

***Alternaria* spp: Detecção e Avaliação do Potencial Toxígeno em Tomate Pós- Colheita**



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Hélio Tollini
Cláudia Assunção dos Santos Viegas
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana
Diretor-Presidente

José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho
Tatiana Daene de Abreu Sá
Diretores-Executivos

Embrapa Agroindústria de Alimentos

Amauri Rosenthal
Chefe-Geral

Regina Isabel Nogueira
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Marcos Luiz Leal Maia
Chefe Adjunto de Administração



Documentos69

***Alternaria* spp: Detecção e Avaliação do Potencial Toxígeno em Tomate Pós-Colheita**

Otniel Freitas-Silva
Edna Maria Morais Oliveira
Antônio Xavier de Farias
Maria de Lourdes Mendes de Souza

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria de Alimentos

Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
 CEP: 23020-470 - Rio de Janeiro - RJ
 Telefone: (0xx21)2410-9500
 Fax: (0xx21)2410-1090
 Home Page: www.ctaa.embrapa.br
 E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Regina Isabel Nogueira
 Membros: Maria da Graça Fichel do Nascimento
 Maria Ruth Martins Leão
 Neide Botrel Gonçalves
 Ronoel Luiz de O. Godoy
 Virgínia Martins da Matta
 Secretária: Renata Maria Avilla Paldês

Supervisor editorial: Maria Ruth Martins Leão
 Revisor de texto: Comitê de Publicações
 Normalização bibliográfica: Maria Ruth Martins Leão
 Foto da capa: André Guimarães de Souza
 Tratamento de Ilustrações: André Guimarães de Souza
 Editoração eletrônica: André Luis Gomes do Nascimento
 André Guimarães de Souza

1ª edição

1ª impressão (2005): versão on-line

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação - CIP
 Embrapa Agroindústria de Alimentos**

Freitas-Silva, Otniel.

Alternaria spp: detecção do potencial toxígeno em tomate pós-colheita / por Otniel Freitas-Silva ... [et al.] - Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2005.

24 p. ; 21 cm. - (Embrapa Agroindústria de Alimentos. Documentos, ISSN 0103-6068; 69).

1. Micotoxinas 2. Tomate. I. Oliveira, Edna Maria Morais. II. Farias, Antônio Xavier de. III. Souza, Maria de Lourdes Mendes de. IV. Embrapa Agroindústria Alimentos. V. Título VI. Série.

CDD 615.9529 (21. ed.)

© Embrapa, 2005

PITT, J. I.; HOCKING, A. D.(Ed.). **Fungi and food spoilage**. London: Academic Press, 1985

POLLOCK, G. A.; DISABATINO, C. E.; HEIMSCH, R. C.; HILBELINK, D. R. The subchronic toxicity and teratogenicity of alternariol monomethyl ether produced by *Alternaria solani*. **Food Chemistry and Toxicology**, Elmsford, v. 20, n. 5. p. 899-902, 1982

PURCHASE, I. F. H. The acute toxicity of the mycotoxin cyclopiazonic acid to rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 18. p. 114-123, 1971.

RAO, B. L.; HUSAIN, A. Presence of cyclopiazonic acid in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) causing "kodu poisoning" in man and its production by associated fungi. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 89, n. 3, p. 177-180, 1985.

ROTEM, J. Own knowledge of *Alternaria* pathogens and diseases. In: ROTEM, J. **The genus Alternaria: biology, epidemiology, and pathogenicity**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1994.

SCHEFFER, R. P. Ecological and evolutionary roles of toxins from *Alternaria* species pathogenic to plants. In: CHEŁKOWSKI, J.; VISCONTI, A. (Ed.). **Alternaria: biology, plant diseases and metabolites**. In: *Alternaria, Biology, Plant Diseases and Metabolites*. Amsterdam: Elsevier. p. 451-560.

SMITH, J. E.; MOSS, M. O. **Mycotoxins: formation analysis and significance**. Chichester: John Wiley, 1985. p. 32.

STACK, M. E.; PRIVAL, M. J. Mutagenicity of the *Alternaria* metabolites altertoxin I, II y III. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC., v. 52, p. 718-722. 1986.

STEYN, P. S.; RABIE, C. J. Characterization of magnesium and calcium tenuazonate from *Phoma sorghina*. **Phytochemistry**, Elmsford, v. 15, p. 1977-1979, 1976.

TURNER, W. B.; ALDRIDGE, D. C. **Fungal metabolites II**. London: Academic Press. 1983.

TURNER, W.B. **Fungal metabolites**. London: Academic Press, 1971.

UMETSU, N.; KAJI, J.; AYOMA, K.; TAMARI, K. Toxins in blast-diseased rice plants. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 38, n.10, p. 1867-1874, 1974.

HARVAN, D. J.; PERO, R. W. The structure and toxicity of the *Alternaria* Metabolites. **Advances in Chemistry Series**, Washington, DC., v. 149, p. 344-355, 1976.

KING, D.A. ; SHADE, J. E. *Alternaria* toxins and their importance in food. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 47, n. 11, p. 886-901. 1984.

LOGRIECO, A.; BOTTALICO, A.; VISCONTI, A.; VURRO, M. Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in some plant products. **Microbiologie Aliments**, Nutrition, Châtenay-Malabry, v. 6, p. 13-17, 1988.

LOMAX, L. G.; COLE, R. J.; DORNER, J. W. The toxicity of cyclopiazonic acid in weaned pigs. **Veterinary Pathology**, Washington, DC., v. 21, n. 4, p. 418-424. 1984.

MIKAMI, Y.; NISHIJIMA, Y.; IIMURA, SUZUKI, A.; TAKAMURA. S. Chemical studies on brown-spot disease of tobacco plants. Part I. Tenuazonic acid as a vivotoxin fo *Alternaria* lingipes. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 35, n. 4, p. 611-618, 1971.

MONTEMURO, N.; VISCONTI, A. *Alternaria* metabolites, chemical and biological data. In: CHEŁKOWSKI, J.; VISCONTI, A. (Ed.). **Alternaria: biology, plant diseases and metabolites**. Amsterdam: Elsevier, 1992. p. 451-560.

NEERGAARD, P. **Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium***. London: Oxford University Press, 1945. 560 p.

NUEHRING, L. P.; ROWLAND, G. N.; HARRISON. L. R.; COLE, R. J.; DORNER, J. W. Cyclopiazonic acid mycotoxicosis in the dog. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 46, n. 8, p. 1670-1676, 1985.

PEARSON, R. C.; HALL, D. H. Factors affecting the occurrence and severity of blackmold of ripe tomato fruit caused by *Alternaria alternata*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 65, n. 12. p.1352-1359, 1975.

PERO R. W.; POSNER, H.; BLOIS, M.; HARVAN, D. ; SPALDING, H. W. Toxicity of the metabolites produced by the *Alternaria*. **Environmental Health Perspectives**, North Carolina, v. 6, p. 87-94, 1973.

PERO, R. W.; MAIN, C. E. Chlorosis of tobacco induced by alternariol monomethyl ether produced by *Alternaria tenuis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, n. 12, p. 1570-1573, 1970.

Autores

Otniel Freitas-Silva

Eng. Agrôn., M.Sc., Pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, CEP 23.020-470, Rio de Janeiro, RJ.
Telefone: (0xx21) 2410-9645.
E-mail: ofreitas@ctaa.embrapa.br

Edna Maria Morais Oliveira

Eng. Quím., D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, CEP 23.020-470, Guaratiba, Rio de Janeiro, RJ.
Telefone: (0xx21) 2410-9644.
E-mail: edna@ctaa.embrapa.br

Antonio Xavier de Farias

Biól., M.Sc., Pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29.501, Guaratiba, CEP 23020-470, Rio de Janeiro, RJ.
Telefone: (0xx21) 2410-9585.
E-mail: antxafar@ctaa.embrapa.br

Maria de Lourdes Mendes de Souza

Farm., M.Sc., Técnico de Nível Superior da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29.501, Guaratiba, CEP 23020-470, Rio de Janeiro, RJ.
Telefone: (0xx21) 2410-9585.
E-mail: mlourdes@ctaa.embrapa.br

Referências Bibliográficas

- AYRES, J. C.; KRAFT, A. A.; PIERCE, L. C. Delaying spoilage of tomatoes. **Food Technology**, Chicago, v. 18, n. 8, p. 1210-1213, 1964.
- BENNET, J. W.; BENTLEY, R. What's in a name? microbial secondary metabolites. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 34, n. 1, 1989.
- BETINA, V. Mycotoxin as secondary metabolites. In: BETINA, V. (Ed.). **Mycotoxins: chemical, biological and environmental aspects**. Amsterdam: Elsevier, 1989.
- BULLERMAN, L. B. Mycotoxins and food safety. **Food Technology**, Chicago, v. 40, p. 59-66, May, 1986.
- CHU, F. S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 259, p. 291-306, 1991.
- DAVIS, N. D.; DIERNER, U. L.; MORGAN-JONES, G. Tenuazonic acid production by *Alternaria alternata* and *Alternaria tenuissima* isolated from cotton. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC., v. 34, n. 2, p. 155-157, 1977.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W. Y.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press, 1980. v. 2
- DORNER, J. W.; COLE, R. J.; LOMAX, L. G.; GOSSER, H. S.; DIERNER, U. L. Cyclopiazonic acid production by *Aspergillus favus* and its effects on broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC., v. 46, n. 3, p. 698-703, 1983.
- FREITAS-SILVA, O.; TORRES, A. M.; SOUZA, M. L. M.; CORRÊA, T. B. S. **Ocorrência e produção de micotoxinas por isolados de *Alternaria Alternata* em tomate**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2001. 3 p. (Embrapa Agroindústria de Alimentos. Comunicado Técnico, 42).
- GRIFFIN, G. D.; CHU, F. S. Toxicity of the *Alternaria* metabolites alternariol, alternariol methyl ether, altenuene, and tenuazonic acid in the chicken embryo assay. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC., v. 46, p. 1420-1422, 1983.

A concentração das micotoxinas é expressa em $\mu\text{g}/\text{kg}$, sendo calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{concentração de micotoxinas } (\mu\text{g}/\text{kg}) = \frac{V_p C_p M_d}{V_x p}$$

onde:

V_p = volume em μL da solução padrão de micotoxinas que igual ao extrato da amostra.

C_p = concentração da solução padrão de micotoxinas em $\mu\text{L}/\text{mL}$.

M_d = volume em μL da diluição final do extrato da amostra.

V_x = volume em μL da amostra cuja fluorescência coincide com a do volume V_p .

p = peso em g da amostra original contendo o extrato final.

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A detecção e quantificação por CLAE, é feita através da injeção das amostras em cromatógrafo, equipado com detector de ultra violeta. A separação cromatográfica é feita através de uma coluna de fase reversa RP 18, podendo utilizar também uma pré coluna. A fase móvel utilizada é um sistema de gradiente binário composto de acetonitrila-água, de 10 a 20% em 20 minutos para análise de ALT, ATX-I, AOH e AME. Já para o TA a fase móvel utilizada é composta de metanol-água (80:20) com 300mg/L de $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{L}$ (Stack & Prival, 1986). As toxinas são detectadas em 257nm de comprimento de onda. A quantificação é feita por comparação das áreas dos picos que aparecem nos tempos de retenção correspondentes as toxinas analisadas presentes na amostra, com as áreas dos picos das soluções padrões de concentração conhecida.

Apresentação

O gênero *Alternaria* é amplamente distribuído no mundo e ocorre na maioria dos *habitats* naturais. Espécies de *Alternaria* estão entre os mais importantes fitopatógenos, tanto por causar inúmeras doenças em diversas culturas, como pelo seu alto potencial de produção de micotoxinas, as quais podem não somente contaminar os alimentos *in natura*, mas também os seus derivados. As espécies *A. alternata* e *A. solani*, freqüentemente isoladas de tomate pós-colheita, podem produzir micotoxinas [Alternariol (AOH), Alternariol monometil-éter (AME), Altenuene (ALT), Alvertoxina I (ATX-I) e Ácido tenuazônico (TA)]. Neste trabalho são revisados os principais aspectos relacionados à análise, identificação e quantificação de micotoxinas produzidas pelo gênero *Alternaria* spp.

Amauri Rosenthal

Chefe Geral da Embrapa Agroindústria de Alimentos

com 30 mL de hexano em um funil de separação. A fase de metanol-água é extraída duas vezes com 5 mL de clorofórmio, deixando as toxinas solúveis na fase clorofórmica (10mL.). Os extratos são concentrados e secos em evaporador rotatório. (Logrieco et al., 1988)

Extração de TA em frutos de tomate

A extração é efetuada de acordo com o método proposto por Logrieco et al., (1988). A fase etanol-água remanescente da extração de AOH e AME é acidificada com ácido clorídrico concentrado pH 2,0 e extraída duas vezes com 25mL de clorofórmio. Logo, a toxina é extraída desde a fase orgânica combinada com 15mL de bicarbonato de sódio aquoso a 5% e ajustado novamente a pH a 2,0 com ácido clorídrico 1N. O ácido tenuazônico é extraído duas vezes com 15mL de clorofórmio e os extratos combinados são secos em rotaevaporador.

Detecção e quantificação das micotoxinas

Cromatografia de camada delgada (CCD)

Os extratos secos de AOH e AME são ressuspensos em 200 μ L de clorofórmio e 10 μ L são aplicados em linha contínua junto aos padrões das toxinas de concentração conhecida, em placas de silicagel G-60 sem indicador de fluorescência.

Os resíduos secos de TA são ressuspensos em 2mL de clorofórmio e aplicados nas placas de silicagel G-60 junto aos padrões das toxinas de concentração conhecida.

A metodologia e o sistema de solventes empregados para as toxinas AOH, AME e TA é tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (TEF 6:3:1). As toxinas são identificadas tanto por sua fluorescência em luz UV de ondas longas (364 nm), como por comparação dos Rf das amostras em relação aos padrões.

AOH e AME apresentam fluorescência azul. O TA produz uma coloração marron-avermelhado quando as placas são pulverizadas com uma solução de cloreto férrico a 2% em etanol.

A quantificação é feita através da comparação visual com concentrações conhecidas das toxinas padrões em luz UV.

Detecção das Micotoxinas de *Alternaria*

Padrões das toxinas

Os padrões comerciais das toxinas Alternariol (AOH), Alternariol monomethyl-éter (AME), Altenuene (ALT), Ácido tenuazônico (TeA) e Alvertoxina I (ATX-I), são adquiridos de laboratórios confiáveis. As soluções estoque e de trabalho são preparadas através da diluição em Metanol padrão HPLC, onde a concentração 'spot' deve ficar entre 10 a 15ppm.

Determinação da capacidade toxicogênica das espécies de *Alternaria* isoladas

As cepas de *Alternaria* sp previamente identificadas, são semeadas em meio ágar-arroz moído-licor de milho (AM-LM), conforme Tabela-2, e incubadas durante 14 dias a 25 °C.

A extração de AOH, AME, TA, ALT e ATX-I é realizada por agitação do meio AM-LM com 40 mL de água : 60 mL de metanol : 1 mL de ácido clorídrico concentrado em um agitador rotatório durante 1 hora. A mistura é filtrada e extraída duas vezes com 20 mL de clorofórmio. Os extratos orgânicos são combinados e secos em um evaporador rotatório. O resíduo será ressuspensionado em 200 µL de metanol e analisado por TLC, ou HPLC de acordo com a detecção e quantificação das micotoxinas.

Análises das toxinas de *Alternaria*

Extração de AOH , AME, ALT e ATX-I de frutos de tomate

As toxinas são extraídas com 75 mL de metanol a partir de 25g de frutos de tomate triturados e agitados por 2 horas em um agitador automático, permitindo assim a solubilização das toxinas no solvente. O extrato é filtrado a través de papel de filtro (Whatman N° 1) para eliminar o resíduo dos frutos. Em 30 mL do filtrado se agrega 60 mL de sulfato de amônio a 20% para obter a limpeza do extrato. Este filtrado é novamente e desengurdurado

Sumário

| | |
|--|----|
| Introdução | 9 |
| Micotoxinas: Aspectos Gerais | 9 |
| Micotoxicoses | 10 |
| Gênero <i>Alternaria</i> | 11 |
| Micotoxinas Produzidas por <i>Alternaria Alternata</i> | 11 |
| Características das Principais Toxinas de <i>Alternaria</i> | 12 |
| Detecção das Micotoxinas de <i>Alternaria</i> | 12 |
| Padrões das Toxinas | 13 |
| Determinação da Capacidade Toxicogênica das Espécies de <i>Alternaria</i> Isoladas | 13 |
| Análises das Toxinas de <i>Alternaria</i> | 13 |
| Detecção e Quantificação das Micotoxinas | 13 |
| Referências Bibliográficas | 18 |

- **Cepa produtora:** *Alternaria alternata*.
- **Ocorrência natural:** tem sido isolada de girassol, tomate, azeitonas, maçã e sorgo; podendo ser produzida em maçã, laranja, tomate, limão e tangerina quando inoculados com *Alternaria alternata*.
- **Toxicidade:** apresenta atividade citotóxica em bactérias e células de mamíferos. É tóxico para *Bacillus mycoides* numa dose de 125µg/disco, para 21 células D.I₂₅ > com 28µg / mL e, para bactérias Gram positivas ou negativas a doses maiores que 250 µg / disco.

Altertoxina I (ATX I)

- **Características físico-químicas:** seu R_f é de 0,38 utilizando-se o benzeno-metanol-ácido acético (90:5:5) como solvente de corrida. Fluorescente a luz de UV de ondas longas na cor amarelo-alaranjado (Fig. 6).

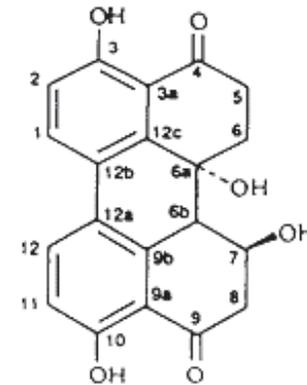


Fig. 6. Altertoxina I (ATX-I)

- **Cepas produtoras:** *Alternaria alternata* e *Alternaria mali*.
- **Ocorrência natural:** apresenta traços encontrados em amostras de alimento balanceado a base de sorgo e em 3 amostras de maçã.
- **Toxicidade:** é tóxico para *Bacillus mycoides* a uma dose de 250 µg/disco e também para células da bÍlis D.I.₅₀ com 20 µg/mL. Apresenta atividade mutagênica. Apresenta atividade antifúngica sobre e, induz a expressão de EBV-EA em célula animal, indicando atividade promotora de tumor (Montemuro & Visconti, 1992).

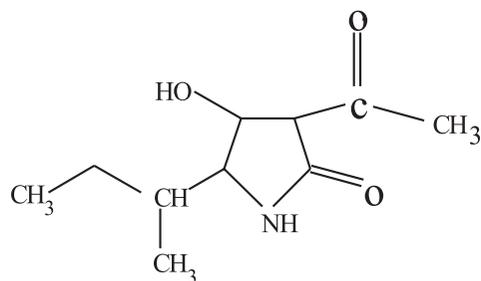


Fig. 4. Ácido tenuazônico

- **Cepa produtora:** *A. alternata*.
- **Ocorrência natural:** tem sido isolada de azeitona, frutos de girassol, tangerina, pimenta, sorgo, tabaco e arroz. A produção de toxina é possível em maçãs, tomate, laranja, limão e tangerina inoculados com *A. alternata*.
- **Toxicidade:** apresenta atividade antiviral, antifúngica e antibacteriana. Com ação antitumoral em células animais. Atua na inibição de um passo da síntese protéica a nível microssomal e está associada com uma enfermidade hematológica humana que ocorre na África (Montemuro & Visconti, 1992).

Altenuene (ALT)

- **Características físico-químicas:** é solúvel em acetona, metanol, tetrahidrofurano e insolúvel em benzeno, hexano e água. Fluorescente (azul celeste) sob luz UV. Sua R_f é de 0,26 usando como solvente de corrida TEF (6:3:1), conforme Fig. 5.

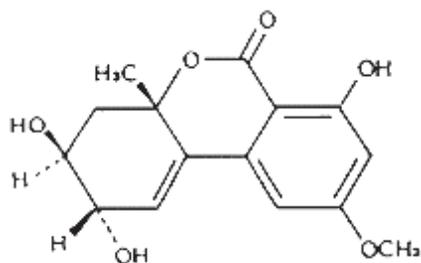


Fig. 5. Altenuene (ALT)

***Alternaria* spp: Detecção e Avaliação do Potencial Toxígeno em Tomate Pós-Colheita**

Otniel Freitas-Silva

Edna Maria Morais Oliveira

Antônio Xavier de Farias

Maria de Lourdes M. de Souza

Introdução

A contaminação por fungos em produtos agrícolas, pode ocorrer no campo, durante e após a colheita no processamento, transporte e armazenagem. Além de representar considerável perda econômica, a proliferação de fungos nos vegetais pode representar um risco potencial para o homem e animais, por exposição aos metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos, as micotoxinas.

A presença de fungos e de seus metabólitos tóxicos tem sido relatada em produtos "*in natura*" e em alimentos processados para humanos e animais. As micotoxinas são tóxicas para vegetais (Mikami, et al., 1971; Umetsu, et al., 1974; Pero & Main, 1970), animais (Purchase, 1971; Davis et al., 1977; Pollock et al., 1982; Dorner et al., 1983; Lomax et al., 1984; Nuehring et al., 1985) e humanos (Stein & Rabie, 1976; Rao & Husain, 1985).

Dentre os vegetais passíveis de contaminação, estão os tomates, altamente susceptíveis a *Alternaria* spp, um dos principais patógenos da cultura, na pré e pós-colheita. Em frutos de tomate a contaminação se dá principalmente nas regiões de rompimento do fruto e nas injúrias (Ayres et al., 1964; Pearson & Hall, 1975).

Mesmo conhecendo a toxicidade, o mecanismo de contaminação, e proliferação dos fungos produtores de Alternariol (AOH), Alternariol monometil-éter (AME), Altenuene (ALT), Altertoxina I (ATX-I) e Ácido tenuazônico (TA), toxinas produzidas principalmente por *Alternaria spp.*

No Brasil, as iniciativas para estudos sobre os efeitos destas micotoxinas em frutos de tomate e o potencial de risco para a saúde pública ainda são incipientes (Freitas-Silva et al., 2001).

Micotoxinas: Aspectos Gerais

Certas espécies de fungos produzem em grãos, sementes e frutos substâncias tóxicas que recebem o nome genérico de “micotoxinas”. Estas são metabólitos secundários que não cumprem uma regra na fisiologia do organismo que os produz e não estão presentes no organismo que os sintetiza durante todo seu ciclo de vida. Se caracterizam por serem sintetizadas depois da fase exponencial de crescimento do fungo, as vezes associado a mudanças morfogênicas, como a esporulação. Por isso, alguns autores sugerem que estes compostos cumprem um papel ecológico na natureza (Turner, 1971; Turner & Aldridge, 1983).

Os metabólitos secundários de origem fúngica são substâncias de estrutura química extremamente diversa, produzidos por grupos taxonômicos restritos e sintetizados por diferentes vias a partir de um ou mais metabólitos gerais provenientes do metabolismo primário (Bennet & Bentley, 1989). Tais compostos têm um baixo peso molecular e podem agrupar-se em famílias de compostos relacionados (Chu, 1981). Com base na taxonomia química, os metabólitos secundários se classificam dentro de 7 grupos. Três dos quais envolve diretamente o acetil coenzima-A, e incluem os derivados dos ácidos graxos, os terpenos e esteróides e os poli-carbonilados. Outros grupos compreendem os metabólitos em cujo caminho biosintético não intervêm o acetato (são os derivados dos intermediários do ciclo dos ácidos tricarbóxicos) e os metabólitos derivados de aminoácidos. Por último, existe uma categoria de compostos não classificados, porque apresentam origem mista ou não se conhece completamente sua origem (Betina, 1989).

Alternariol monometil éter (AME)

• **Características físico-químicas:** é solúvel em clorofórmio e etanol e insolúvel em benzeno e hexano. Fluorescente em azul quando submetido a luz UV de ondas longas. Seu R_f é de 0,66 usando como solvente de corrida TEF (6:3:1); estas propriedades resultam de utilidade para sua identificação e quantificação (Fig. 3).

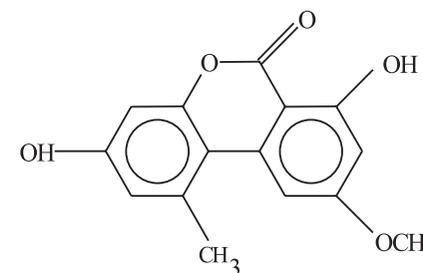


Fig. 3. Alternariol Monometil éter (AME)

- **Cepas produtoras:** *A. alternata*, *A. dauci* e *A. cucumerina*.
- **Ocorrência natural:** têm sido isolada dos mesmos substratos naturais que AOH. Pode ser produzida em maçã, tomate, laranja e limão inoculados com *Alternaria alternata*.
- **Toxicidade:** apresenta atividade citotóxica em células bacterianas e de mamíferos (Harvan & Pero, 1976); inibe *Bacillus mycoides* a uma dose de 500 $\mu\text{g}/\text{disco}$. Foi observado que AME possui atividade mutagênica e quando associada a AOH, apresenta um efeito tóxico sinérgico (King & Shade, 1984).

Ácido tenuazônico (TA)

• **Caraterísticas físico-químicas:** é solúvel em metanol, etanol e clorofórmio e insolúvel em hexano. Para sua detecção se realiza um rociado de la placa cromatográfica com cloreto ferrico à 2%, desta forma o TA apresenta uma coloração marrom-avermelhado (Fig. 4).

Características das Principais Toxinas de *Alternaria*

As principais características das toxinas de *Alternaria* detectadas naturalmente em alimentos são:

Alternariol (AOH)

● **Características físico-químicas:** é solúvel em metanol e clorofórmio e insolúvel em hexano e benzeno. Fluorescente na cor azul sob luz ultravioleta (UV) de ondas longas. Seu R_f é de 0,52 usando o tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (TEF - 6:3:1) como solvente de corrida; estas propriedades são utilizadas para sua identificação e quantificação (Fig. 2).

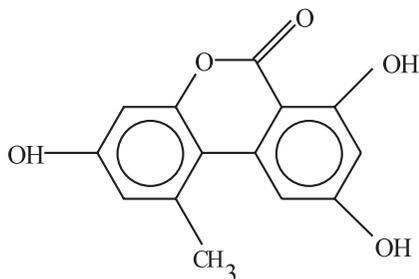


Fig. 2. Alternariol (AOH)

- **Cepas produtoras:** *A. alternata*, *A. dauci*, *A. solani* e *A. tenuissima*.
- **Ocorrência natural:** têm sido isolada de azeitonas, frutos de girassol, pimenta, tomate, tangerina, maçã, sorgo, trigo, centeio, aveia e cevada. A toxina pode ser produzida em maçã, tomate, citros e pão inoculados com *A. alternata*.
- **Toxicidade:** suprime o crescimento de *Staphylococcus aureus* a 25 $\mu\text{g/mL}$ e de *Escherichia coli* a 50 $\mu\text{g/mL}$; é teratogênico e fetotóxica para ratos inoculados com uma dose de 100 $\mu\text{g/Kg}$. Associada a AME se observa um efeito teratogênico/fetotóxico (Montemuro & Visconti, 1992).

Muitos fungos capazes de produzir micotoxinas, que crescem em condições de umidade, pH e temperatura adequados são contaminantes freqüentes em produtos agropecuários e alimentos derivados.

A invasão de um substrato por fungos toxicogênicos pode se dar em distintos estádios de desenvolvimento da planta, no campo, no armazenamento ou durante o processamento.

A presença do fungo produtor de toxina no alimento não implica na possibilidade de encontrar a toxina nele. Por outro lado, a ausência de fungos toxicogênicos não garante que o alimento está livre de micotoxinas, devido a sua persistência durante muito tempo após o desaparecimento do fungo. Em alguns produtos agropecuários, as toxinas são produzidas antes da colheita e permanecem no alimento durante muitos anos (Bullerman, 1986).

Um dos principais problemas da presença de micotoxinas em produtos vegetais são as perdas econômicas que estas originam. A Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação estima que, cada ano, 25 % da produção agrícola destinada a alimentos é afetada por micotoxinas.

Micotoxicoses

São doenças não infecciosas, nem contagiosas, que se apresentam de forma isolada. Não respondem a tratamentos por drogas, antibióticos ou vitaminas. Esta enfermidade é produzida por ingestão direta dos vegetais contaminados, denominada então de "micotoxicose primária". Quando se consome carne ou leite proveniente de animais que consumiram alimentos contaminados, a enfermidade que se produz é denominada de "micotoxicose secundária" (Fig. 1).

Os tipos de infecções produzidas em homens e animais podem ser crônicas ou agudas e seu efeito mais severo é a carcinogenicidade. (Pitt & Hocking, 1985; Smith & Moss., 1985).

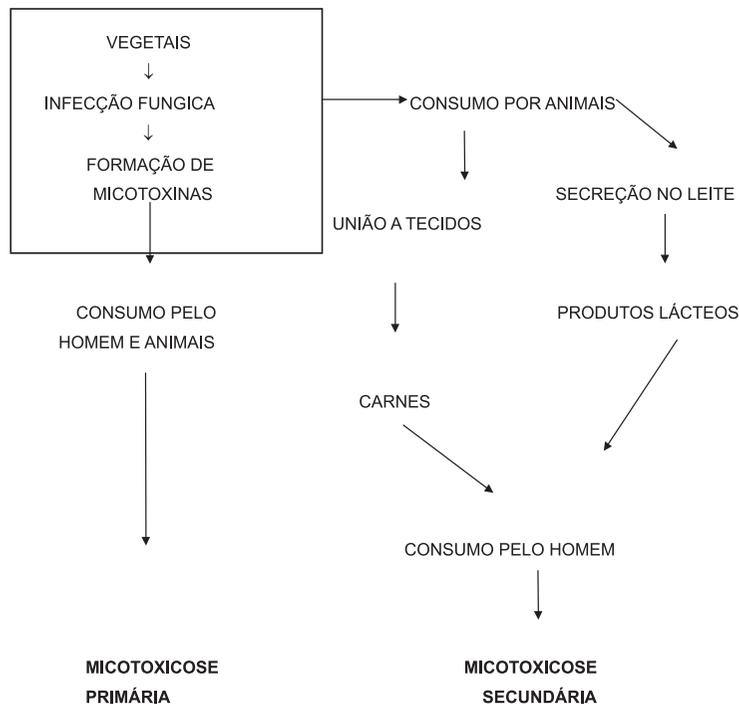


Fig. 1. Micotoxicoses primária e secundária

Gênero *Alternaria*

Nees estabeleceu em 1817, que *Alternaria* é um gênero dictiospórico da família Demateaceae, ordem Hyphomycetes, tendo como espécie tipo *Alternaria alternata* (originalmente *Alternaria tenuis*). Este gênero está amplamente distribuído na natureza, tanto em cultivos agrícolas, como no solo, na poeira ambiental e na matéria orgânica em decomposição. Produz conídios grandes, pluricelulares com septos transversais e longitudinais dispostos em forma acropetal em cadeias e, com frequência, em forma solitária no ápice dos conidióforos, indistinguíveis das hifas somáticas (Rotem, 1994).

Algumas espécies deste gênero são cosmopolitas e aparecem principalmente como fungos saprofitos no campo ou durante o armazenamento, enquanto que outras espécies são parasitas de plantas e têm especificidade com o hospedeiro, algumas espécies ocupam uma posição intermediária que se manifesta por uma alteração da vida saprofítica a parasítica, quando se deparam com um hospedeiro susceptível (Neergaad, 1945; Domsch et al., 1980; Rotem, 1994).

A. alternata é possivelmente, a espécie fúngica mais cosmopolita, se encontra em todo o mundo, tanto em climas temperados como em tropicais. Esta espécie cresce como saprofita nas superfícies de raízes, folhas, sementes e outras partes da planta. O fungo é persistente, os esporos secos sobrevivem facilmente por até um ano e os conídios nas superfícies são viáveis por muitos anos (Domsch et al., 1980).

A. alternata habita nas superfícies de folhas e frutos, sendo assim considerado um parasito de tecidos vivos, por viver a custas de seus nutrientes. Quando o tecido vegetal amadurece e morre, o fungo invade os tecidos e continua crescendo como saprófita (Scheffer, 1992).

Micotoxinas Produzidas por *Alternaria alternata*

As espécies do gênero *Alternaria* produzem cerca de 70 metabólitos secundários, a maioria são produzidos por *A. alternata*. Estes metabólitos podem ser agrupados de acordo com as seguintes classes estruturais: dibenzopironas, ácidos tetrâmicos, quinonas, peptídeos e lactonas (King & Shade, 1984). Destas toxinas somente 7 são principais e pertencem a 3 classes químicas diferentes, apresentando um potencial risco toxicogênico, sendo conhecidas como possíveis contaminantes dos alimentos. Estas são alternariol (AOH), alternariol monometil-éter (AME) e altenuene (ALT), derivados das benzopironas; ácido tenuazônico (TA) um derivado do ácido tetrâmico e as altertoxinas I, II e III (ATX I, ATX II, ATX III) derivado dos perilenos (Pero et al., 1973; Stack & Prival, 1986; Griffin & Chu, 1987).