growth by *H. opuntiae* is shown in Figure 1. *H. opuntiae* reduced the mycelial growth of the three *A. ochraceus* strains with the inhibition rates ranging from 82 % to 87 %. There was no significant difference ($p > 0.05$) in the yeast antagonistic action at different concentrations (1×10^6 and 1×10^7 cells. mL^{-1}) and between the different *A. ochraceus* strains by the Tukey test (Fig. 1A).

These results suggest that the antagonistic action of *H. opuntiae* on *A. ochraceus* is independent of cell concentration, indicating that yeast possibly produces antifungal compounds that inhibited the growth of *A. ochraceus* in the two concentrations of yeast analyzed (1×10^6 and 1×10^7 cells. mL^{-1}). The antagonistic action of *H. opuntiae* also occurred similarly on the three strains of *A. ochraceus*

analyzed, suggesting that although the strains have different origins and only one of them (AO 14) is proven to produce OTA (Fungaro et al., 2004), the strains were similarly sensitive to *H. opuntiae*. SEM revealed evident morphological alterations caused by yeast-fungus interaction, particularly in fungal structures, with an evident absence of hyphae in relation to the control and abnormal, poorly developed and short hyphae (Fig.1C), compared to control without yeast (Fig. 1B).

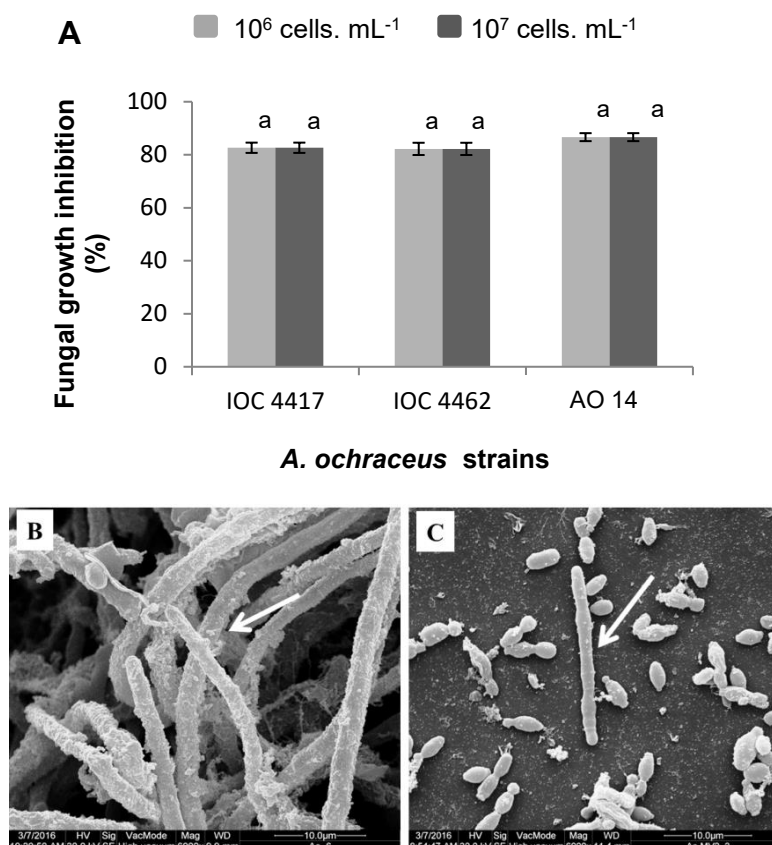


Fig. 1. (A) Antagonistic action of *H. opuntiae* on growth of three *A. ochraceus* strains. Each bar represents the mean $\pm$ standard deviation of three replicates. Letters on the top of each bar represents the results of the Tukey test ($p < 0.05$). **(B)** Scanning electron microscopy (SEM) micrograph of control of *A. ochraceus* (IOC 4417, 10^6 conidia. mL⁻¹), 6000 X. **(C)** Micrograph of *in vitro* co-cultivation of *A. ochraceus* (IOC 4417, 10^6 conidia. mL⁻¹) and *H. opuntiae*, 10^7 cells.mL⁻¹, 6000 X.

Some researchers have reported the potential of *H. opuntiae* for biological control of *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Monilinia fructicola*, *M. laxa* and *Penicillium expansum* (Guzzon et al., 2014; Janisiewicz et al., 2014; de Paiva et al., 2017; Ruiz-Moyano et al., 2016). However, there is no information about the antifungal activity of *H. opuntiae* against *A. ochraceus*.

Among the antifungal compounds produced by *H. opuntiae* against *A. ochraceus* are VOCs. Figure 2 shows the *in vitro* inhibition of *A. ochraceus* growth by *H. opuntiae* via production of VOCs. The inhibition of mycelial growth rate of *A. ochraceus* ranged from 61.9 to 69.2%, but there was no significant difference ($p > 0.05$) in mean inhibition rate by the Tukey test.

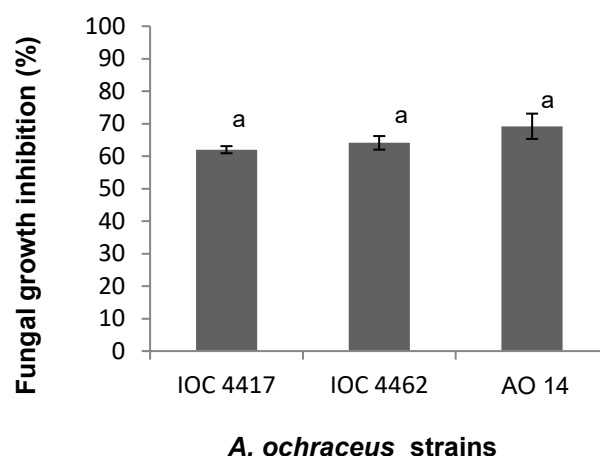


Fig. 2. Effect of the volatile organic compounds produced by *H. opuntiae* on *A. ochraceus* growth (strains IOC 4417, IOC 4462 and AO 14). Each bar represents the mean $\pm$ standard deviation of three replicates. Letters on the top of each bar represents the results of the Tukey test ($p < 0.05$).

The antagonistic action of VOCs produced by *Hanseniaspora* genus has already been reported (Masoud et al., 2005; Qin et al., 2017). Masoud et al. (2005) reported the action of volatile compounds produced by *H. uvarum*, *Pichia anomala* and *P. kluyveri* on *A. ochraceus* growth and OTA production. These authors suggested that the decrease in OTA production could be associated with the reduction of fungal biomass caused by the volatile compounds, mainly ethyl acetate, isobutyl acetate, 2-phenyl, ethyl acetate, ethyl propionate and isoamyl alcohol. Qin et al. (2017) demonstrated that volatile compounds produced by *H. uvarum* inhibited mycelial growth and conidia germination of *B. cinerea* and this antagonistic action could be a synergistic action of the volatile compounds produced by the interaction of yeast, fungus and fruit (strawberries).

The biological control by volatile compounds produced by yeasts has become a promising approach for pathogenic fungi control, as it has been already reported in studies with other yeast species (Fiori et al., 2014; Di Francesco et al., 2015). The production of volatile compounds by yeasts has an important role because their absorption through fungal cell membranes increase the permeability and diffusion of

essential ions and metabolites, resulting in loss of homeostasis (Ando et al., 2012; Di Francesco et al., 2015; Simoncini et al., 2015).

The cell free supernatant (CFS) of *H. opuntiae* and the yeast and fungi co-cultivation also presented antifungal action against *A. ochraceus* (Fig. 3). The CFS of *H. opuntiae* was more effective in inhibiting conidia germination and hyphal growth compared to CFS of co-cultivation of yeast and fungi (Fig. 3), except for the IOC 4417 strain that had no significant difference ($p > 0.05$) in inhibition of hyphal growth between the two types of CFS (Fig. 3B). The best inhibitory effect occurred on conidia germination, ranging from 76.5 - 92.5% among the three *A. ochraceus* strains, when the CFS of *H. opuntiae* was applied. AO 14 ochratoxigenic strain showed the highest sensitivity to the antifungal action of yeast CFS (Fig. 3A).

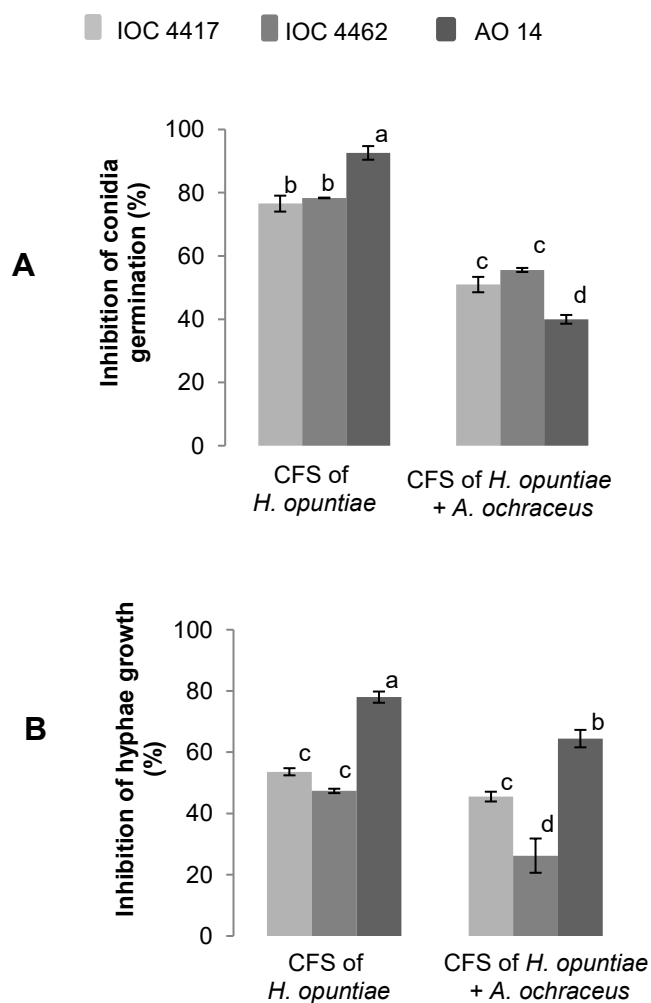


Fig.3. Effect of cell-free supernatant (CFS) from *H. opuntiae* cultivation and the co-cultivation of *H. opuntiae* and *A. ochraceus* on conidia germination (A) and hyphae growth (B) of three *A. ochraceus*

strains. Each bar represents the mean $\pm$ standard deviation of three replicates. Different letters on the top of each bar indicate significant difference by the Tukey test ($p < 0.05$).

H. opuntiae produces extracellular metabolites with antifungal activity against *A. ochraceus* strains, and these metabolites are present in both CFS (Fig. 3 and Fig. 4), suggesting that the production of antagonistic compounds by the yeast is not stimulated by the fungus.

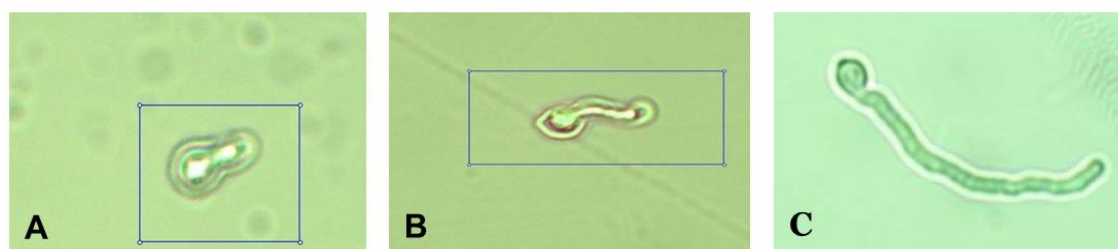


Fig.4. Microscopic analysis of the hyphae length in the treatment of the AO 14 strain with cell free supernatant (CFS) from *H. opuntiae* cultivation (**A**); CFS from the co-cultivation of *H. opuntiae* and *A. ochraceus* (**B**); control of the test (**C**), incubated at 25 ± 1 °C for 18 h and observed by optical microscope, 40 X, equipped with Motic^R Images (Advanced 3.2, Motic China Group Co., Ltd.).

The proposed antifungal action of antagonistic yeasts CFS are the production of killer toxin, characterized as a low molecular mass protein or glycoprotein toxin which kills sensitive yeast and/or fungal strains without cell–cell contact, including toxigenic fungi (Schmitt and Breinig 2002; Weiler and Schmitt, 2003, Coelho et al., 2009), volatile compounds (Fiori et al., 2014) and the production of hydrolases, such as glucanases, chitinases and proteases, which cleave the fungal cell wall, damaging the hyphae structure (Spadaro, Droby, 2016).

The antifungal potential of the *H. opuntiae* CFS opens a promising alternative for the development of a new biofungicide based on extracellular compounds, since the already existing products as biofungicides are based on yeast cells (Aspire®, NEX0101®, Yield Plus®, BoniProtect[™]), making it a possible product with market differential.

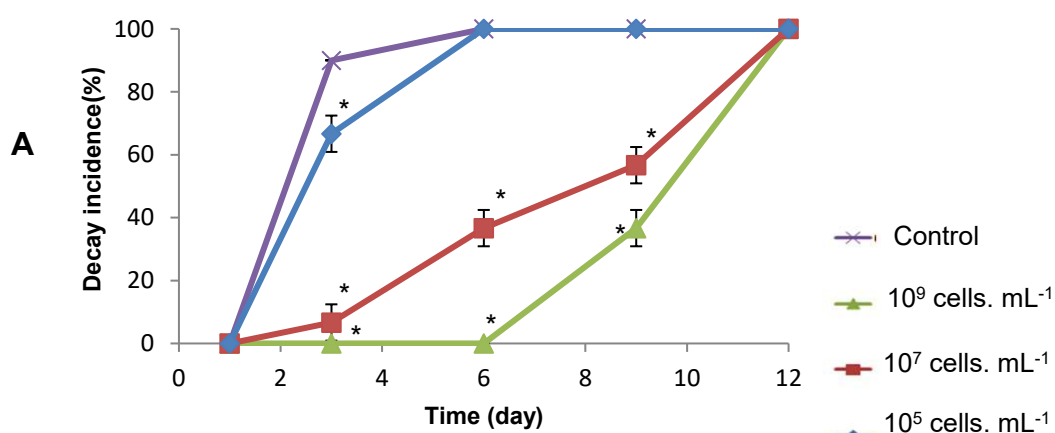
The biological control of *A. ochraceus* using *H. opuntiae* in coffee fruits at cherry stage was carried out, considering that this substrate is commonly contaminated by *A. ochraceus* (Velmourougane and Bhat, 2009).

As shown in Figure 5, *H. opuntiae* showed a significant inhibition on fungal damage caused by *A. ochraceus* in coffee fruits. The presence of yeast in coffee fruits, at 10^7 and 10^9 cells. mL⁻¹, delayed the fruit decay by *A. ochraceus* until the 9th day for

strains IOC 4417 (Fig. 5A) and AO 14 (Fig. 5C), with significant difference ($p < 0.05$) from the controls. The IOC 4462 strain was the most sensitive to the yeast action, because until the 12th day of incubation only 50 % and 36.6 % of the coffee fruits were contaminated by the fungus, when applied yeast at 10^7 and 10^9 cells. mL⁻¹, respectively (Fig. 5B).

The efficiency of *H. opuntiae* in inhibiting *A. ochraceus* growth in coffee fruits was higher in coffee fruits treated with the highest yeast cell concentrations. Zhu et al. (2015) reported that the increased efficiency of inhibition at high yeast cell concentrations indicates that competition for space and nutrients would be the main inhibition mechanism of fungal growth.

Moreover, Velmourougane et al. (2011) evaluated the efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* for biological control of *A. ochraceus* in coffee fruits and demonstrated that the inhibition of fungal growth in *Coffea arabica* was directly proportional to the yeast concentration. Ruiz-Moyano et al. (2016) reported that *H. opuntiae* was able to control the development of pathogenic fungi in post-harvest apples and nectarines, and competition for nutrients was the main mechanism of action involved.



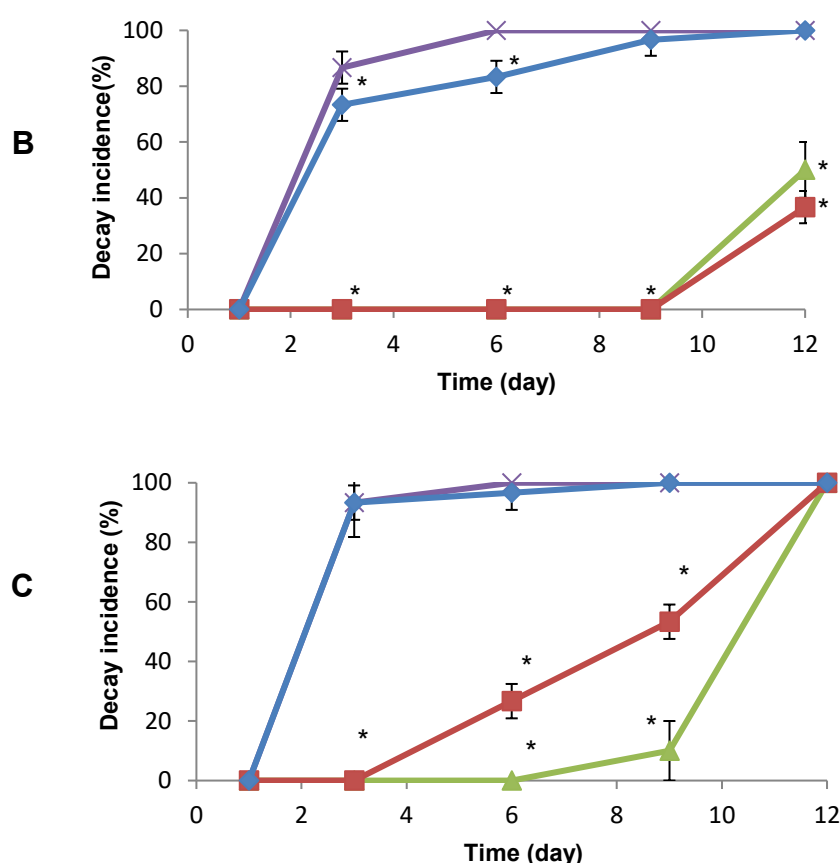


Fig.5. Decay incidence (%) of the coffee cherries inoculated with 10^5 conidia. mL⁻¹ *A. ochraceus* strains IOC 4417(A), IOC 4462 (B), AO 14 (C), added with *H. opuntiae* at 10^5 cells. mL⁻¹, 10^7 cells. mL⁻¹, 10^9 cells. mL⁻¹. Mean values significantly different from the control according to the Student's t-test ($p < 0.05$) are indicated by an asterisk.

The micrographs of the coffee fruit surface (Fig. 6) showed alterations in the structures of the *A. ochraceus* hyphae. In the control of the experiment *A. ochraceus* hyphae showed normal and well developed structures, after seven days of incubation in the coffee fruits (Fig. 6A). However, at 10^9 yeast cells.mL⁻¹ concentration, several yeast cells are observed around short and tortuous hyphae on the surface of the coffee fruit (Fig. 6B).

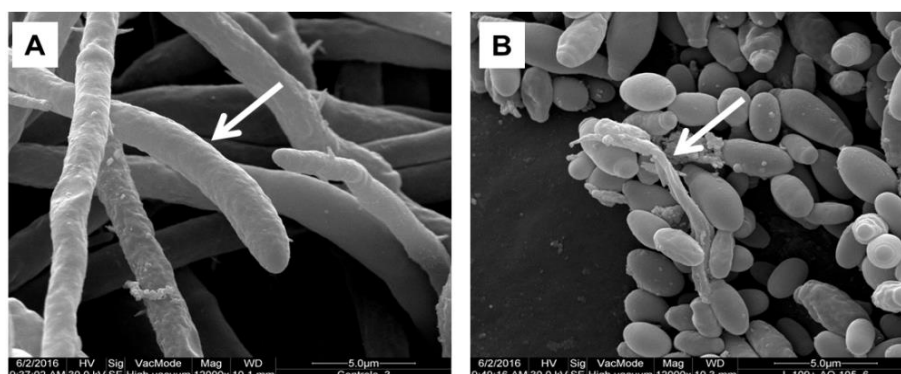


Fig.6. Micrographs of antagonistic action of *H. opuntiae* on *A. ochraceus* in coffee fruits, after seven days of incubation. **(A)** control: coffee fruits contaminated with *A. ochraceus* (10^5 conidia. mL⁻¹), 12000 X; **(B)** short and tortuous hyphae surrounded by yeast cells (initial concentration 10^9 cells. mL⁻¹), 12000 X.

The evaluation of the antagonistic potential of *H. opuntiae* on *A. ochraceus* by *in vitro* experiments and in coffee fruits suggested the action of this yeast in inhibiting different *A. ochraceus* strains by different mechanisms of action. The antibiosis was one of action mode, which is the production of extracellular metabolites by yeast with antifungal activity (Chalfoun, 2010; Oliveira et al., 2015; Granillo et al., 2015). *H. opuntiae* released VOCs (Fig. 2) and extracellular metabolites in CFS (Fig. 3 and Fig. 4) which affected the development of *A. ochraceus*, as shown by *in vitro* experiments. Competition for space and nutrients is another mode of antagonistic action presented by the yeast, as can be seen in the analysis of coffee fruits treated with 10^5 , 10^7 and 10^9 cells. mL⁻¹ of *H. opuntiae*, in which fungal inhibition was much more evident in coffee fruits treated with 10^9 yeast cells. mL⁻¹ (Fig. 5). The understanding of the antagonistic mode of action of novel yeast species is of great importance for the development of relevant biofungicides, which allow improved biocontrol performance and reliability.

In summary, *H. opuntiae* showed efficacy as biological control agent against *A. ochraceus* *in vitro* and *in vivo* (coffee fruits), and its antagonistic action involved more than one associated mechanism of action, an important characteristic of a biocontroller (Oliveira et al., 2015). In addition, this yeast is found naturally in coffee (Pereira et al., 2016) and has never been involved in human infections (Niaré-Doumbo et al., 2014), therefore it could be considered a safe and useful microorganism for application as biocontrol agent. To the best of our knowledge, this is the first study on the antifungal activity of *H. opuntiae* on *A. ochraceus* strains in coffee fruits and was possible to suggest the mode of antagonistic action of this yeast.

Acknowledgements

The authors are grateful to Laboratory of Electron Microscopy and Microanalysis (LMEM) of the State University of Londrina (UEL), for the aid in the execution of scanning electron microscopy analysis.

References

- Ando, H., Hatanaka, K., Ohata, I., Yamashita-Kitaguchi, Y., Kurata, A., Kishimoto, N., 2012. Antifungal activities of volatile substances generated by yeast isolated from Iranian commercial cheese. *Food Control*. 26, 472–478.
- Andrade, M.J., Thorsen, L., Rodríguez, A., Córdoba, J.J., Jespersen, L., 2014. Inhibition of ochratoxigenic moulds by *Debaryomyces hansenii* strains for biopreservation of dry-cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 170, 70–77.
- Armando, M.R., Dogi, C.A., Poloni, V., Rosa, C.A.R., Dalcero, A.M., Cavaglieri, L.R., 2013. In vitro study on the effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Fusarium graminearum*. *Int. J. Food Microbiol.* 161, 182–188.
- Batista, L.R., Chalfoun, S.M., Silva, C.F., Cirillo, M., Varga, E.A., Schwan, R.F., 2009. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. *Food Control*. 20 (9), 784–790.
- Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A., Visconti, A., 2006. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 204–209.
- Cadez, N., Poot, G.A., Raspor, P., Smith, M.T., 2003. *Hanseniaspora meyeri* sp. nov., *Hanseniaspora clermontiae* sp. nov., *Hanseniaspora lachancei* sp. nov. and *Hanseniaspora opuntiae* sp. nov., novel apiculate yeast species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1671–1680.
- Chalfoun, S.M., 2010. Biological Control and Bioactive Microbial Metabolites: A Coffee Quality Perspective. *Cienc. E Agrotecnologia* 34, 1071–1085.
- Coelho, A.R., Tachi, M., Pagnocca, F.C., Nobrega, G.M.A., Hoffmann, F.L., Harada, K.I., Hirooka, E.Y., 2009. Purification of *Candida guilliermondii* and *Pichia ohmeri* killer toxin as an active agent against *Penicillium expansum*. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 26, 73–81.
- Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), 2017. Safra Brasileira de Café. <https://www.conab.gov.br/index.php/info-agro/safras/cafe> (accessed 28 March 2018).
- de Paiva, E., Serradilla, M.J., Ruiz-Moyano, S., Córdoba, M.G., Villalobos, M.C., Casquete, R., Hernández, A., 2017. Combined effect of antagonistic yeast and modified atmosphere to control *Penicillium expansum* infection in sweet cherries cv. Ambrunés. *Int. J. Food Microbiol.* 241, 276–282.

- Di Francesco, A., Ugolini, L., Lazzeri, L., Mari, M., 2015. Production of volatile organic compounds by *Aurebasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. *Biol Control*. 81, 8-14.
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarisin, D., Wilson, C., 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? *Postharvest Biol Technol*. 52, 137–145.
- Fiori, S., Urgeghe, P.P., Hammami, W., Razzu, S., Jaoua, S., Migheli, Q., 2014. Biocontrol activity of four non- and low-fermenting yeast strains against *Aspergillus carbonarius* and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. *Int. J. Food Microbiol*. 189, 45–50.
- Fungaro, M. H. P., Magnani, M., Vilas- Boas, L.A., Vissotto, P.C., Furlaneto, M.C., Carneiro, M.L., Taniwaki, M.H., 2004. Genetic relationships among Brazilian strains of *Aspergillus ochraceus* based on RAPD and ITS sequences. *Can. J. Microbiol*. 988, 985–988.
- Granillo, A.R., Canales, M.G.M., Espíndola, M.E.S., Rivera, M.A.M., De Lucio, V.M.B., Tovar, A.V.R., 2015. Antibiosis interaction of *Staphylococcus aureus* on *Aspergillus fumigatus* assessed in vitro by mixed biofilm formation. *BMC Microbiol*. 15, 1-15.
- Guzzon, R., Franciosi, E., Larcher, R., 2014. A new resource from traditional wines: Characterization of the microbiota of “vino santo” grapes as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea*. *Eur. Food Res. Technol*. 239, 117–126.
- International Coffee Organization (ICO) 2017, Coffee trade statistics. www.ico.org/trade_statistics.asp (accessed 28 March 2018).
- Janisiewicz, W.J., Jurick, W.M., Peter K.A., Kurtzman C.P., Buyer J.S., 2014. Yeasts associated with plums and their potential for controlling brown rot after harvest. *Yeast*. 31, 207–218.
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., Liu, Y., 2013. Review: utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *Int. J. Food Microbiol*. 167, 153-160.
- Mantle, P. G., Chow, A. M., 2000. Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. *Int. J. Food Microbiol*. 56, 105–109.
- Martins, F., Mamede, M.E. de O., Silva, A.F. da, Guerreiro, J., Lima, S.T. da C., 2017. Ultraestrutura celular e expressão de proteínas de leveduras

- Hanseniaspora* sob efeito do estresse etanólico. Brazilian J. Food Technol. 20. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.6516>
- Masoud, W., Poll, L., Jakobsen, M., 2005. Influence of volatile compounds produced by yeasts predominant during processing of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. Yeast. 22, 1133–1142.
- Medina-Córdova, N., López-Aguilar, R., Ascencio, F., Castellanos, T., Campa-Córdova, A.I., Angulo, C., 2016. Biocontrol activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* against phytopathogenic fungi and its ability to inhibit mycotoxins production in maize grain (*Zea mays* L.). Biol. Control 97, 70–79.
- Moraes, A., Holanda, V., Zahner, V., 2006. Genotypic and Phenotypic Diversity in Tropical Strains of *Aspergillus* spp. (Section Circumdati) Isolated from Insects. Curr. Microbiol. 52, 261–266.
- Niaré-Doumbo, S., Normand, A.C., Diallo, Y.L., Dembelé, A.K., Thera, M.A., Diallo, D., Piarroux, R., Doumbo, O., Ranque, S., 2014. Preliminary study of the fungal ecology at the haematology and medical-oncology ward in Bamako. Mali. Mycopathol. 178 (1-2), 103-109.
- Oliveira, T.A.S., Duarte, E. A. A., Silva, R. M., Moreira, Z. P. M., Carmo, C. O., Luz, E. D. M. N., 2015. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas. RAPP. 23, 293-325.
- Pereira, G. V. de M., Beux, M., Pagnoncelli, M.G.B., Soccol, V.T., Rodrigues, C., Soccol, C.R., 2016. Isolation, selection and evaluation of antagonistic yeasts and lactic acid bacteria against ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae* on coffee beans. Lett. Appl. Microbiol. 62, 96–101.
- Pereira, G.V. de M., Soccol, V.T., Pandey, A., Medeiros, A.B.P., Andrade Lara, J.M.R., Gollo, A.L., Soccol, C.R., 2014. Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. Int. J. Food Microbiol. 188, 60–66.
- Pereira, G.V. de M., Soccol, V.T., Soccol, C.R., 2016. Current state of research on cocoa and coffee fermentations. Curr. Opin. Food Sci. 7, 50–57.
- Pfliegler, W. P., Pusztahelyi, T., Pócsi, I., 2015. Review Mycotoxins – prevention and decontamination by yeasts. J. Basic Microbiol. 54, 1–14.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Manderville, R.A., 2007. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. Mol. Nutr. Food Res. 51, 61–99.

- Ponsone, M.L., Chiotta, M.L., Combina, M., Dalcero, A., Chulze, S., 2011. Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 70–77.
- Qin, X., Xiao, H., Cheng, X., Zhou, H., Si, L., 2017. *Hanseniaspora uvarum* prolongs shelf life of strawberry via volatile production. *Food Microbiol.* 63, 205–212.
- Ramos, D.M.B., Silva, C.F., Batista, L.R., Schwan, R.F., 2010. Inibição in vitro de fungos toxigênicos por *Pichia* sp. e *Debaryomyces* sp. isoladas de frutos de café (*Coffea arabica*). *Acta Sci. - Agron.* 32, 397–402.
- Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Villalobos, M.C., Calle, A., Serradilla, M.J., Córdoba, M.G., Hernández, A., 2016. Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases. *Food Microbiol.* 57, 45–53.
- Schmitt, M.J., Breinig, F., 2002. The viral killer system in yeast: from the molecular biology to application. *FEMS Microbiol Rev.* 26, 257–276.
- Sharma, R.R., Singh, D., Singh, R., 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. *Biol. Control* 50 (3), 205–221.
- Silva, C.F., Batista, L.R., Abreu, L.M., Dias, E.S., Schwan, R.F., 2008. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. *Food Microbiol.* 25, 951–957.
- Simoncini, N., Pinna, A., Toscani, T., Virgili, R., 2015. Effect of added autochthonous yeasts on the volatile compounds of dry-cured hams. *Int. J. Food Microbiol.* 212, 25–33.
- Spadaro, D., Droby, S., 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit : The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends Food Sci. Technol.* 47, 39–49.
- Varela, C., Borneman, A.R., 2017. Yeasts found in vineyards and wineries. *Yeast.* 34, 111–128.
- Varga, J., Kocsubé, S., Péteri, Z., Vágvolgyi, C., Tóth, B., 2010. Chemical, physical and biological approaches to prevent ochratoxin induced toxicoses in humans and animals. *Toxins.* 2, 1718–1750.
- Velmourougane, K., Bhat, R., 2009. Improvement of coffee quality through prevention of moulds, in: Sridhar, K.R. (Ed.), *Frontiers in Fungal Ecology, Diversity and Metabolites*. I.K. International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, pp. 204- 220.

- Velmourougane, K., Bhat, R., Gopinandhan, T.N., Panneerselvam, P., 2011. Management of *Aspergillus ochraceus* and Ochratoxin-A contamination in coffee during on-farm processing through commercial yeast inoculation. *Biol. Control.* 57, 215–221.
- Velmourougane, K., Panneerselvam, P., Gopinandhan, T.N., 2006. Determination of optimal drying floors for quality improvement, mould prevention and Ochratoxin contamination in coffee. *J. Coffee Res.* 34 (1-2), 44–56.
- Vilela, D.M., Pereira, G.V., Silva, C.F., Batista, L.R., Schwan, R.F., 2010. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiol.* 27 (8), 1128–1135.
- Weiler, F., Schmitt, M.J., 2003. Zygocin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. *FEMS Yeast Res.* 3, 69–76.
- Zhao, Y., Selvaraj, J.N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Song, H., Tan, X., Sun, L., Sangare, L., Folly, Y.M.E., Liu, Y., 2014. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PLoS One.* 9, 1–11.
- Zhu, C., Shi, J., Jiang, C., Liu, Y., 2015. Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* *in vitro* and *in vivo* through antagonistic yeasts. *Food Control.* 50, 125–132.

Potential of antagonistic yeasts for biocontrol of ochratoxigenic *Aspergillus* species and optimization of ochratoxin A detoxification

Abstract

Aspergillus ochraceus, *A. westerdijkiae* and *A. carbonarius* contaminate grains, cereals and fruits and produce ochratoxin A (OTA) that causes serious hazard to human and animal health. The potential of *Hanseniaspora opuntiae*, *Meyerozyma caribbica* and *Kluyveromyces marxianus* for inhibition of *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* and *A. carbonarius* growth and OTA effect on yeast growth were evaluated. Predictive models were developed using a Box Behnken experimental design to predict the combined effects of inoculum size, incubation time and OTA concentration on OTA detoxification by the yeasts. The yeasts were able to inhibit fungal growth from 13% to

86%. *K. marxianus* was the most efficient in inhibiting the three *Aspergillus* species. In addition, high OTA levels (100 ng. mL⁻¹) did not affect the growth of the yeasts within 72 h of incubation. The models showed that the maximum OTA detoxification would be 86.8% (*H. opuntiae*), 79.3% (*M. caribbica*) and 73.7% (*K. marxianus*), and there was no significant difference ($p > 0.05$) between the values predicted and the results obtained experimentally. The yeasts showed potential for biocontrol of ochratoxigenic fungi and OTA detoxification and the models developed are important tools for predicting the best conditions for the application of these yeasts as detoxification agents.

Keywords: biological control; *Hanseniaspora opuntiae*; *Meyerozyma caribbica*; *Kluyveromyces marxianus*; inhibition; food safety

1. Introduction

Ochratoxin A (OTA) is a toxic secondary metabolite produced by filamentous fungi that causes serious hazard to human and animal health (Chen et al., 2018). *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* and *A. carbonarius* are among the major OTA-producing fungi that develop in warm and tropical regions and contaminate crops of grains, cereals and fruits (Abrunhosa et al., 2010). It has been shown that OTA can cause various toxicological effects such as disruption of intestinal microbiota homeostasis (Liew and Mohd-Redzwan, 2018), teratogenicity (Pfohl-Leszkowicz and Manderville, 2012), mutagenicity, hepatotoxicity (Qi et al., 2014), genotoxicity (Pfohl-Leszkowicz and Manderville, 2007), immunotoxicity (Marin and Taranu, 2015), embryotoxicity (Hong et al., 2000), testicular toxicity (Schwartz, 2002), damage to the blood-brain barrier (Jackson and Ryu, 2017) and mainly nephrotoxicity (Zhao et al., 2016). OTA is classified as possibly carcinogenic to humans (Group 2B) as there is evidence in experimental animals but not in humans (Pfohl-Leszkowicz and Manderville, 2007).

The contaminated foods with OTA are cereals and cereal products (Sun et al., 2017), fruit (Marin and Taranu, 2015, Freire et al., 2017), grains (Pfohl-Leszkowicz and Manderville, 2012), wine (Freire et al. 2017), dairy products, meat and eggs (Dai et al., 2014). The presence of OTA in food and feed constitutes a risk not only to human and animal health, but may also result in large economic losses through reduced livestock and agricultural productivity (Chen et al., 2018).

Several strategies can be employed to minimize OTA levels in food and feed. The most important methods are the preventive ones because they avoid the contamination of the raw materials (Abrunhosa et al., 2010). However, OTA contamination in food and feed may occur, therefore the application of OTA detoxification techniques is the most feasible. There are physical and chemical detoxification methods, however, they show some disadvantages such as the loss of nutritional values of the food, as is the case of inorganic adsorbents and the ammonia application (Abrunhosa et al., 2010, Zhu et al., 2015, Chen et al., 2018). The use of biological methods has become a promising alternative for the control of toxigenic fungi and mycotoxins in food and feed (Hathout and Aly, 2014).

Biological methods consist of applying microorganisms that can inhibit the growth of toxigenic fungi and detoxify mycotoxins in foods through adsorption or biotransformation in less toxic compounds. Yeasts have some features that make them good tools for control of OTA-producing fungi such as the ability to survive at various environmental conditions and not to produce toxic compounds for humans (Bleve et al., 2006). In addition, the cell wall of some yeast species is able to adsorb OTA from food, decontaminating them significantly (Bejaoui et al., 2004; Caridi et al., 2012; Petruzzi et al., 2015). Moreover, yeast-based products are applied as feed additives to neutralize mycotoxicosis in cattle (Pizzolitto et al., 2012). Some yeasts are also known to degrade OTA in their nontoxic OT α metabolite (Péter et al., 2007; Schatzmayr et al., 2003). However, some yeasts are sensitive to certain mycotoxins, constituting a serious problem for application in fermentative processes for food production (Pfliegler et al., 2015).

In previous studies, it has been reported that *H. opuntiae*, *M. caribbica* and *K. marxianus* are fermenting yeasts present in the natural fermentation of coffee beans and cocoa beans (Pereira et al., 2014; Papalexandratou e De Vuyst, 2011; Pereira et al., 2016). Although *H. opuntiae* and *M. caribbica* have already been described with potential for biological control of some plant pathogens (de Paiva et al., 2017; Ruiz-Moyano et al., 2016; Bautista-Rosales et al., 2013) and *K. marxianus* is considered a yeast with several biotechnological potentials (Fonseca et al., 2008; Lane and Morrissey, 2010), there are no studies on the action of these yeasts on the biological control of OTA-producing fungi and OTA detoxification.

Considering that food and feed contamination by OTA can cause serious health risks to humans and animals and the advantages of a biocontrol method using yeasts,

to reduce the growth of toxigenic fungi and to minimize OTA levels in food, the objective of this study was to evaluate the potential of *H. opuntiae*, *M. caribbica* and *K. marxianus* for biocontrol of *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* and *A. carbonarius*, evaluate the OTA effect on the growth of these yeasts as well as the *in vitro* detoxification capacity.

2. Materials and Methods

2.1. Fungal strains and growth conditions

A. ochraceus (AO 14), *A. westerdijkiae* (AW 91) and *A. carbonarius* (AC 188) were provided by the Mycological Culture Collection of Department of General Biology, State University of Londrina, Paraná, Brazil. *A. ochraceus* (AO 14) isolated from coffee grains in São Paulo state, is an OTA-producing strain (Fungaro et al., 2004), *A. carbonarius* (AC 188) is a mutant, OTA-producing strain, obtained from the wild-type strain (ITAL 187) isolated from coffee grains in São Paulo state (Lunardi et al., 2006) and *A. westerdijkiae* (AW 91) is an OTA-producing strain, isolated from coffee grains in Paraná state (Sartori et al., 2013).

H. opuntiae, isolated from green maize, *K. marxianus*, isolated from maize germ, belongs to the Mycological Culture Collection of the Department of Biochemistry and Biotechnology, State University of Londrina, Paraná, Brazil. *M. caribbica*, isolated from soil samples in a Private Nature Reserve, located in the Northern Region of Paraná state, belongs to the Mycological Culture Collection of the Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, Paraná, Brazil.

Fungal strains were grown on potato dextrose agar slants (PDA; Sigma- Aldrich, St. Louis, USA) at 25 ± 1 °C. Conidia suspensions of each fungus were prepared by collecting conidia from 7-day-old colonies (grown on PDA at 25 ± 1 °C) in sterile water with 0.015% Tween 80 added to assist the conidia dispersion. The conidia concentrations were estimated by a hemocytometer and the suspensions were diluted to final concentrations of 1×10^6 conidia. mL⁻¹ for further testing.

Yeasts were grown on yeast extract, peptone and dextrose (YPD) agar slants. The yeast cells were transferred to YPD broth and incubated at 150 rpm, 28 ± 1 °C for 48 h, for further testing.

2.2. *In vitro* inhibition of ochratoxigenic *Aspergillus* species growth by antagonistic yeasts

The experiment was performed according to Medina-Córdova et al. (2016), with modifications. Yeast cell counts were determined with a hemocytometer and the inoculum concentration was adjusted to 1×10^6 and 1×10^8 cells. mL⁻¹. An aliquot of 1 mL of each yeast cell suspension (1×10^6 and 1×10^8 cells. mL⁻¹) was poured into Petri dishes with 20 mL YPD agar. The plates were inoculated at the center with a 8 mm mycelial disc of each *Aspergillus* species, cultured for seven days on PDA at 25 ± 1 °C. The diameter of fungal growth was measured at 7th day and the experiment was performed in triplicate. The diameter inhibition (DI) was calculated as follows:

$$DI (\%) = [(C - T)/C] \times 100$$

Where C (control) was the average diameter (mm) of fungal colonies in the absence of yeasts and T (treatment) was the average diameter (mm) of fungal colonies in the cocultured plates.

2.3. Influence of OTA on the viability of *H. opuntiae*, *M. caribbica* and *K. marxianus*

The effect of OTA on yeast viability was evaluated. Yeasts (10^6 cells. mL⁻¹) were inoculated in YPD broth with the addition of 100 ng. mL⁻¹ of OTA (Sigma-Aldrich Chemical Co., USA) and incubated at 30 °C and 150 rpm. The colony forming units (CFUs) were determined before addition of the mycotoxin and after 24 h, 48 h and 72 h of incubation with OTA. The CFUs were determined as follows: 1 mL of each yeast culture was serially diluted in YPD broth and spread on the surface of the YPD agar.

The plates were incubated at 30 ± 1 °C for 48 h and the number of colonies formed was counted. The evaluation was performed in triplicate for each yeast along with the controls (without the addition of OTA) (Patharajan et al., 2011, with modifications).

2.4. *In vitro* OTA detoxification assay by antagonistic yeasts

OTA detoxification assay was performed according to Bejaoui et al. (2004) and Patharajan et al. (2011) with some modification. A 10 mL aliquot of YPD broth containing 10, 55 and 100 ng. mL⁻¹ OTA were inoculated with 100 µL cell suspension of *H. opuntiae*, *M. caribbica* and *K. marxianus* individually containing 10^3 , 10^6 and 10^9 cells. mL⁻¹ and incubated at 30 °C, 150 rpm. Then the cultures were harvested at 5, 10

and 15 day intervals by centrifuging the culture (9620 $\times g$ at 0 °C for 15 min) to get cell free extract.

2.4.1. OTA extraction

OTA was extracted from cell free extract using Ochra Test™ immunoaffinity column (VICAM, Milfort, MA, USA) according to the manufacturer instructions. Five mL aliquots were diluted 1:5 by addition of phosphate-buffer saline (PBS) 10 mM pH 7.4. Then, 10 mL of the diluted extract was passed through the Ochratest immunoaffinity column. After washing the column with 10 mL PBS and 10 mL ultra-pure water, OTA was eluted with 1.5 mL methanol. The eluate was dried under a nitrogen stream at 40°C.

2.4.2. OTA determination

Ochratoxin A was analyzed according to Fujii et al. (2007). Sample residues were dissolved in 200 μ L of acetonitrile: water (1:1), mixed for 1 min and an aliquot (20 μ L) was injected into High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Ochratoxin A was analyzed by a reversed-phase isocratic HPLC system (Shimadzu LC-10 AD pump and RF-10A XL fluorescence detector), using a C-18 Luna Phenomenex column (250 x 4.6 mm, 5 μ m, Scharlau, Barcelona, Spain). Excitation and emission wavelengths were 335 and 475 nm, respectively. The mobile phase was acetonitrile: water: acetic acid (99:99:2) and the flow rate was 1 mL. min⁻¹. OTA was identified by its retention time (13 min) according to a standard obtained from Sigma (USA) and quantified by measuring the peak area. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0.05 and 0.1 ng. mL⁻¹, respectively, defined as 3-fold and 5-fold the standard deviation of 7 replications of unspiked sample on different days.

The OTA detoxification percentage was calculated according to the following equation:

$$\text{Detoxification ratio (\%)} = \frac{(C - T)}{C} \times 100\%$$

Where:

C = OTA concentration detected (ng. mL⁻¹) in control (without the yeast);

T = OTA concentration detected (ng. mL⁻¹) in cell free extract of tests.

2.5. Recovery assay

YPD broth was spiked at three OTA concentrations (1, 5 and 10 ng. mL⁻¹). After 1 h of incubation, the samples were submitted to extraction and OTA determination. Recovery experiments were performed in nine replicates. The recovery rates were 71%, 77% and 82% for each OTA concentration, respectively. These recovery values means are in accordance with the criteria established by the EU-Regulation for methods of determining OTA levels in food.

2.6. Experimental design and Statistical analysis

Differences in means of *in vitro* inhibition of *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* and *A. carbonarius* growth by *H. opuntiae*, *M. caribbica* and *K. marxianus*, and the influence of OTA on yeast viability were evaluated statistically using ANOVA followed by the Tukey's multiple-range test ($p < 0.05$).

In vitro OTA detoxification potential by *H. opuntiae*, *M. caribbica* and *K. marxianus* was evaluated following an incomplete Box and Behnken design (1960), which allows making all necessary combinations of the variables analyzed. The variables evaluated were yeast inoculum size, incubation time and OTA concentration. This design allowed to study the effect of the three variables in a single block of 15 sets of test conditions including 3 central points. The order of the experiments was totally randomized. Three levels were attributed to each factor, coded as -1, 0, +1 (Table 2). The combined effects are represented by a quadratic polynomial model for each yeast studied:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_I + \beta_2 X_T + \beta_3 X_{OTA} + \beta_{11}(X_I)^2 + \beta_{22}(X_T)^2 + \beta_{33}(X_{OTA})^2 + \beta_{12} X_I X_T + \beta_{13} X_I X_{OTA} + \beta_{23} X_T X_{OTA}$$

Where Y is the response of OTA detoxification expressed in percentage (%) and β_0 is a constant coefficient of the model. The regression coefficients (β_1 , β_2 and β_3), (β_{11} , β_{22} and β_{33}) and (β_{12} , β_{13} and β_{23}) respectively represent the linear, quadratic and interaction effects of the model, estimated by multiple regression analysis. X_I (inoculum size), X_T (incubation time) and X_{OTA} (OTA concentration) are coded variables, ranging from -1 to +1. The interpretation of the data was based on the signs (positive or negative effect on the response) and statistical significance of the coefficients ($p <$

0.05). Interactions between two factors may appear as an antagonistic effect (negative coefficient) or a synergistic effect (positive coefficient).

For the validation of the equations obtained by the statistical model, the optimal conditions predicted by each equation were evaluated experimentally in three replications and the comparison between the observed results and the results predicted by the statistical model was evaluated by the Student's t test.

All the statistical analysis was performed by Statistical software, version 7 (Stat Soft, Inc., Tulsa, OK, USA).

3. Results and Discussion

Biological control with yeast application has great potential in reducing the economic losses caused by toxigenic fungi in agriculture. Some yeasts have already been described as biocontrol agents with potential to inhibit the filamentous fungi growth (Bleve et al., 2006, Masoud et al., 2005, Medina-Córdova et al., 2016, Souza et al., 2017). Inhibition of *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* and *A. carbonarius* growth by the antagonistic yeasts *H. opuntiae*, *M. caribbica* and *K. marxianus* is shown in Figure 1. The yeasts were able to inhibit *in vitro* fungal growth with inhibition rates ranging from 13% to 86%. The highest inhibitory effect was obtained by *H. opuntiae* (10^6 and 10^8 cells. mL⁻¹) which inhibited 86% of *A. ochraceus* growth. *K. marxianus* was the most efficient in inhibiting the three *Aspergillus* species, i.e., *A. ochraceus* (78%), *A. westerdijkiae* (81%) and *A. carbonarius* (84%), when the inoculum size was set at 10^8 cells. mL⁻¹.

The results (Figure 1) suggest that the mode of antagonistic action presented by the three yeasts could be competition for space and nutrients, as can be observed in the antagonistic action of *H. opuntiae* on *A. westerdijkiae* and *A. carbonarius* (Fig. 1A), *M. caribbica* on *A. carbonarius* (Fig. 1B) and *K. marxianus* on *A. ochraceus* and *A. carbonarius* (Fig. 1C), in which it is evident that the greatest antagonistic effect occurred when applied the largest inoculum size (10^8 cells. mL⁻¹).

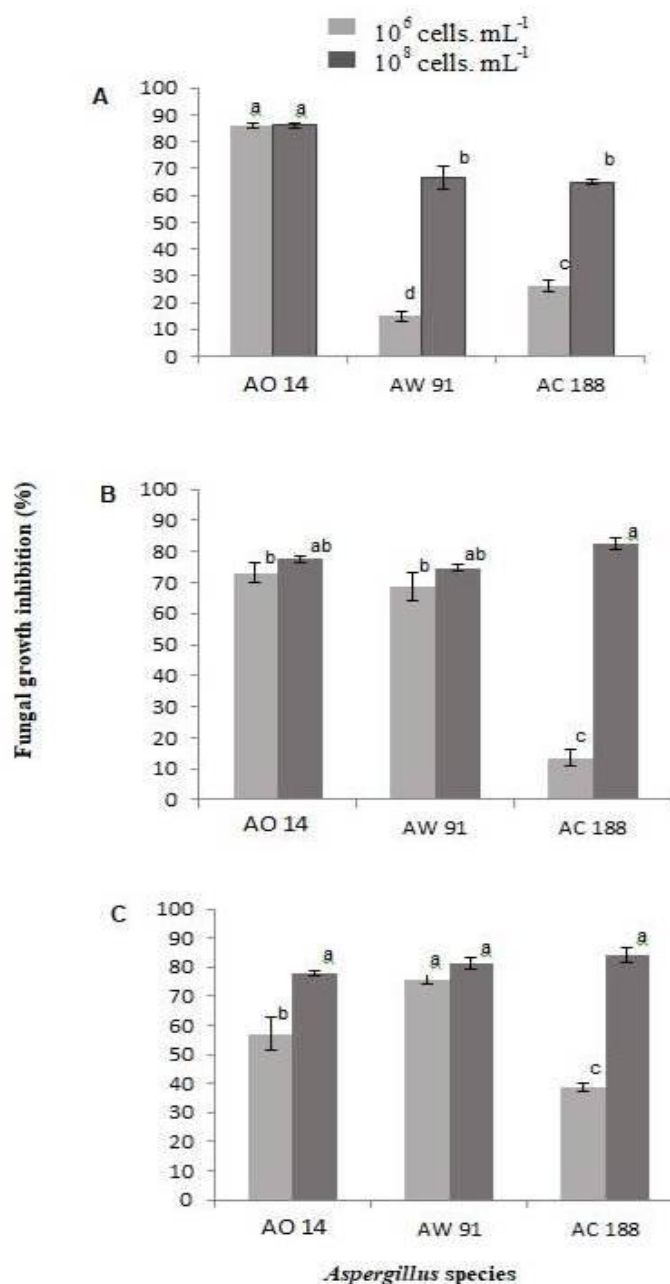


Fig. 1. Growth Inhibition (%) of *A. ochraceus* (AO 14), *A. westerdijkiae* (AW 91) and *A. carbonarius* (AC 188) by the antagonistic yeasts *H. opuntiae* (A), *M. caribbica* (B) and *K. marxianus* (C), when inoculum size was set at 10^6 and 10^8 cells. mL⁻¹. Each bar represents the mean $\pm$ standard deviation of three replicates. Different letters on the top of each bar indicate significant difference by the Tukey test ($p < 0.05$).

However, there was no significant difference ($p > 0.05$) in the antagonistic action of *H. opuntiae* on *A. ochraceus* (Fig. 1A) and *K. marxianus* on *A. westerdijkiae* (Fig. 1C) at different sizes of yeast inoculum (10^6 and 10^8 cells. mL⁻¹). This suggests that these yeasts produce antifungal compounds capable to inhibit the growth of these *Aspergillus* species and that inhibition is independent of the yeast cells concentration.

The biological control of *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* and *A. carbonarius* using different species of yeasts has already been reported by some researchers (Masoud et al., 2005; Pereira et al., 2016; Zhu et al., 2015). Masoud et al. (2005) described the antagonistic action of *Pichia anomala*, *P. kluyveri* and *H. uvarum* on *A. ochraceus* growth. A new yeast strain *P. fermentans* LPBYB13 was efficient in inhibiting *A. westerdijkiae* growth in coffee beans (Pereira et al., 2016). Four yeast species *Candida zemplinina*, *Saccharomyces cerevisiae*, *P. kluyveri*, *Metschnikowia fructicola* significantly inhibited the *in vitro* and *in vivo* growth of *A. ochraceus* and *A. carbonarius* (Zhu et al., 2015). However, there is no information on the antagonistic potential of *H. opuntiae*, *M. caribbica* and *K. marxianus* for biocontrol of different OTA-producing *Aspergillus* species.

Although some yeast species have already been studied for biological control of toxigenic fungi and for mycotoxin detoxification, the cytotoxic effect of mycotoxins on yeasts is still unclear (Pfliegler et al., 2015). However, knowledge on mycotoxin cytotoxicity is very important for selection of yeast strains with potential application as detoxification agents.

As shown in Table 1, high OTA levels (100 ng. mL⁻¹) did not affect the growth of *H. opuntiae*, *M. caribbica* and *K. marxianus* within 72 h incubation. There was no significant difference between the log CFU. mL⁻¹ values of the tests (yeast + OTA) in relation to the controls (without OTA) at 24, 48 and 72 h incubation times, by the Tukey test ($p > 0.05$). Similar results were reported for *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* (Angioni et al., 2007), five different strains of *Saccharomyces cerevisiae* (Bohm et al., 2000), *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia guilliermondii* and *Rhodococcus erythropolis* (Patharajan et al., 2011), in which the presence of OTA did not affect yeast growth in the culture medium at different incubation periods.

Table 1

Effect of OTA on the viability of antagonistic yeasts at different incubation times at 30 °C.

Treatment	log CFU. mL ⁻¹			
	Initial	24 h	48 h	72 h
OTA + <i>H. opuntiae</i>	6 ^b	8.072 ± 0.174 ^a	8.046 ± 0.041 ^a	8.273 ± 0.081 ^a
OTA+ <i>M. caribbica</i>	6 ^b	9.051 ± 0.048 ^a	9.047 ± 0.132 ^a	9.043 ± 0.119 ^a
OTA+ <i>K. marxianus</i>	6 ^b	8.874 ± 0.048 ^a	8.912 ± 0.033 ^a	9.824 ± 0.052 ^a
<i>H. opuntiae</i> (control)	6 ^b	8.096 ± 0.133 ^a	8.084 ± 0.158 ^a	8.251 ± 0.069 ^a
<i>M. caribbica</i> (control)	6 ^b	9.048 ± 0.084 ^a	8.717 ± 0.560 ^a	9.081 ± 0.014 ^a
<i>K. marxianus</i> (control)	6 ^b	8.837 ± 0.096 ^a	8.905 ± 0.057 ^a	9.312 ± 0.051 ^a

The log CFU. mL⁻¹ values represent the mean ± standard deviation of three replicates, the values indicated by different letters are statistically different by the Tukey test ($p < 0.05$).

Some of the yeasts that have already been evaluated for OTA detoxification potential were *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *M. pulcherrima*, *P. guillermionodii*, *Kloeckera lindneri*, *Torulaspora delbrueckii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *S. ludwigii*, *Phaffia rhodozyma* and *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Cecchini et al. 2006; Patharajan et al., 2011; Péteri et al., 2007). However, little is known about OTA detoxification potential by *H. opuntiae*, *M. caribbica* and *K. marxianus* investigated in this study.

The factors that can determine the efficiency of OTA detoxification by yeasts are yeast inocula size and cell integrity (Bejaoui et al., 2004; Péteri et al., 2007), incubation temperature (Patharajan et al., 2011; Schatzmayr et al., 2003), incubation time (Patharajan et al., 2011, Péteri et al., 2007, Schatzmayr et al., 2003), OTA concentration (Bejaoui et al., 2004; Patharajan et al., 2011) and other conditions related to fermentative processes in which the yeasts are inserted as pH, type of culture medium and agitation (Bejaoui et al., 2004, Cecchini et al. 2006).

The factors selected for evaluation of OTA detoxification capacity by *H. opuntiae*, *M. caribbica* and *K. marxianus* were inocula size, incubation time and OTA concentration, considered important factors for an initial *in vitro* study (Patharajan et al., 2011). The temperature was set at 30 °C, since this temperature was already considered optimal in previous work on OTA detoxification by yeasts (Bejaoui et al., 2004; Patharajan et al., 2011). Some authors suggest that the greatest capacity to remove OTA at 30 °C could be associated with the release of yeast cell wall polysaccharides, which have binding sites capable of adsorbing OTA (Petruzzi et al., 2014a; Petruzzi et al., 2014b; Giovani et al., 2010).

The experimental values obtained for OTA detoxification by *H. opuntiae*, *M. caribbica* and *K. marxianus* at different conditions are shown in Table 2. The three yeasts showed differences in OTA detoxification capacity and different behavior at analyzed conditions. *H. opuntiae* showed the highest efficiency for OTA detoxification (as seen in tests 2, 6, 9 and 10 with detoxification values higher than 80%), followed by *M. caribbica* (tests 10, 11 and 12 with detoxification values higher than 70%) and *K. marxianus* (tests 2 and 4 with detoxification values higher than 70%).

Table 2

In vitro ochratoxin A detoxification (%) for the incomplete Box Behnken (3^3) design with three central points, with coded and decoded variables, to evaluate the effect of yeast inoculum size (X_I), incubation time (X_T) and OTA concentration (X_{OTA}) by antagonistic yeasts.

Tests	Coded variables			Decoded variables			OTA detoxification (%) by the antagonistic yeasts (Y)		
	X_I	X_T	X_{OTA}	Inoculum size(log cells.mL ⁻¹)	Incubation time (days)	OTA concentration (ng.mL ⁻¹)	<i>H. opuntiae</i>	<i>M. caribbica</i>	<i>K. marxianus</i>
1	-1	-1	0	3	5	55	70.81	21.22	54.28
2	1	-1	0	9	5	55	82.87	39.40	72.22
3	-1	1	0	3	15	55	42.22	26.03	15.65
4	1	1	0	9	15	55	62.96	42.14	73.02
5	-1	0	-1	3	10	10	64.41	39.07	22.51
6	1	0	-1	9	10	10	80.07	11.49	46.36
7	-1	0	1	3	10	100	27.54	36.96	49.92
8	1	0	1	9	10	100	45.47	18.51	58.86
9	0	-1	-1	6	5	10	84.49	63.70	40.96
10	0	1	-1	6	15	10	81.71	81.67	15.66
11	0	-1	1	6	5	100	51.81	71.05	15.22
12	0	1	1	6	15	100	47.06	78.06	13.99
13	0	0	0	6	10	55	44.23	46.34	50.39
14	0	0	0	6	10	55	54.94	42.52	58.15
15	0	0	0	6	10	55	49.22	30.55	62.56

The influence of the variables (yeast inoculum size, incubation time and OTA concentration) on OTA detoxification capacity by yeasts was applied at 3 levels with the use of an experimental design. The Box-Behnken design optimizes the number of factor combinations and maintains a good accuracy of the expected response. This

model has already been used to predict ideal conditions for the development of yeasts as biocontrol agents in apples (Lahlali et al., 2008), and also to evaluate the *in vitro* optimal inhibition conditions of *A. carbonarius* by *Lactobacillus plantarum* (Fossi et al., 2017). However, to the best of our knowledge, this is the first attempt to apply this statistical model to evaluate the influence of such variables on OTA detoxification by *H. opuntiae*, *M. caribbica* and *K. marxianus*.

The optimum conditions to obtain the highest OTA detoxification responses by the yeasts can be predicted by the following equations:

$$(1) Y = 49.46 + 8.29 x_I - 7.004 x_T - 17.35 x_{OTA} + 1.68 x_I^2 + 13.58 x_T^2 + 3.23 x_{OTA}^2 + 2.17 x_I x_T + 0.57 x_I x_{OTA} - 0.49 x_T x_{OTA} \text{ (H. opuntiae).}$$

$$(2) Y = 44.43 - 1.47 x_I + 4.07 x_T + 1.08 x_{OTA} - 29.67 x_I^2 + 17.44 x_T^2 + 11.75 x_{OTA}^2 - 0.52 x_I x_T + 2.28 x_I x_{OTA} - 2.74 x_T x_{OTA} \text{ (M. caribbica).}$$

$$(3) Y = 57.03 + 13.51 x_I - 8.04 x_T + 1.56 x_{OTA} + 9.85 x_I^2 - 13.09 x_T^2 - 22.48 x_{OTA}^2 + 9.86 x_I x_T - 3.73 x_I x_{OTA} + 6.02 x_T x_{OTA} \text{ (K. marxianus).}$$

Where Y (1), Y (2) and Y (3) are the OTA detoxification values by *H. opuntiae*, *M. caribbica* and *K. marxianus*, respectively, X is the coded variables, expressed at levels 1, 0 and +1 and identified by the subscripts: I (inoculum size), T (incubation time) and OTA (OTA concentration).

For each model, the R^2 (determination coefficient) was calculated. The statistical models applied in this study for *H. opuntiae*, *M. caribbica* and *K. marxianus* showed an R^2 of 0.94, 0.87 and 0.86, respectively. This means that only 6%, 13% and 14% of the total response variation remained unexplained for each model. In addition, all models showed non-significant variance $p = 0.30$ (model 1 for *H. opuntiae*), $p = 0.20$ (model 2 for *M. caribbica*) and $p = 0.13$ (model 3 for *K. marxianus*), suggesting that the quadratic models approximate adequately to the experimental values. These models obtained through the Box Behnken (3^3) experimental design can be used for predictive purposes, since they showed to be significant at 5% level and showed a R^2 with high values. Joglekar and May (1987) reported that the value of R^2 should be greater than 0.80 in order to obtain a good fit, therefore the statistical models obtained in this study are adequate.

Table 3

Significance of the coefficients derived from the incomplete Box Behnken (3^3) experimental design with 3 central points applied to estimate the OTA detoxification capacity by the antagonistic yeasts obtained after multiple regression analysis (I: inoculum size; T: incubation time; OTA: OTA concentration).

Variables	Coefficients	Antagonistic yeasts		
		<i>H. opuntiae</i>	<i>M. caribbica</i>	<i>K. marxianus</i>
	β_0	49.46**	44.43**	57.03*
<i>I</i>	β_1	8.29*	- 1.47 ^{ns}	13.51*
<i>T</i>	β_2	- 7.004 *	4.07*	- 8.04*
<i>OTA</i>	β_3	- 17.35**	1.08 ^{ns}	1.56 ^{ns}
<i>I</i> ²	β_{11}	1.68 ^{ns}	- 29.67*	9.85 ^{ns}
<i>T</i> ²	β_{22}	13.58*	17.44*	- 13.09*
<i>OTA</i> ²	β_{33}	3.23 ^{ns}	11.75*	- 22.48*
<i>I</i> x <i>T</i>	β_{12}	2.17 ^{ns}	- 0.52 ^{ns}	9.86 ^{ns}
<i>I</i> x <i>OTA</i>	β_{13}	0.57 ^{ns}	2.28 ^{ns}	- 3.73 ^{ns}
<i>T</i> x <i>OTA</i>	β_{23}	- 0.49 ^{ns}	- 2.74 ^{ns}	6.02 ^{ns}

The terms with asterisks are significant at the 5% level, *p < 0.05 (significant), **p < 0.01 (very significant), ns (not significant).

The results of the multiple regression analysis from which the coefficients of the models were derived are shown in Table 3. For *H. opuntiae* and *K. marxianus* the inocula size (X_I) was the variable that showed the greatest positive effect on the response, as can be seen by the analysis of the coefficient β_1 (Table 3). However, variable X_I was not significant for OTA detoxification by *M. caribbica*. The incubation time (X_T) had a negative effect on OTA detoxification for *H. opuntiae* and *K. marxianus*, as can be seen in the value of the β_2 coefficient (Table 3). On the other hand, the incubation time (X_T) was the variable with the greatest positive effect on the response for *M. caribbica*. OTA concentration (X_{OTA}) only influenced significantly OTA detoxification by *H. opuntiae*, shown in the coefficient β_3 (Table 3), and the effect of this variable was negative.

The optimum levels of the variables to achieve the best OTA detoxification response are shown in the response surface graphs (Figure 2). For yeasts *H. opuntiae* (Fig. 2A) the variable X_T was set at level -1 (5 days), *M. caribbica* (Fig. 2B) and *K. marxianus* (Fig. 2C) the variable X_{OTA} was set at level -1 (10 ng. mL⁻¹ OTA), because

these variables had the least influence on response, according to the correlation coefficients (r) - 0.30; 0.04 and 0.06, for each yeast studied, respectively.

Figure 2A shows that OTA detoxification by *H. opuntiae* is positively correlated ($r = 0.36$) with inoculum size (X_I) and negatively correlated ($r = - 0.74$) with OTA concentration (X_{OTA}), indicating that the highest efficiency of OTA detoxification by this yeast occurred when the highest yeast inoculum (10^9 cells. mL⁻¹) and the lowest concentration of OTA (10 ng. mL⁻¹) were applied.

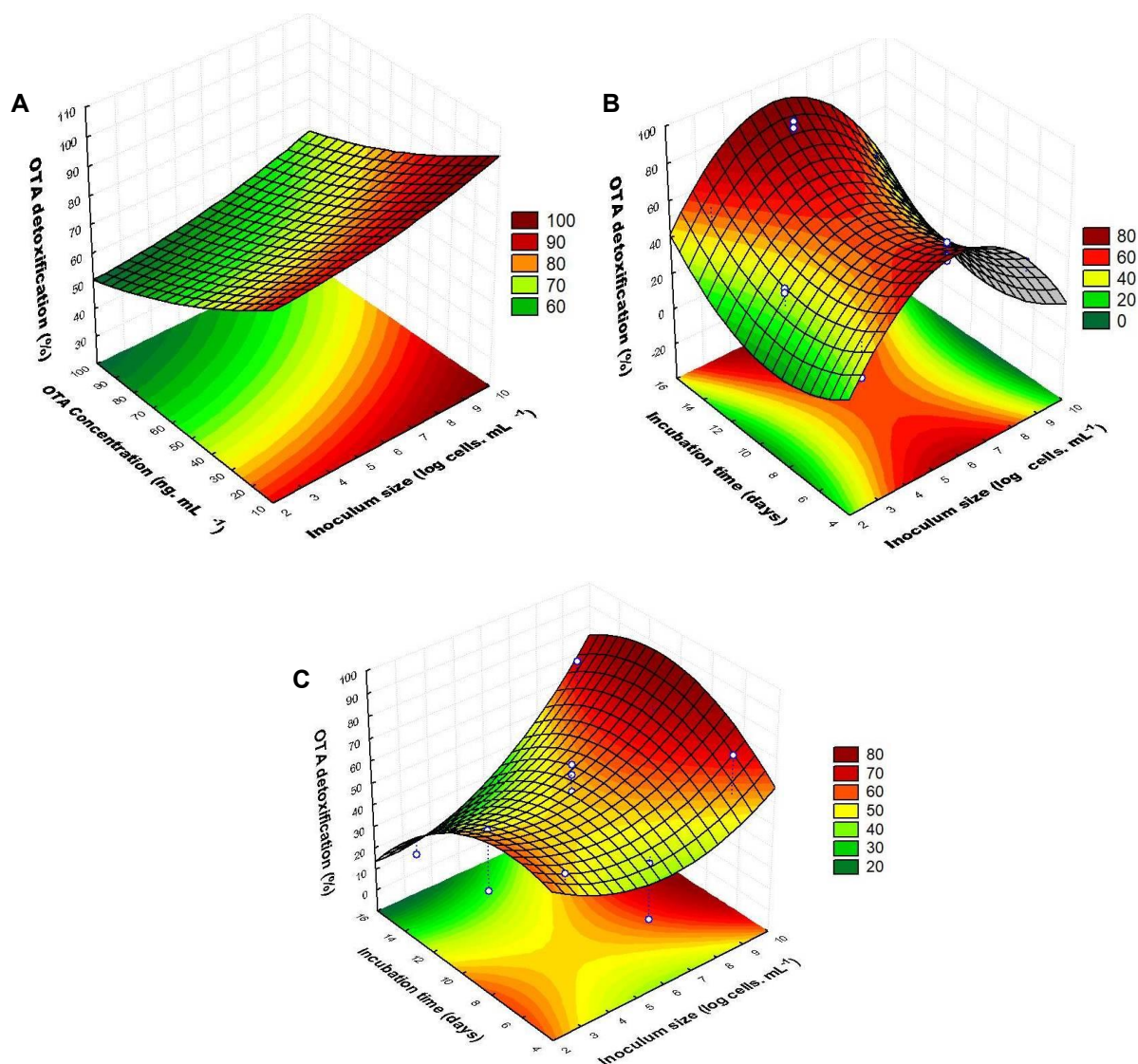


Fig. 2. Response surface of the Box Behnken (3^3) experimental design with 3 central points to evaluate the detoxification capacity of OTA by the antagonistic yeasts *Hanseniaspora opuntiae* (A): using different yeast inoculum sizes and OTA concentrations, in 5 days of incubation at 30 °C; *Meyerozyma caribbica* (B) and *Kluyveromyces marxianus* (C): using different yeast inoculum sizes and at different incubation times, with 10 ng. mL⁻¹ OTA, 30 °C.

However, OTA detoxification by *M. caribbica* is more efficient when the yeast inoculum level was set at 10^6 cells. mL⁻¹ at the longest incubation period (15 days). For *K. marxianus* (Fig. 2C) the best OTA detoxification response can be observed mainly due to the influence of inoculum size (X_1), which showed the highest positive correlation ($r = 0.48$) indicating that OTA detoxification is more efficient at 10^9 cells. mL⁻¹.

The yeast inoculum size was the variable that most positively influenced OTA detoxification by *H. opuntiae* and *K. marxianus* (Fig. 2A, Fig. 2C). This result is in agreement with Patharajan et al. (2011) who evaluated three different inoculum sizes (10^6 , 10^7 and 10^8 cells. mL⁻¹) and demonstrated that *M. pulcherrima*, *P. guillermoodii* and *K. lindneri* showed higher *in vitro* OTA detoxification when applied at the highest cell concentration (10^8 cells. mL⁻¹). Similar result was also found by Bejaoui et al. (2004), who demonstrated that the amount of *Saccharomyces* biomass was a significant factor, playing an important role in OTA detoxification.

On the other hand, *M. caribbica* showed different behavior in relation to other yeasts. The variable that influenced positively the OTA detoxification by *M. caribbica* was the incubation time (Fig. 2B). Similarly Patharajan et al. (2011) evaluated OTA detoxification capacity by yeast at 24 h, 3, 5, 7, 11, 13 and 15 day intervals and demonstrated that the greatest OTA detoxification by *M. pulcherrima*, *P. guillermoodii* and *K. lindneri* occurred at 15th day. Péteri et al. (2007) reported that the incubation time had little effect on OTA detoxification by *P. rhodozyma*.

The predictive models (Figure 3) indicate that, under optimum conditions, the maximum OTA detoxification by the three yeasts would be 86.8% (*H. opuntiae*), 79.3% (*M. caribbica*) and 73.7% (*K. marxianus*). These maximum detoxification rates could occur at the following conditions: 10^9 cells. mL⁻¹, 5 days of incubation and 32.5 ng. mL⁻¹ OTA (*H. opuntiae*), 10^6 cells. mL⁻¹, 15 days of incubation and 10 ng. mL⁻¹ OTA (*M. caribbica*) and 10^9 cells. mL⁻¹, 10 days incubation and 77.5 ng. mL⁻¹ OTA (*K. marxianus*).

In order to evaluate the predictability of the models, the agreement between the experimental (observed) and predicted values by the statistical models were investigated using Student's t-test. For this analysis, the optimal conditions predicted by the statistical models of each yeast were replicated experimentally in three replicates and the average of the results obtained were 84.8% (*H. opuntiae*), 79.9% (*M. caribbica*) and 76.7% (*K. marxianus*). The p value obtained for each response

(0.11, 0.5 and 0.19) shows that there was no significant difference ($p > 0.05$) between the values predicted by the statistical models and the results obtained experimentally, indicating that the statistical models obtained for *H. opuntiae*, *M. caribbica* and *K. marxianus* can be applied to predict the percentage of *in vitro* OTA detoxification by these yeasts.

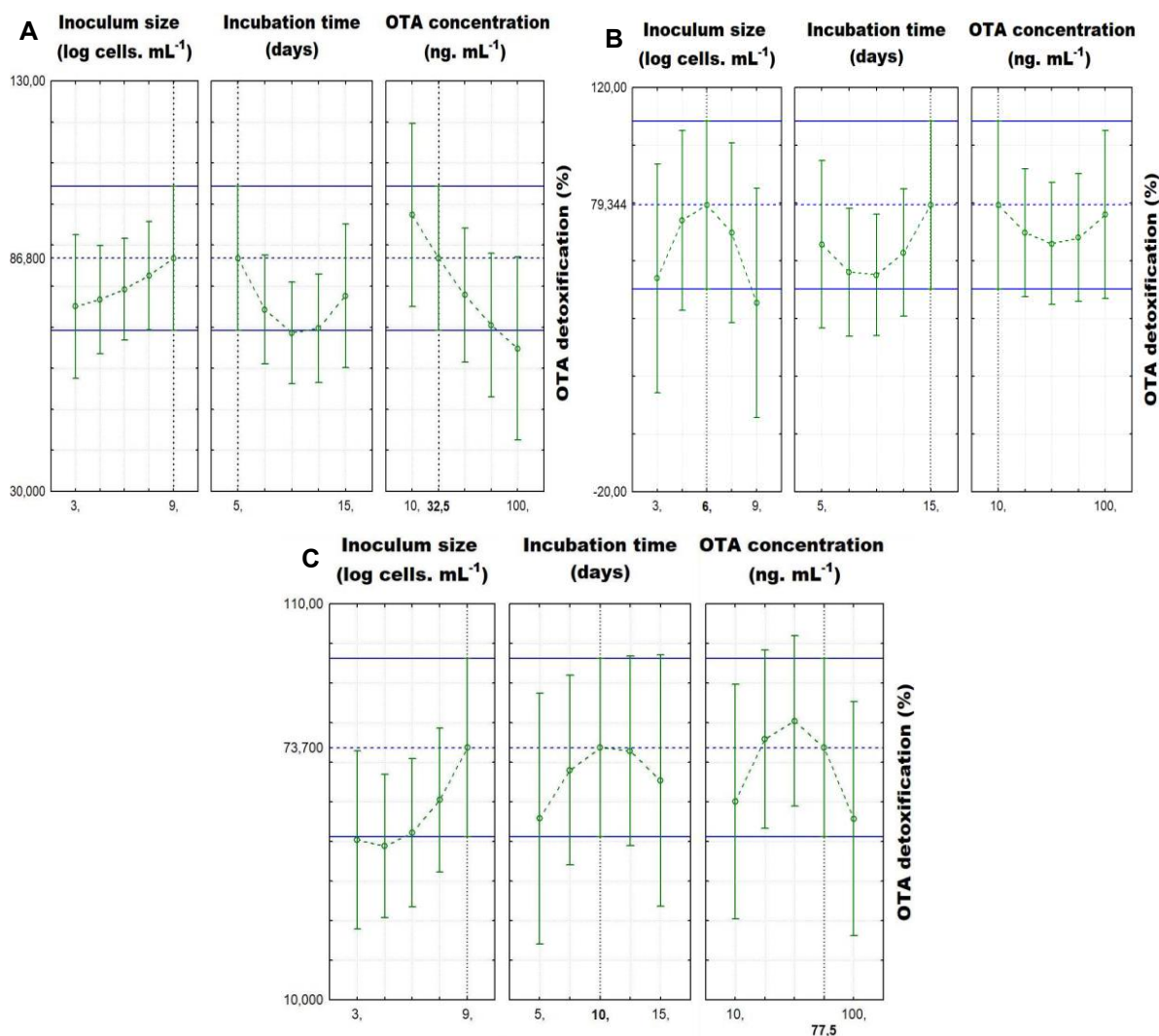


Fig. 3. Profile of predictive values for OTA detoxification using different inoculum sizes, incubation times and OTA concentrations for *H. opuntiae* (A), *M. caribbica* (B), *K. marxianus* (C).

Although *H. opuntiae* showed the highest efficiency for OTA detoxification, the OTA concentration (X_{OTA}) was the variable that most influenced negatively the response of this yeast (Fig. 2A). As shown in Figure 3A, the maximum OTA detoxification value by *H. opuntiae* is achieved when OTA concentration is set at the lowest value (32.5 ng. mL⁻¹). On the other hand, *K. marxianus* was the yeast that showed the lowest efficiency for OTA detoxification according to the predictive model (73.7%), but among the optimal conditions predicted by the model (Fig. 3C) OTA

concentration applied (77.5 ng. mL^{-1}) to reach the maximum detoxification value was the highest OTA concentration among the three yeasts studied. This indicates that *K. marxianus* was the yeast with greater capacity to detoxify a higher OTA concentration.

This difference in mycotoxin detoxification capacity from one yeast species to another has already been reported by other authors (Caridi et al., 2012; Petruzzi et al., 2015). Caridi et al. (2012) demonstrated that there is difference in OTA detoxification capacity among different strains of yeast of the same species. This difference can be explained by the presence of different proportions of mannoproteins, which are components of the yeast cell wall capable of binding to OTA through ionic bonds and electrostatic interactions (Caridi et al., 2012; Chen et al., 2018).

The results of OTA detoxification by *H. opuntiae*, *M. caribbica* and *K. marxianus* (Fig. 2 and Fig. 3) indicate that these yeasts have potential to be applied for minimizing OTA contamination in food. The highest incidences of OTA contamination in food, reported in recent studies (Li and Ryu, 2017; Shi et al., 2018; Benites et al., 2017) were 0.1 to $9.3 \text{ } \mu\text{g. kg}^{-1}$ (breakfast cereals), 0.6 to $22 \text{ } \mu\text{g. kg}^{-1}$ (oat-based cereals intended for infant feeding), 0.2 to $8.8 \text{ } \mu\text{g. kg}^{-1}$ (dried fruits), 0.07 to $12.83 \text{ } \mu\text{g. kg}^{-1}$ (raisins) and 1.84 to $10.31 \text{ } \mu\text{g. kg}^{-1}$ (roasted coffee). These OTA concentrations are close to the concentrations in which *H. opuntiae*, *M. caribbica* and *K. marxianus* reached the highest *in vitro* detoxification values (Fig. 3). This suggests that these yeasts can be applied as OTA detoxification agents in food in order to minimize OTA levels according to the limits established by the EU-Regulation (2010) and U.S. Food and Drug Administration (FDA).

In summary, this study suggested that *H. opuntiae*, *M. caribbica* and *K. marxianus* showed great potential for biocontrol of *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* and *A. carbonarius* and were able to detoxify OTA between 73.7% and 86.8%, showing that they have potential to be applied in food and feed. *K. marxianus* was the most efficient in both the biological control of the different OTA-producing *Aspergillus* species and showed a higher capacity to detoxify a higher concentration of OTA than the other yeasts. In addition, these yeasts are found naturally in coffee and cocoa and have already been described by some authors as safe (Niaré-Doumbo et al., 2014; Lane, Morrissey, 2010), including, *K. marxianus* which has GRAS status (Generally Regarded as Safe) and QPS (Qualified Presumption of Safety), in the United States and European Union, respectively. The statistical models obtained in this study are important tools to predict the best *in vitro* conditions of yeast inoculum size, incubation

time and OTA concentration to obtain the maximum OTA detoxification by these yeasts. The results may contribute to determine the ideal conditions for the application of *H. opuntiae*, *M. caribbica* and *K. marxianus* as detoxification agents.

References

- Abrunhosa, L., Paterson, R.R.M., Venâncio, A., 2010. Biodegradation of Ochratoxin A for Food and Feed Decontamination. *Toxins*. 1078–1099.
- Angioni, A., Caboni, P., Garau, A., Farris, A., Orro, D., 2007. In Vitro Interaction between Ochratoxin A and Different Strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *J. Agric. Food Chem.* 55, 2043-2048.
- Bautista-rosales, P.U., Servín-villegas, R., Ochoa-álvarez, N.A., Ragazzo-sánchez, J.A., 2013. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. *Biol. Control*. 65, 293–301.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A., 2004. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *J Appl Microbiol.* 1038–1044.
- Benites, A. J., Fernandes, M., Boleto, A. R., Azevedo, S., Silva, S., Leitão, A. L., 2017. Occurrence of ochratoxin A in roasted coffee samples commercialized in Portugal. *Food Control*. 73, 1223-1228.
- Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A., Visconti, A., 2006. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 204–209.
- Bohm, J., Grajewski, J., Asperger, H., Cecon, B., Rabus, B., Razzazi, E., 2000. Study on Biodegradation of Some A- and B-Trichothecenes and Ochratoxin A by Use of Probiotic Microorganisms. *Mycotoxin Res.* 16, 70–74.
- Box, G.E.P., Behnken, D.W., 1960. Some new three level design for study of quantitative variables. *Technometrics*. 2, 455–476.
- Caridi, A., Sidari, R., Pulvirenti, A., Meca, G., Ritieni, A., 2012. Ochratoxin A adsorption phenotype : An inheritable yeast trait *J. Gen. Appl. Microbiol.* 58, 225–233.
- Cecchini, F., Morassut, M., Moruno, E. G., Di Stefano, R., 2006. Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. *Food Microbiol.* 23, 411–417.

- Chen, W., Li, C., Zhang, B., Zhou, Z., Shen, Y., Liao, X., 2018. Advances in Biodegradation of Ochratoxin A-A Review of the Past Five Decades. *Front. Microbiol.* 9, 1–11.
- Dai, Q., Zhao, J., Qi, X., Xu, W., He, X., Guo, M., Dweep, H., Cheng, W., Luo, Y., Xia, K., Gretz, N., Huang, K., 2014. MicroRNA profiling of rats with ochratoxin A nephrotoxicity. *BMC Genomics*. 5, 1–14.
- de Paiva, E., Serradilla, M.J., Ruiz-Moyano, S., Córdoba, M.G., Villalobos, M.C., Casquete, R., Hernández, A., 2017. Combined effect of antagonistic yeast and modified atmosphere to control *Penicillium expansum* infection in sweet cherries cv. Ambrunés. *Int. J. Food Microbiol.* 241, 276–282.
- Fonseca, G.G., Heinzle, E., Wittmann, C., Gombert, A.K., 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 79, 339–354.
- Fossi, B.T., Achidi, A.U., Tiencheu, B., Bille, E.Y., Takop, G.N., Akwanwi, C. M., Ndjouenkeu, R., Wanji, S., 2017. Optimisation of inhibitory activity of lactic acid bacteria against ochratoxin a producing moulds isolated from cocoa using response surface methodology. *European j. biotechnol. biosci.* 4, 17-26.
- Freire, L., Passamani, F. R. F., Thomas, A. B., Nassur, R. C. M. R., Silva, L. M., Paschoal, F. N., 2017. Influence of physical and chemical characteristics of wine grapes on the incidence of *Penicillium* and *Aspergillus* fungi in grapes and Ochratoxin A in wines. *Int. J. Food Microbiol.* 241, 181–190.
- Fujii, S., Ono, E. Y. S., Ribeiro, R. M. R., Assunção, F. G. A., Takabayashi, C. R., Oliveira, T. R. M., Itano, E. Y., Ueno, Y., Kawamura, O., Hirooka, E. Y., 2007. A comparison between enzyme immunoassay and HPLC for ochratoxin A detection in green, roasted and instant coffee. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 50, 349-359.
- Fungaro, M. H. P., Magnani, M., Vilas- Boas, L.A., Vissotto, P.C., Furlaneto, M.C., Carneiro, M.L., Taniwaki, M.H., 2004. Genetic relationships among Brazilian strains of *Aspergillus ochraceus* based on RAPD and ITS sequences. *Can. J. Microbiol.* 988, 985–988.
- Giovani, G., Canuti, V., Rosi, I., 2010. Effect of yeast strain and fermentation conditions on the release of cell wall polysaccharides. *Int. J. Food Microbiol.* 137, 303–307.
- Hathout, A.S., Aly, S.E., 2014. Biological detoxification of mycotoxins : a review. *Ann Microbiol.* 64, 905–919.

- Hong, J.T., Park, K.L., Han, S.Y., Park, K.S., Kim, H.S., Oh, S.D., Jang, S.J., Park, K.L., Han, S.Y., Park, K.S., Kim, H.S., Oh, S.D., 2010. J Toxicol Environ Health, Part A : Current Issues effects of ochratoxin on cytotoxicity and cell differentiation in cultured rat embryonic. 37–41.
- Jackson, L. S., Ryu, D., 2017. Summary of the ACS symposium on public health perspectives of mycotoxins in Food. J. Agric. Food Chem. 65, 7017–7020.
- Joglekar, A.M., May, A.T., 1987. Product excellence through design of experiments. Cereals Food World. 32, 854-868.
- Lahlali, R., Massart, S., Serrhini, M.N., Jijakli, M.H., 2008. A Box-Behnken design for predicting the combined effects of relative humidity and temperature on antagonistic yeast population density at the surface of apples. Int. J. Food Microbiol. 122, 100–108.
- Lane, M.M., Morrissey, J.P., 2010. *Kluyveromyces marxianus* : A yeast emerging from its sister's shadow. Fungal Biol. Rev. 24, 17–26.
- Lee, H.J., Ryu, D., 2017. Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Cereals and Cereal-Derived Food Products: Public Health Perspectives of Their Co-occurrence. J. Agric. Food Chem. 65, 7034–7051.
- Liew, W. P., Mohd-Redzwan, S., 2018. Mycotoxin: its impact on gut health and microbiota. Front. Cell. Infect. Microbiol. 8:60. doi: 10.3389/fcimb.2018.00060
- Lunardi, L.U., Fier, C.B., Ashikaga, F.Y., Morioka, L.R., Fungaro, M. H. P., 2006. Generation of *Aspergillus carbonarius* mutants by *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation method. Semina: Ciênc. Biol. Saúde. 95–104.
- Marin, D.E., Taranu, I., 2015. Ochratoxin A and its effects on immunity. Toxin Rev. 9543, 11–20.
- Masoud, W., Poll, L., Jakobsen, M., 2005. Influence of volatile compounds produced by yeasts predominant during processing of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. Yeast. 22, 1133–1142.
- Medina-Córdova, N., López-Aguilar, R., Ascencio, F., Castellanos, T., Campa-Córdova, A.I., Angulo, C., 2016. Biocontrol activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* against phytopathogenic fungi and its ability to inhibit mycotoxins production in maize grain (*Zea mays* L.). Biol. Control. 97, 70–79.
- Niaré-Doumbo, S., Normand, A.C., Diallo, Y.L., Dembelé, A.K., Thera, M.A., Diallo, D., Piarroux, R., Doumbo, O., Ranque, S., 2014. Preliminary study of the fungal

- ecology at the haematology and medical-oncology ward in Bamako. Mali. *Mycopathol.* 178 (1-2), 103-109.
- Papalexandratou, Z., Vuyst, L., 2011. Assessment of the yeast species composition of cocoa bean fermentations in different cocoa-producing regions using denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Yeast Res.* 11, 564–574.
- Patharajan, S., Reddy, K.R.N., Karthikeyan, V., Spadaro, D., Lore, A., Gullino, M.L., Garibaldi, A., 2011. Potential of yeast antagonists on invitro biodegradation of ochratoxin A. *Food Control.* 22, 290–296.
- Pereira, G.V. de M., Soccol, V.T., Soccol, C.R., 2016. Current state of research on cocoa and coffee fermentations. *Curr. Opin. Food Sci.* 7, 50–57.
- Pereira, G.V.M., Soccol, V.T., Pandey, A., Medeiros, A.B.P., Andrade Lara, J.M.R., Gollo, A.L., Soccol, C.R., 2014. Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. *Int. J. Food Microbiol.* 188, 60–66.
- Péteri, Z., Téren, J., Vagvolgyi, C., Varga, J., 2007. Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiol.* 24, 205–210.
- Petruzzi, L., Bevilacqua, A., Baiano, A., Beneduce, L., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., 2014a. Study of *Saccharomyces cerevisiae* W13 as a functional starter for the removal of ochratoxin A. *Food Control.* 35, 373–377.
- Petruzzi, L., Corbo, M.R., Baiano, A., Beneduce, L., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A., 2015. In vivo stability of the complex ochratoxin A - *Saccharomyces cerevisiae* starter strains. *Food Control.* 50, 516–520.
- Petruzzi, L., Sinigaglia, M., Corbo, M.R., Campaniello, D., Speranza, B., Bevilacqua, A., 2014b. Decontamination of ochratoxin A by yeasts : possible approaches and factors leading to toxin removal in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 6555–6567.
- Pfliegler, W. P., Pusztahelyi, T., Pócsi, I., 2015. Review Mycotoxins – prevention and decontamination by yeasts. *J. Basic Microbiol.* 1–14.
- Pfohl-leszkowicz, A., Manderville, R.A., 2012. An Update on Direct Genotoxicity as a Molecular Mechanism of Ochratoxin A Carcinogenicity. *Chem. Res. Toxicol.* 252–262.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Manderville, R.A., 2007. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 61–99.

- Pizzolitto, R.P., Armando, M.R., Combina, M., Cavaglieri, L.R., et al., 2012. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains as probiotic agent with aflatoxin B1 adsorption ability for use in poultry feedstuffs. *J. Environ. Sci. Health B.* 47, 933–941.
- Qi, X., Yang, X., Chen, S., He, X., Dweep, H., Guo, M., Cheng, W., Xu, W., Luo, Y., Gretz, N., Dai, Q., Huang, K., 2014. Ochratoxin A induced early hepatotoxicity : new mechanistic insights from microRNA , mRNA and proteomic. *Sci. Rep.* 1–14.
- Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Villalobos, M.C., Calle, A., Serradilla, M.J., Córdoba, M.G., Hernández, A., 2016. Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases. *Food Microbiol.* 57, 45–53.
- Sartori, D., Massi, F. P., Ferranti, L. S., Fungaro, M. H. P., 2013. Identification of Genes Differentially Expressed Between Ochratoxin-Producing and Non-Producing Strains of *Aspergillus westerdijkiae*. *Indian J Microbiol.* 91, 10–14.
- Schatzmayr, G., Heidler, D., Fuchs, E., Nitsch, S., Mohnl, M., Taubel, M., Loibner, A.P., Braun, R., Binder, E.M., 2003. Investigation of Different Yeast Strains for the Detoxification of Ochratoxin A. *Mycotoxin Res.* 19, 124-128.
- Schwartz, G.G., 2002. Hypothesis : Does ochratoxin A cause testicular cancer ? *Cancer Cause Control.* 91–100.
- Shi, H., Li, S., Bai, Y., Prates, L.L., Lei, Y., Yu, P., 2018. Mycotoxin contamination of food and feed in China : Occurrence , detection techniques , toxicological effects and advances in mitigation technologies. *Food Control.* 91, 202–215.
- Souza, M.L. De, Reinis, F., Passamani, F., Luiza, C., Batista, L.R., Schwan, R.F., Silva, C.F., 2017. Use of wild yeasts as a biocontrol agent against toxigenic fungi and OTA production. *Acta Sci. Agron.* 349–358.
- Sun, X.D., Su, P., Shan, H., 2017. Mycotoxin Contamination of Maize in China. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 16, 835–849.
- Zhao, T., Shen, X.L., Chen, W., Liao, X., Yang, J., Wang, Y., Zhao, T., Shen, X.L., Chen, W., Liao, X., Yang, J., Wang, Y., Zou, Y., Fang, C., 2016. Advances in research of nephrotoxicity and toxic antagonism of ochratoxin A. *Toxin Rev.* 1–6.
- Zhu, C., Shi, J., Jiang, C., Liu, Y., 2015. Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* *in vitro* and *in vivo* through antagonistic yeasts. *Food Control.* 50, 125–132.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os problemas associados à contaminação de alimentos e rações por OTA, os riscos à saúde humana e animal e as vantagens na utilização de um método de biocontrole, utilizando leveduras, para diminuir o crescimento de fungos produtores e na aplicação desses microrganismos como agentes de detoxificação para minimizar os níveis de OTA nos alimentos, os resultados deste trabalho são de grande importância nos seguintes aspectos:

- *H. opuntiae* mostrou-se uma levedura muito eficiente no controle biológico de diferentes cepas de *A. ochraceus* em testes *in vitro* e em frutos de café maduros. A ação antagonista desta levedura envolveu diferentes mecanismos de ação.
- *H. opuntiae*, *M. caribbica* e *K. marxianus* mostraram grande potencial para o biocontrole de *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* e *A. carbonarius* produtores de OTA.
- No ensaio de detoxificação *in vitro* as três leveduras foram capazes de detoxificar OTA entre 73,7% e 86,8%.
- *K. marxianus* foi o mais eficiente tanto no controle biológico das diferentes espécies de *Aspergillus* produtoras de OTA quanto na capacidade de detoxificar uma maior concentração de OTA que as demais leveduras.
- O estudo da ação antagonista de novas espécies de leveduras é de grande importância para o desenvolvimento de biofungicidas relevantes, que permitem melhor desempenho e confiabilidade do controle biológico de fungos produtores de OTA.
- Os resultados do ensaio de detoxificação *in vitro*, otimizando diferentes variáveis, podem contribuir para determinar as condições ideais para aplicação de *H. opuntiae*, *M. caribbica* e *K. marxianus* como agentes de detoxificação.

REFERÊNCIAS

- ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R. R. M.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of Ochratoxin A for Food and Feed Decontamination. **Toxins**, v. 2, p. 1078-1099, 2010.
- ABRUNHOSA, L.; SANTOS, L.; VENÂNCIO, A. Degradation of Ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. **Food Biotechnology**, v. 20, p. 231–242, 2006.
- ALBORCH, L.; BRAGULAT, M.R.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Effect of water activity, temperature and incubation time on growth and ochratoxin A production by

Aspergillus niger and *Aspergillus carbonarius* on maize kernels. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, p. 53-57, 2011.

ALDRED, D.; CAIRNS-FULLER, V.; MAGAN, N. Environmental factors affect efficacy of some essential oils and resveratrol to control growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus westerdijkiae* on wheat grain. **Journal Stored of Product Research**, v. 44, p. 341-346, 2008.

ALEO, M.D.; WYATT, R.D.; SCHNELLMANN, R.G. Mitochondrial dysfunction is an early event in ochratoxin A but not oosporein toxicity to rat proximal tubules. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 107, P. 73–80, 1991.

AMEZQUETA, S.; GONZALEZ – PENAS, E.; MURILLO – ARBIZU, M.; DE CERAIN, A.L. Ochratoxin A decontamination: A review. **Food Control**, v. 20, p. 326 - 333, 2009.

ANGIONI, A.; CABONI, P.; GARAU, A.; FARRIS, A.; ORRO, D.; BUDRONI, M. In vitro interaction between Ochratoxin A and different strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2043–2048, 2007.

ARMANDO, M.R.; PIZZOLITTO R.P.; DOGI, C.A.; CRISTOFOLINI A.; MERKIS, C.; POLONI, V.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI L.R. Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, p. 256–264, 2012.

ARMANDO, M. R.; DOGI, C. A.; POLONI, V.; ROSA, C. A. R.; DALCERO, A. M.; CAVAGLIER, L. R. *In vitro* study on the effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Fusarium graminearum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, p. 182–188, 2013.

BASSO, R. F.; ALCARD, A. R., PORTUGAL, C. B. Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations? **Food Research International**, 2016. doi: 10.1016/j.foodres.2016.06.002

BAUTISTA – ROSALES, P.U.; SERVÍN – VILLEGAS, R.; OCHO – ÁLVAREZ, N.A.; RAGAZZO – SÁNCHEZ, J.A. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. **Biological Control**, v. 65, p. 293–301, 2013.

BEAVER, R. W. Decontamination of mycotoxin-containing foods and feedstuffs. **Trends in Food Science & Technology**, July ,p. 170-173, 1991.

BEJAOU, H.; MATHIEU, F.; TAILLANDIER, P.; LEBRIHI, A. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces strains*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 1038–1044, 2004.

BHAT, P. V.; PANDAREESH, A.; KHANUM, F.; TAMATAM, A. Cytotoxic effects

of Ochratoxin A in Neuro-2a cells: role of oxidative stress evidenced by N-acetylcysteine. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016. doi:10.3389/fmicb.2016.01142

BLEVE, G.; GRIECO, F.; COZZI, G.; LOGRIECO, A.; VISCONTI, A. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 204–209, 2006.

BONDY, G. S.; CALDWELL, D. S.; AZIZ, S. A.; COADY, L. C.; ARMSTRONG, C. L.; CURRAN, I. H. Effects of chronic Ochratoxin A exposure on p53 heterozygous and p53 homozygous mice. **Toxicologic Pathology**, v. 43, p. 715–729, 2015.

BOX, G.E.P.; BEHNKEN, D.W. Some new three level design for study of quantitative variables. **Technometrics**, v. 2, p. 455–476, 1960.

BRANDT, M. E.; LOCKHART, S. R. Recent Taxonomic Developments with *Candida* and Other Opportunistic Yeasts. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, p. 170–177, 2012.

BREINIG, F.; TIPPER, D. J.; SCHMITT, M. J. Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. **Cell**, v. 108, p. 395 - 405, 2002.

BUDRONI, M.; ZARA, G.; CIANI, M.; COMITINI, F. Saccharomyces and Non-Saccharomyces Starter Yeasts. **Brewing Technology**, p. 81-100, 2017.

BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, p.140-146, 2007.

BUI – KLIMKE, T. R.; WU, F. Ochratoxin A and human health risk: a review of the evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, p. 1860–1869, 2015.

CABAÑES, F.J.; BRAGULAT, M.R. Ochratoxin A in profiling and speciation. In: VARGA, J.; SAMSON, R.A. **Aspergillus in the Genomic**. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2008, p. 57–70.

CADEZ, N.; POOT, G. A.; RASPOR, P.; SMITH, M.T. *Hanseniaspora meyeri* sp. nov. *Hanseniaspora clermontiae* sp. nov., *Hanseniaspora lachancei* sp. nov. and *Hanseniaspora opuntiae* sp. nov., novel apiculate yeast species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1671–1680, 2003.

CAIRNS-FULLER, V.; ALDRED, D.; MAGAN, N. Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 1215-1221, 2005.

CAPOZZI, V.; FRAGASSO, M.; ROMANIELLO, R.; BERBEGAL, C.; RUSSO, P.; SPANO, G. Spontaneous food fermentations and potential risks for human health. **Fermentation**, v. 3:49, 2017. doi: 10.3390/fermentation 3040049

CAPPOZZO, J.; JACKSON, L.; LEE, H. J.; ZHOU, W.; AL – TAHER, F.; ZWEIGENBAUM, J. Occurrence of Ochratoxin A in infant foods in the United States. **Journal of Food Protection**, v. 80, p. 251–256, 2017.

CARIDI, A.; SIDARI, R.; PULVIRENTI, A.; MECA, G.; RITIENI, A. Ochratoxin A adsorption phenotype : An inheritable yeast trait. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 58, p. 225–233, 2012.

CAST - Council for Agricultural Sciences and Technology - Task Force Report. **Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems**. Ames, Iowa., n.139, 2003, 191p.

CAZZANIGA, D.; BASILICO, J. C.; GONZALEZ, R. J.; TORRES, R. L.; DE GREEF, D. M. Mycotoxins inactivation by extrusion cooking of corn flour. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 144–147, 2001.

CECCHINI, F.; MORASSUT, M.; MORUNO, E.G.; STEFANO, R. Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. **Food Microbiology**, v. 23, p. 411–417, 2006.

CHALFOUN, S.M. Biological Control and Bioactive Microbial Metabolites: A Coffee Quality Perspective. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 1071–1085, 2010.

CHEN, W.; LI, C.; ZHANG, B.; ZHOU, Z.; SHEN, Y.; LIAO, X. Advances in Biotransformation of Ochratoxin A- A Review of the Past Five Decades. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–11, 2018.

CIANI, M.; COMITINI, F.; MANNAZZU, I.; DOMIZIO, P. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-Saccharomyces yeasts in winemaking. **Fems Yeast Research**, v. 10, p. 123–133, 2010.

COELHO, A.R.; TACHI, M.; PAGNOCCA, F.C.; NOBREGA, G.M.A.; HOFFMANN, F.L.; HARADA, K.I.; HIROOKA, E.Y. Purification of *Candida guilliermondii* and *Pichia ohmeri* killer toxin as an active agent against *Penicillium expansum*. **Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment**, v. 26, p. 73–81, 2009.

DAI, Q.; ZHAO, J.; QI, X.; XU, W.; HE, X.; GUO, M. MicroRNA profiling of rats with Ochratoxin A nephrotoxicity. **BMC Genomics**, v. 15, 333. doi: 10.1186/1471-2164-15-333

DE PAIVA, E.; SERRADILLA, M.J.; RUIZ – MOYANO, S.; CÓRDOBA, M.G.; VILLALOBOS, M.C.; CASQUETE, R.; HERNÁNDEZ, A. Combined effect of antagonistic yeast and modified atmosphere to control *Penicillium expansum* infection in sweet cherries cv. Ambrunés. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 276–282, 2017.

DOBRITZSCH, D.; WANG, H.; SCHNEIDER, G.; YU, S. Structural and functional characterization of ochratoxinase, a novel mycotoxin-degrading enzyme. **Biochemical Journal**, v. 462, p. 441–452, 2014.

DUARTE, S.C; LINO, C.M; PENA, A. Ochratoxin A in feed of food-producing animals: An undesirable mycotoxin with health and performance effects. **Veterinary Microbiology**, v. 154, p. 1-13, 2011.

DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. A review on Ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. **Food Microbiology**, v. 27, p. 187–198, 2010.

FARAG, R. S.; RASHED, M. M.; ABO HAGGER, A. A. Aflatoxin destruction by microwave heating. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 47, p. 197–208, 1996.

FERRUFINO-GUARDIA, E.V.; TANGNI, E.K.; LARONDELLE, Y.; PONCHAUT, S. Transfer of ochratoxin A during lactation: exposure of suckling via milk of rabbit does fed a naturally contaminated feed. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, p. 167–175, 2000.

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

FONSECA, G.G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A.K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 339–354, 2008.

FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U. A.; OISTORPE, M. N.; PASSOTH, V.; SCHNURER, J. Influence of ethyl acetate production and ploidy on the anti-mould activity of *Pichia anomala*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 238, p. 133 - 137, 2004.

FREIRE, L.; PASSAMANI, F. R. F.; THOMAS, A. B.; NASSUR, R. C. M. R.; SILVA, L. M.; PASCHOAL, F. N. Influence of physical and chemical characteristics of wine grapes on the incidence of *Penicillium* and *Aspergillus* fungi in grapes and Ochratoxin A in wines. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 181–190, 2017.

FUJII, S.; ONO, E.Y.S.; RIBEIRO, R.M.R; ASSUNÇÃO, F. G. A.; TAKABAYASHI, C. R.; OLIVEIRA, T. R. M.; ITANO, E. Y.; UENO, Y.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y. A comparison between enzyme immunoassay and HPLC for ochratoxin A detection in green, roasted and instant coffee. **Brazilian Archives of Biology And Technology**, v. 50, n. 2, p. 349-359, 2007.

FUNGARO, M. H. P.; MAGNANI, M.; VILAS – BOAS, L. A.; VISSOTTO, P.C.; FURLANETO, M. C.; CARNEIRO, M. L.; TANIWAKI, M. H. Genetic relationships among Brazilian strains of *Aspergillus ochraceus* based on RAPD and ITS sequences. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 988, p. 985–988, 2004.

GAMBUTI, A.; STROLLO, D.; GENOVESE, A.; UGLIANO, M., RITIENI, A., MOIO, L. Influence of enological practices on ochratoxin A concentration in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 56, n. 2, p. 155-162, 2005.

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

GUZZON, R.; FRANCIOSI, E.; LARCHER, R. A new resource from traditional wines: Characterization of the microbiota of “vino santo” grapes as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea*. **European Food Research and Technology**, v. 239, p. 117–126, 2014.

HAMDOUCHE, Y.; GUEHI, T.; DURAND, N.; KEDJEBO, K. B. D.; MONTET, D.; MEILE, J. C. Dynamics of microbial ecology during cocoa fermentation and drying: Towards the identification of molecular markers. **Food Control**, v. 48, p. 117- 122, 2015.

HANIF, N. Q.; MUHAMMAD, G.; SIDDIQUE, M.; KHANUM, A.; AHMED, T.; GADAHAI, J. A. Clinico-pathomorphological, serum biochemical and histological studies in broilers fed Ochratoxin A and a toxin deactivator (Mycofix^R Plus). **British Poultry Science**, v. 49, p. 632–642, 2018.

HARRIS, J. P.; MANTLE, P. G. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 709–716, 2001.

HICKEY, P. W.; SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A. W.; RINALDI, M. G.; WICKES, B. L.; SCHMIDT, H. J. *Trichosporon mycotoxinivorans*, a novel respiratory pathogen in patients with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 3091–3097, 2009.

HONG, J. T.; PARK, K. L.; HAN, S. Y.; PARK, K. S.; KIM, H. S.; OH, S. D. Effects of Ochratoxin A on cytotoxicity and cell differentiation in cultured rat embryonic cells. **Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 61, p. 609–621, 2000.

HUANG, R.; CHE, H. J.; ZHANG, J.; YANG, L.; JIANG, D. H.; LI, G. Q. Evaluation of *Sporidiobolus pararoseus* strain YCXT3 as biocontrol agent of *Botrytis cinerea* on post-harvest strawberry fruits. **Biological Control**, v. 62, p. 53 - 63, 2012.

HUWIG, A.; FREIMUND, S.; KÄPPELI, O.; DUTLER, H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, v. 122, p. 179-188, 2001.

IARC – International Agency for Research on Cancer. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human: some naturally occurring substances, food, items and constitutes, heterocyclic aromatic amines and mycotoxin**. Geneva, v. 56, p. 26-32, 1993.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Revisão: julho/2007.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos- Instituto Adolfo Lutz**, Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: p. 1020, 2008.

JACKSON, L. S.; RYU, D. Summary of the ACS symposium on public health perspectives of mycotoxins in Food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 7017–7020, 2017.

JANISIEWICZ, W.J.; JURICK, W.M.; PETER, K.A.; KURTZMAN, C.P.; BUYER, J.S. Yeasts associated with plums and their potential for controlling brown rot after harvest. **Yeast**, v. 31, p. 207–218, 2014.

JARD, G.; LIBOZ, T.; MATHIEU, F.; GUYONVARC'H, A.; LEBRIHI, A. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. **Food Additives and Contaminants**, v. 28, n. 11, p. 1590–1609, 2011.

JOANNIS-CASSAN, C; TOZLOVANU, M; HADJEBA-MEDJDOUB, K; BALLEST, N; PFOHL-LESZKOWICZ. Binding of zearalenone, aflatoxin B1 and Ochratoxin A by yeast based products: a method for quantification of adsorption performance. **Journal of Food Protection**, v.74, n. 7, p. 1175-1185, 2011.

KABAK, B.; DOBSON, A. D. Biological strategies to counteract the effects of mycotoxins. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 2006–2016, 2009.

KOGAN, G.; KOCHER, A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. **Livestock Science**, v. 109, p. 161-165, 2007.

KWASIBORSKI, A.; BAJJI, M.; RENAUT, J.; DELAPLACE, P.; JIJAKLI, H. Identification of metabolic pathways expressed by *Pichia anomala* Kh6 in the presence of the pathogen *Botrytis cinerea* on apple: new possible targets for biocontrol improvement. **PLoS One**, v. 9, n. 3, e91434, 2014. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0091434>.

LACHANCE, M. A. *Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt. In: Kurtzman CP, Fell JW (eds) **The yeasts: a taxonomic study**, 4th edn. Elsevier, 1998, Amsterdam, pp 227–247.

LANE, M.M.; MORRISSEY, J.P. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, v. 24, p. 17–26, 2010.

LEE, H. J.; RYU, D. Worldwide occurrence of mycotoxins in cereals and cereal-derived food products: public health perspectives of their co-occurrence. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 7034–7051, 2017.

- LI, S.; MARQUARDT, R.R.; FROHLICH, A.A.; VITTI, T.G.; CROW, G. Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 147, p. 82-90, 1997.
- LIEW, W. P.; MOHD – REDZWAN, S. Mycotoxin: its impact on gut health and microbiota. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. 60, 2018. doi: 10.3389/fcimb.2018.00060
- LIM, C. W.; YOSHINARI, T.; LAYNE, J.; CHAN, S. H. Multi-mycotoxin screening reveals separate occurrence of aflatoxins and Ochratoxin A in Asian rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 3104–3113, 2015.
- LIU, J.; SUI, Y.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.; LIU, Y. Review: utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, p. 153–160, 2013.
- LLORENTE, B.; MALPERTUY, A.; BLANDIN, G.; ARTIGUENAVE, F.; WINCKER, P.; DUJON, B. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*. **FEBS Letters**, v. 487, p. 71–75, 2000.
- LIUZZI, V. C.; FANELLI, F.; TRISTEZZA, M.; HAIDUKOWSKI, M.; PICARDI, E.; MANZARI, C. Transcriptional analysis of *Acinetobacter* sp. neg1 capable of degrading Ochratoxin A. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 2162, 2016. doi: 10.3389/fmicb.2016.02162
- LODDER, J.; KREGER – VAN, R. I. J. **The yeasts: a taxonomic study**. NHPC, Amsterdam, 1952.
- LUNARDI, L. U.; FIER, C. B.; ASHIKAGA, F. Y.; MORIOKA, L. R.; FUNGARO, M. H. P. Generation of *Aspergillus carbonarius* mutants by *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation method. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, p. 95–104, 2006.
- MALLY, A.; VOLKEL, W.; AMBERG, A.; KURZ, M.; WANEK, P.; EDER, E.; HARD, G.; DEKANT, W. Functional, biochemical, and pathological effects of repeated oral administration of ochratoxin A to rats. **Chemical Research in Toxicological**, v. 18, p. 1242–1252, 2005.
- MARIN, D. E.; TARANU, I. Ochratoxin A and its effects on immunity. **Toxin Reviews**, v. 34, p. 11–20, 2015.
- MARTINS, F.; MAMEDE, M.E.; SILVA, A. F.; GUERREIRO, J.; LIMA, S.T. Ultraestrutura celular e expressão de proteínas de leveduras *Hanseniaspora* sob efeito do estresse etanólico. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 2017. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.6516>
- MASOUD, W.; CESAR, L. B.; JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. **Yeast**, v. 21, p. 549–556, 2004.

MASOUD, W.; KALTOFT, C. H. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 229 – 234, 2006.

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

MEDINA – CÓRDOVA, N.; LÓPEZ – AGUILAR, R.; ASCENCIO, F.; CASTELLANOS, T.; CAMPA – CÓRDOVA, A. I.; ÂNGULO, C. Biocontrol activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* against phytopathogenic fungi and its ability to inhibit mycotoxins production in maize grain (*Zea mays* L.). **Biological Control**, v. 97, p. 70–79, 2016.

MIGUEL, T. Â.; BORDINI, J. G.; SAITO, GERVÁSI. H.; ANDRADE C. G.T.; ONO, M. A.; HIROOKA, E.Y.; VIZONI, É.; ONO, E Y.S. Effect of fungicide on *Fusarium verticillioides* mycelial morphology and fumonisin B1 production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 293-299, 2015.

MORAES, A.; HOLANDA, V.; ZAHNER, V. Genotypic and Phenotypic Diversity in Tropical Strains of *Aspergillus* spp. (Section Circumdati) Isolated from Insects. **Current Microbiology**, v. 52, p. 261–266, 2006.

NIARÉ – DOUMBO, S.; NORMAND, A.C.; DIALLO, Y.L.; DEMBELÉ, A. K.; THERA, M. A.; DIALLO, D.; PIARROUX, R.; DOUMBO, O.; RANQUE, S. Preliminary study of the fungal ecology at the haematology and medical-oncology ward in Bamako. Mali. **Mycopathologia**, v. 178, n. 1-2, p.103-109, 2014.

N'GUESSAN, K.F.; BROU, K.; JACQUES, N.; CASAREGOLA, S.; DJE, K. M. Identification of yeast during alcoholic fermentation of tchapalo, a traditional sorghum beer from Côte d'Ivoire. **Anton Leeuw**, v. 99, p. 855–864, 2011.

NUNEZ, Y. P.; PUEYO, E.; CARRASCOSA, A. V.; MARTÍNEZ – RODRÍGUEZ, A. J. Effects of aging and heat treatment on whole yeast cells and yeast cell walls and on adsorption of Ochratoxin A in a wine model system. **Journal of Food Protection**, v. 71, p. 1496–1499, 2008.

OLIVEIRA, T. A. S.; DUARTE, E. A. A.; SILVA, R. M.; MOREIRA, Z. P. M.; CARMO, C. O.; LUZ, E. D. M. N. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas. **Relatório de Atividades Potencialmente Poluidoras e Utilizadoras de Recursos Ambientais - RAPP**, v. 23, p. 293-325, 2015.

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

PAPALEXANDRATOU, Z.; VUYST, L. Assessment of the yeast species composition of cocoa bean fermentations in different cocoa-producing regions using denaturing gradient gel electrophoresis. **Fems Yeast Research**, v. 11, p. 564–574, 2011.

PEREIRA, G. V.; BEUX, M.; PAGNONCELLI, M. G. B.; SOCCOL, V.T.; RODRIGUES, C.; SOCCOL, C.R. Isolation, selection and evaluation of antagonistic yeasts and lactic acid bacteria against ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae* on coffee beans. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, p. 96–101, 2016.

PEREYRA, C. M.; CAVAGLIERI, L. R.; KELLER, K. M.; CHIACCHERA, S. M.; ROSA, C. A. D. R.; DALCERO, A. M. *In vitro* Ochratoxin A adsorption by commercial yeast cell walls. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 37, p. 25–28, 2015.

PEREIRA, G. V.; SOCCOL, V.T.; PANDEY, A.; MEDEIROS, A. B. P.; ANDRADE LARA, J.M.R.; GOLLO, A.L.; SOCCOL, C.R. Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 60–66, 2014.

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

PETRUZZI, L.; CORBO, M. R.; BAIANO, A.; BENEDUCE, L.; SINIGAGLIA, M.; BEVILACQUA, A. *In vivo* stability of the complex ochratoxin A - *Saccharomyces cerevisiae* starter strains. **Food Control**, v. 50, p. 516–520, 2015.

PFLIEGLER, W. P.; PUSZTAHELYI, T.; PÓCSI, I. Review Mycotoxins – prevention and decontamination by yeasts. **Journal of Basic Microbiology**, p. 1–14, 2015.

PFOHL- LESZKOWICZ, A.; MANDERVILLE, R.A. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, p. 61-99, 2007.

PFOHL – LESZKOWICZ, A.; MANDERVILLE, R. A. An Update on Direct Genotoxicity as a Molecular Mechanism of Ochratoxin A Carcinogenicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 25, p. 252–262, 2012.

PINOTTI, L.; OTTOBONI, M.; GIROMINI, C.; DELL'ORTO, V.; CHELI, F. Mycotoxin contamination in the EU feed supply chain: a focus on cereal by products. **Toxins (Basel)**, v. 8, n. 45, 2016.

PIOTROWSKA, M.; NOWAK, A.; CZYZOWSKA, A. Removal of Ochratoxin A by wine *Saccharomyces cerevisiae* strains. **European Food Research and Technology**, v. 236, p. 441–447, 2013.

QI, X.; YANG, X.; CHEN, S.; HE, X.; DWEED, H.; GUO, M. Ochratoxin A induced early hepatotoxicity: new mechanistic insights from microRNA, mRNA and proteomic profiling studies. **Scientific Reports**, v. 4, n.163, 2014. doi: 10.1038/srep05163

QIN, X.; XIAO, H.; CHENG, X.; ZHOU, H.; Si, L. *Hanseniaspora uvarum* prolongs shelf life of strawberry via volatile production. **Food Microbiology**, v. 63, p. 205–212, 2017.

QUINTELA, S.; VILLARÁN, M. C.; ARMENTIA, I. L.; ELEJALDE, E. Ochratoxin A removal in wine: A review. **Food Control**, v. 30, p. 439–445, 2013.

RAIOLA, A.; TENORE, G. C.; MANYES, L.; MECA, G.; RITIENI, A. Risk analysis of main mycotoxins occurring in food for children: an overview. **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, p. 169–180, 2015.

RINGOT, D.; CHANGO, A.; SCHNEIDER Y.; LARONDELLE, Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemico-Biological Interactions**, v. 159, p 18–46, 2006.

RODRIGUES, I.; BINDER, E. M.; SCHATZMAYR, G. “Microorganisms and their enzymes for detoxifying mycotoxins posing a risk to livestock animals,” in **Mycotoxin Prevention and Control in Agriculture**, eds M. APPELL, D. F. KENDRA, and M.W. TRUCKSESS, 2009 (Washington, DC: American Chemical Society), p.107–117.

RODRIGUEZ, S. B.; MAHONEY, N. E. Inhibition of aflatoxin production by surfactants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p. 106–110, 1994.

ROUSSEAU, J. Ocratoxina A en los vinos: estado de los conocimientos. **Wine Internet Technical Journal**, v. 17, p. 1–5, 2004.

RUIZ – MOYANO, S.; MARTÍN, A.; VILLALOBOS, M.C.; CALLE, A.; SERRADILLA, M. J.; CÓRDOBA, M. G.; HERNÁNDEZ, A. Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases. **Food Microbiology**, v. 57, p. 45–53, 2016.

RUSTOM, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 57–67, 1997.

SANTOS, A.P.C.; VANDERLINDE, R.; MACHADO, B.A.S.; MAMEDE, M.E.O. Improving production of aromatic compounds by indigenous yeasts in Chenin Blanc grape must. **African journal of agricultural research**, v. 11, p. 2433–2442, 2016.

SARTORI, D.; MASSI, F. P.; FERRANTI, L. S.; FUNGARO, M. H. P. Identification of Genes Differentially Expressed Between Ochratoxin-Producing and Non-Producing Strains of *Aspergillus westerdijkiae*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 91, p. 10–14, 2013.

SAUCEDO – LUNA, J.; CASTRO – MONTOYA, A.J.; MARTÍNEZ – PACHECO, M.M.; SOSA – AGUIRRE, C.R.; CAMPOS – GARCÍA, J. Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from Agave tequilana bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 38, p. 725–732, 2011.

SCOTT, P. M. Industrial and farm detoxification processes for mycotoxins. **Revue de médecine vétérinaire**, v. 149, p. 543–548, 1998.

SCHATZMAYR, G.; HEIDLER, D.; FUCHS, E.; NITSCH, S.; MOHNL, M.; TAUBEL, M.; LOIBNER, A.P.; BRAUN, R.; BINDER, E.M. Investigation of Different Yeast Strains for the Detoxification of Ochratoxin A. **Mycotoxin Research**, v. 19, p. 124–128, 2003.

SCHATZMAYR, G.; ZEHNER, F.; TAUBEL, M.; SCHATZMAYR, D.; KLIMITSCH, A., LOIBNER, A. P. Microbiologicals for deactivating mycotoxins. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, p. 543–551, 2006.

SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2883 - 2894, 2001.

SHEN, X. L.; ZHANG, Y.; XU, W.; LIANG, R.; ZHENG, J.; LUO, Y. An iTRAQ-based mitoproteomics approach for profiling the nephrotoxicity mechanisms of Ochratoxin A in HEK 293 cells. **Journal of Proteomics**, v. 78, p. 398–415, 2013.

SHEN, X. L.; ZHANG, B.; LIANG, R.; CHENG, W.H.; XU, W.; LUO, Y. Central role of Nix in the autophagic response to Ochratoxin A. **Food and Chemical Toxicology**, v. 69, p. 202–209, 2014.

SCHWARTZ, G. G. Hypothesis: does Ochratoxin A cause testicular cancer? **Cancer Causes Control**, v. 13, p. 91–100, 2002.

SCUDAMORE, K.A.; BANKS, J.N.; GUY, R.C.E. Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grain during extrusion. **Food Additives & Contaminants**, v. 21, p. 488–497, 2004.

SCUDAMORE, K.A. Prevention of ochratoxin A in commodities and likely effects of processing fractionation and animal feeds. **Food Additives & Contaminants**, v. 22, p. 17–25, 2005.

SPADARO, D.; DROBY, S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Trends in Food Science & Technology**, v. 47, p. 39–49, 2016.

SPANNO, G.; CAPOZZI, V. Food Microbial Biodiversity and “Microbes of Protected Origin”. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. 237, 2011.

STANDER, M. A.; BORNSCHEUER, U. T.; HENKE, E.; STEYN, P. S. Screening of commercial hydrolases for the degradation of Ochratoxin A. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5736–5739, 2000.

STEENSELS, J.; MEERSMAN, E.; SNOEK, T.; SAELS, V.; VERSTREPEN, K.J. Large - scale selection and breeding to generate industrial yeasts with superior aroma production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, p. 6965–6975, 2014.

STENNSELS, J.; VERSTREPEN, K. J. Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations. **The Annual Review of Microbiology**, v. 68, p. 61–80, 2014.

SUN, X. D.; SU, P.; SHAN, H. Mycotoxin Contamination of Maize in China. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, p. 835–849, 2017.

SUSCA, A.; PROCTOR, R. H.; MORELLI, M.; HAIDUKOWSKI, M.; GALLO, A.; LOGRIECO, A. F. Variation in fumonisin and ochratoxin production associated with differences in biosynthetic gene content in *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae* Isolates from Multiple Crop and Geographic Origins. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1412, 2016. doi: 10.3389/fmicb.2016.01412

VAR, I.; ERGINKAYA, Z.; KABAK, B. Reduction of Ochratoxin A Levels in White Wine by Yeast Treatments. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 115, p. 30–34, 2009.

VARELA, C.; BORNEMAN, A. R. Yeasts found in vineyards and wineries. **Yeast**, v. 34, p. 111–128, 2017.

VAR, I., KABAK, B., ERGINKAYA, Z. Reduction in ochratoxin A levels in white wine, following treatment with activated carbon and sodium bentonite. **Food Control**, v. 19, n. 6, p. 592–598, 2008.

VAUGHAN – MARTINI, A.; KURTZMAN, C. P.; MEYER, S. A.; O'NEILL, E. B. Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascosporic state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* comb. nov. **Fems Yeast Research**, v. 5, p. 463 – 469, 2005.

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

VOSS, K. A.; BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A.; HANNA, M. A.; RYU, D. Reduced toxicity of fumonisin B1 in corn grits by single-screw extrusion. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 10, p. 2036–2041, 2008.

WALKER, G.; MCLEOD, A.; HODGSON, V. Interactions between killer yeast and pathogenic fungi. **FEMS Microbiology**, v. 127, p. 213–222, 1995.

WANG, Y.; PENG, X.; YANG, Z.; ZHAO, W.; XU, W.; HAO, J. iTRAQ Mitoproteome analysis reveals mechanisms of programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* induced by Ochratoxin A. **Toxins (Basel)**, v. 9, n.167, 2017. doi: 10.3390/toxins9050167.

WU, Q.; DOHNAL, V.; HUANG, L.; KUCA, K.; WANG, X.; CHEN, G. Metabolic Pathways of Ochratoxin A. **Current Drug Metabolism**, v. 12, p. 1–10, 2011.

XIAO, H.; MADHYASTHA, S.; MARQUARDT, R.R.; SUZHEN, L.; VODELA, J.K.; FROHLICH, A.A.; KEMPPAINEN, B.W. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure–activity relationships. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v 137, p.182–192, 1996.

XIAO, H.; MARQUARDT, R.R.; FROHLICH, A.A.; LING, Y.Z. Synthesis and Structural Elucidation of Analogs of Ochratoxin A. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 524-530, 1995.

YAMAZAKI, M.; MAEBAYASHI, Y.; MIYAKI, K.; Biosynthesis of ochratoxin A. **Tetrahedron Letter**, v. 25, p. 2301–2303. 1971.

ZHANG, B.; SHEN, X. L.; LIANG, R.; LI, Y.; HUANG, K.; ZHAO, C. Protective role of the mitochondrial Lon protease in Ochratoxin A-induced cytotoxicity in HEK293 cells. **Journal of Proteomics**, v. 101, p. 154–168, 2014.

ZHANG, D.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Selection and evaluation of new antagonists for their efficacy against postharvest brown rot of peaches. **Postharvest Biology and Technology**, v. 55, p. 174 -181, 2010.

ZHAO, Y.; SELVARAJ, J. N.; XING, F.; ZHOU, L.; WANG, Y.; SONG, H.; TAN, X.; SUN, L.; SANGARE, L.; FOLLY, Y. M. E.; LIU, Y. Antagonistic Action of *Bacillus subtilis* Strain SG6 on *Fusarium graminearum*. **PLOS ONE**, v. 9, p. 1-11, 2014.

ZHAO, T.; SHEN, X. L.; CHEN, W.; LIAO, X.; YANG, J.; WANG, Y. Advances in research of nephrotoxicity and toxic antagonism of Ochratoxin A. **Toxin Reviews**, v. 36, p. 39–44, 2017.

ZHENG, J.; ZHANG, Y.; XU, W.; LUO, Y.; HAO, J.; SHEN, X. L. Zinc protects HepG2 cells against the oxidative damage and DNA damage induced by Ochratoxin A. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 268, p. 123–131, 2013.

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