

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Márcia Gabriela D'Elia Bellos

Avaliação de *Bacillus velezensis* como Agente de Biocontrole de Fungos
Toxigênicos e Fitopatogênicos em Uvas

Porto Alegre, RS, Brasil
2024

Márcia Gabriela D'Elia Bellos

Avaliação de *Bacillus velezensis* como Agente de Biocontrole de Fungos
Toxigênicos e Fitopatogênicos em Uvas

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Orientador: Juliane Elisa Welke
Co-orientador: Adriano Brandelli

Porto Alegre, RS, Brasil

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Bellos, Márcia Gabriela

Avaliação de *Bacillus velezensis* como Agente de Biocontrole de Fungos Toxigênicos e Fitopatogênicos em Uvas / Márcia Gabriela Bellos. -- 2024.

85 f.

Orientadora: Juliane Elisa Welke.

Coorientadora: Adriano Brandelli.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. *Bacillus velezensis*. 2. controle biológico de fungos em uva. 3. *Aspergillus*. 4. micotoxinas. 5. *Botrytis cinerea*. I. Welke, Juliane Elisa, orient. II. Brandelli, Adriano, coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Márcia Gabriela D'Elia Bellos

Avaliação de *Bacillus velezensis* como Agente de Biocontrole de Fungos Toxigênicos e Fitopatogênicos em Uvas

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Juliane Elisa Welke

Co-orientador: Adriano Brandelli

Aprovada em: 06/08/2024.

BANCA EXAMINADORA:

Orientadora doutora Juliane Elisa Welke
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Co-orientador doutor Adriano Brandelli
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Membro da banca: doutora Patrícia da Silva Malheiros
Membro PPGCTA /UFRGS

Membro da banca: doutora Ana Carolina Ritter
Membro ICTA /UFRGS

Membro da banca doutora Karla Joseane Perez
Membro externo Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS)

DEDICATÓRIA

A Enzo Gabriel D'Elia Thoen e
Isaías Ullmann Thoen por todo apoio e
compreensão

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão, primeiramente, aos meus orientadores, especialmente a Juliane. Aos colegas do meu grupo de pesquisa, em particular: Flávio, Vanessa, Rafaela, Karolina e Athus, que me apoiaram e incentivaram a continuar.

Agradeço também aos colegas do laboratório "218", sempre prontos para ajudar, especialmente Carolini, Henrique e Naiara.

Sou grata aos colegas do Núcleo Técnico Científico (NTC), que estiveram sempre disponíveis para esclarecer minhas inúmeras dúvidas.

Às minhas amigas Priscilla Reque, Camy e Joaninha, pelo apoio constante, motivação e ajuda no dia a dia. Minhas colegas e professora do yoga, que contribuíram para meu bem-estar.

Aos meus vizinhos Elissa, Felipe e Téo, por estarem sempre presentes, me ouvindo e motivando diariamente.

À minha chefia e direção do ICTA pelo suporte e compreensão durante todo o processo.

RESUMO

A uva é uma fruta conhecida por seus atributos únicos de sabor e aroma. No entanto, a contaminação fúngica pode prejudicar a qualidade sensorial das uvas, como também comprometer a produtividade. Além disso, alguns fungos podem produzir metabólitos tóxicos que comprometem a segurança do alimento. O método convencional para inibir o crescimento dos fungos é através da aplicação de fungicidas sintéticos, os quais também podem causar efeitos desfavoráveis à saúde e danos ao meio ambiente. Diante dessas circunstâncias, torna-se necessário buscar novas alternativas que sejam mais seguras e sustentáveis, como agentes de biocontrole. Este trabalho teve como objetivo propor a utilização de quatro estirpes de *Bacillus velezensis*, provenientes da região amazônica do Brasil, para controlar fungos que comumente acometem a viticultura, como *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum* e espécies de *Aspergillus*. Além disso, testou-se o efeito das cepas sob a síntese de micotoxinas produzidas pelos fungos toxigênicos. Os resultados demonstraram um efeito significativo sob a inibição do crescimento fúngico, sob a germinação de esporos e a formação de estruturas reprodutivas *in vitro*. Houve uma inibição do crescimento micelial de *B. cinerea* e *C. acutatum* entre 97 e 100% quando as 4 estirpes foram usadas a $1,0 \times 10^7$ UFC/mL. Quando as estirpes foram avaliadas a $1,0 \times 10^9$ UFC/mL verificou-se a supressão total do crescimento micelial e germinação de esporos dos 5 fungos em estudo. As quatro estirpes de *B. velezensis* também causaram uma redução significativa da germinação de esporos fúngicos, que variou de 66 a 92%. Em uvas, houve a redução notável do crescimento fúngico e a redução da síntese de micotoxinas a níveis não detectáveis. As quatro cepas de *B. velezensis* suprimiram totalmente o crescimento de *C. acutatum*, que foi o fungo mais sensível a essas bactérias no experimento em uvas, enquanto *A. flavus* demonstrou ser o mais resistente. A combinação das estirpes proporcionou uma inibição completa dos cinco fungos avaliados, indicando um grande potencial para o desenvolvimento de bioprodutos antifúngicos que promovam uma vitivinicultura sustentável e de alta qualidade.

Palavras-chave: uva, biocontrole, *Bacillus*, micotoxinas, ocratoxina A, aflatoxina, biofungicida.

ABSTRACT

Grapes are a fruit known for their unique flavor and aroma attributes. However, fungal contamination can impair the sensory quality of grapes and compromise productivity. Additionally, some fungi can produce toxic metabolites that jeopardize food safety. The conventional method for inhibiting fungal growth is through the application of synthetic fungicides, which can also have adverse effects on health and cause environmental damage. Given these circumstances, it is necessary to seek new alternatives that are safer and more sustainable, such as biocontrol agents. This study aimed to propose the use of four *Bacillus velezensis* strains from the Amazon region of Brazil to control fungi commonly affecting viticulture, such as *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, and *Aspergillus* species. Additionally, the effect of these strains on the synthesis of mycotoxins produced by toxigenic fungi was tested. The results demonstrated a significant effect on the inhibition of fungal growth, spore germination, and the formation of reproductive structures in vitro. Mycelial growth inhibition of *B. cinerea* and *C. acutatum* ranged from 97 to 100% when the four strains were used at 1.0×10^7 CFU/mL. When the strains were evaluated at 1.0×10^9 CFU/mL, total suppression of mycelial growth and spore germination of the five fungi under study was observed. The four *B. velezensis* strains also caused a significant reduction in fungal spore germination, ranging from 66 to 92%. In grapes, there was a noticeable reduction in fungal growth and a reduction in mycotoxin synthesis to non-detectable levels. The four *B. velezensis* strains completely suppressed the growth of *C. acutatum*, which was the most sensitive fungus to these bacteria in the grape experiment, while *A. flavus* proved to be the most resistant. The combination of strains provided complete inhibition of the five fungi evaluated, indicating great potential for the development of antifungal bioproducts that promote sustainable and high-quality viticulture.

Keywords grape, biocontrol, *Bacillus* spp., mycotoxins, ochratoxin A, aflatoxin, biofungicide

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fungo <i>Colletotrichum acutatum</i> em meio Ágar Batata Dextrose (BDA) cultivado 25 °C por 7 dias.....	15
Figura 2 - Podridão da uva madura causada por <i>Colletotrichum</i> spp. em cachos de uva (a,b)	15
Figura 3 - <i>Botrytis cinerea</i> em meio BDA cultivada 20°C por 14 dias e uva bordô inoculada artificialmente com <i>B. cinerea</i> , incubado a 20 °C por 14 dias	17
Figura 4 - Cacho de uva coletado em meio Atlântico nos EUA contaminada com o fungo <i>B. cinerea</i>	18
Figura 5 – Cachos de uva contaminados com espécies de <i>Aspergillus</i> sp.	19
Figura 6 – <i>Aspergillus niger</i> em meio BDA cultivada 25 °C por 7 dias e uva bordô inoculada artificialmente com <i>A. niger</i> , incubado a 25 °C por 7 dias.....	21
Figura 7 – <i>A. westerdijkiae</i> em meio BDA cultivada 25°C por 7 dias e uva bordô inoculada artificialmente com <i>A. westerdijkiae</i> , incubado a 25°C por 7 dias	22
Figura 8 - <i>Aspergillus flavus</i> em meio BDA cultivada 25°C por 7 dias e uva bordô inoculada artificialmente com <i>A. flavus</i> , incubado a 25°C por 7 dias	23
Figura 9 - Estrutura química da ocratoxina A (OTA)	27
Figura 10 - Estrutura química da ocratoxina B (OTB)	27
Figura 11 - Estrutura química da ocratoxina C (OTC)	28
Figura 12 - Estrutura química das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.....	29
Figura 13 - Contaminação por aflatoxina B1 em diferentes géneros alimentícios e alimentos para animais (%) comunicada na União Europeia em 2021 (Sistema de alerta rápido para géneros alimentícios e alimentos para animais, 2021).....	30
Figura 14 - Classes de pesticidas que são mais comumente utilizadas para controlar pragas e doenças em diferentes fases do cultivo da uva.....	32
Figura 15 - Representação esquemática dos mecanismos antifúngicos das espécies de <i>Bacillus</i>	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	OBJETIVOS	11
1.1.1	Objetivo Geral	11
1.1.2	Objetivos Específicos	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	UVAS.....	12
2.2	FUNGOS EM UVA	13
2.2.1	<i>Colletotrichum acutatum</i>.....	14
2.2.2	<i>Botrytis cinerea</i>.....	16
2.2.3	<i>Aspergillus</i> sp.	18
2.3	MICOTOXINAS	24
2.3.1	Ocratoxinas	26
2.3.2	Aflatoxinas.....	29
2.4	USO DE FUNGICIDAS EM UVAS.....	31
2.5	MÉTODOS DE BIOCONTROLE E BACILLUS.....	33
2.5.1	<i>Bacillus</i> na inibição da síntese de micotoxinas	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4	ARTIGO CIENTÍFICO	43
5	DISCUSSÃO GERAL.....	75
6	CONCLUSÃO	77

1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva da uva e seus derivados enfrenta prejuízos significativos anualmente devido à presença de fungos em todas as fases do processo produtivo. Muitos gêneros e espécies de fungos podem causar prejuízos nos vinhedos, com destaque para *Botrytis cinerea* e *Glomerella cingulata* e espécies do gênero *Aspergillus*, entre outros como *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* (Ferranti *et al.*, 2018), *Penicillium*, *Rhizopus* e *Colletotrichum* (Welke, 2019). Ainda, existe uma grande preocupação em relação aos fungos *Aspergillus* spp., como o *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus westerdijkiae* que podem ser produtores de micotoxinas. As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos para seres humanos e animais. Entre as principais micotoxinas produzidas por esses fungos estão as aflatoxinas (AFs) e as ocratoxinas (OTs). As AFs são classificadas como carcinogênicas para os seres humanos (grupo 1) e ocratoxina A (OTA) está no grupo 2B, entre os compostos possivelmente cancerígenos para humanos (grupo 2B) segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) (IARC, 1993, 2012; Ostry *et al.*, 2017).

A utilização de fungicidas sintéticos têm sido a principal estratégia de controle destes micro-organismos. No entanto, o emprego desses produtos químicos pode causar danos ao meio ambiente, resistência do fungo e tem sido associado a algumas doenças em animais e humanos. Deste modo, uma alternativa para minimizar os agravos causados pelo uso indiscriminado de fungicidas sintéticos são os agentes de controle biológico, que também podem ser chamados de micro-organismos antagonistas (Otoguro; Suzuki, 2018; Zhou *et al.*, 2020).

A prática do uso dos micro-organismos antagonistas para o controle de doenças fúngicas têm emergido como uma solução eficaz, mais segura e sustentável para o meio ambiente, por estes motivos têm sido melhor aceitas pelos consumidores. As leveduras, fungos e bactérias são exemplos destes agentes de controle biológico (Gembloux Agro-Bio Tech, ULiege (University of Liège), Belgium *et al.*, 2021; Shafi; Tian; Ji, 2017).

As bactérias do gênero *Bacillus* spp. possuem características distintas, tais como serem Gram-positivas, aeróbicas e formadoras de endósporos, o que as destacam como agentes de controle biológico de fungos. Além disso, muitas dessas bactérias são reconhecidas como seguras ("*Generally Recognized as Safe*" - GRAS)

pela FDA (*Food and Drug Administration*) (Gembloux Agro-Bio Tech, ULiege (University of Liège), Belgium *et al.*, 2021; Shafi; Tian; Ji, 2017).

Portanto, a fim de reduzir os possíveis danos causados à saúde e ao meio ambiente pelo uso dos fungicidas sintéticos, este trabalho propõe a utilização de um método de biocontrole a partir de cepas de *Bacillus velezensis*, provenientes do intestino de peixes nativos da região amazônica do Brasil, para inibir o desenvolvimento de fungos toxigênicos (*A. niger*, *A. flavus* e *A. westerdijkiae*) e fungos causadores das doenças podridão da uva madura e podridão cinzenta, *Colletotrichum acutatum* e *Botrytis cinerea*, respectivamente, bem como avaliar o efeito das estirpes de *Bacillus* na produção de micotoxinas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de quatro estirpes de *Bacillus velezensis* como estratégia de biocontrole de fungos em uvas, bem como na prevenção da produção de micotoxinas.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Verificar o potencial antifúngico de *Bacillus velezensis* P1, P7, P11 e P45 sobre o desenvolvimento dos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum acutatum* em meio de cultura e em uva;
- Avaliar o potencial das estirpes de *B. velezensis* sobre o crescimento micelial dos fungos *in vitro*;
- Examinar o efeito das estirpes de *B. velezensis* sobre a germinação de esporos;
- Mensurar a capacidade das bactérias antagonistas em suprimir a síntese de OTs e AFs em uvas;
- Verificar o efeito da combinação das cepas *Bacillus* na efetividade do controle das doenças fúngicas em uva.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 UVAS

As cultivares de uva (híbridos *Vitis vinifera* L. e *V. vinifera* com *V. labrusca* L. e *V. amurensis* Rupr.) pertencem à família *Vitaceae* de plantas lenhosas perenes decíduas, sendo uma das frutas não climatéricas mais consumidas em todo o mundo (Romero *et al.*, 2020). A cultivar *Vitis labrusca* tem como principais representantes as uvas tintas Isabel, Bordô, Concord entre outras, que destacam-se pela comercialização *in natura*, para produção de suco e vinhos de mesa (Veras *et al.*, 2021).

Em 2022 a produção mundial de uva foi superior a 77 milhões de toneladas, destas, 47,8% foi destinada para uva de mesa, 8% para uva seca e 44,2% para vinho (International Organisation of Vine and Wine - OIV, 2022). Deste montante, a produção de uva de mesa (*Vitis labrusca*) girou em torno de 31 milhões de toneladas, sendo a China, Índia e Turquia como os principais produtores (Statistics Department of the International Organisation of Vine and Wine (OIV), 2022). Para 2023 estimou-se uma redução da produção de vinho devido aos efeitos causados pelas condições climáticas extremas, como secas e inundações nas áreas de produção da uva (Revista Adega, 2024). Neste mesmo ano, o Brasil produziu em torno de 1 721,5 mil toneladas. Em relação ao consumo médio per capita de uva *in natura* em 2022, os EUA consumiram 4 Kg, Brasil 3,5 Kg e França 2,3 Kg (International Organisation of Vine and Wine - OIV, 2022).

A uva apresenta aspecto notável dentre as outras frutas por suas características sensoriais (aparência, cor, textura, sabor e aroma). Bem como, o seu alto valor nutricional sendo uma fonte de vitaminas, minerais, antioxidantes e fibras. O teor de açúcares, acidez, compostos fenólicos e outros constituintes químicos são influenciados pelo estágio de maturação, que interferirá diretamente no sabor, no aroma e na cor dos vinhos produzidos (Askari-Khorasgani; Pessarakli, 2019a, 2019b; Rouxinol *et al.*, 2023).

Em razão de sua composição, a uva é altamente perecível, sendo o seu amadurecimento influenciado por vários fatores internos, como a estrutura e consistência da casca e da polpa, a taxa de maturação, além de fatores externos, sendo a temperatura e a umidade relativa os mais significativos para a incidência de fungos (Romero *et al.*, 2020).

2.2 FUNGOS EM UVA

A uva é uma fruta não climatérica, o que significa que deve ser colhida quando já está madura. Isso, por sua vez, cria condições favoráveis à proliferação de fungos. A infecção causada por fungos pode ter início no campo, persistir durante a colheita e estender-se até a fase pós-colheita (Kgang *et al.*, 2023). Essa susceptibilidade abrange todas as partes da videira, incluindo caule, flores, folhas e, especialmente, os frutos (Solairaj *et al.*, 2021).

As condições climáticas, especialmente relacionadas à precipitação pluviométrica distribuída ao longo do crescimento vegetativo da videira, bem como a amplitude térmica estão relacionados com a maior incidência de fungos (Welke, 2019). Além disso, condições inadequadas de armazenamento, transporte, demora para o processamento ou consumo *in natura* podem potencializar a perda da qualidade da uva e a redução da produtividade (Abbey *et al.*, 2019).

A presença de fungos patogênicos na viticultura pode causar impactos negativos na qualidade das uvas, interferindo de forma desfavorável no perfil de compostos aromáticos (Veras *et al.*, 2021); ocasionar alterações no aspecto visual (escurecimento em uvas brancas e perda de cor em uvas tintas). Além disso, os fungos têm o potencial de modificar a composição química e conseqüentemente o valor nutricional (Solairaj *et al.*, 2021), e ainda, podem interferir na composição de alguns compostos desejados como polifenóis, antocianinas e resveratrol (Otoguro; Suzuki, 2018).

Em vinhos produzidos com uvas contaminadas por fungos, pode ocorrer perda da cor, apresentação de sabor amargo ou sabor estranho de mofo, produção de odores de cogumelo e terra, além da formação de acetato de etila e ácido acético. Esses compostos têm o potencial de diminuir a aceitação do produto (Steel; Blackman; Schmidtke, 2013).

Os fungos *Colletotrichum acutatum* e *Botrytis cinerea*, estão entre os mais comuns na viticultura e um destaque se dá aos fungos toxigênicos, representados pelas espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* (Welke, 2019). Estes apresentam uma preocupação adicional, pois podem causar efeitos adversos à saúde humana e animal, por serem produtores de micotoxinas. Dois grupos de micotoxinas são recorrentes em uvas, são as ocratoxinas, em especial a ocratoxina A (OTA) e as

aflatoxinas. Essas substâncias podem ser prejudiciais em caso de ingestão, razão pela qual sua presença nas uvas é um motivo de preocupação (Wang *et al.*, 2022).

2.2.1 *Colletotrichum acutatum*

O fungo *Colletotrichum acutatum* pertence a um extenso grupo de espécies do gênero *Colletotrichum* sp., é conhecido globalmente por ocasionar grandes perdas de produção em diversas culturas, incluindo, cereais, frutas, leguminosas e vegetais. As frutas de clima tropical, como a uva, são as que mais sofrem com a ocorrência deste fungo. No Brasil, *C. acutatum* tem causado consideráveis perdas nas safras da uva, inclusive no RS, devido ao clima quente e úmido, associado a longos períodos de chuva (Dowling *et al.*, 2020; Echeverrigaray *et al.*, 2020).

Durante muitas décadas, a podridão da uva madura foi atribuída à presença de *Glomerella cingulata*, que é o teleomorfo de *Colletotrichum gloeosporioides* ou *Colletotrichum acutatum*. No entanto, avanços recentes em técnicas de classificação morfológica e molecular, possibilitaram a identificação de diversas espécies distintas de *Colletotrichum* como causadores da antracnose e da podridão da uva madura. Dentre esses, foram identificados complexos *Colletotrichum* que afetam a videira: *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. orchidearum* e *C. boninense* (Echeverrigaray *et al.*, 2020; Hsieh *et al.*, 2023).

A podridão da uva madura caracteriza-se por diversos sintomas nos frutos, nas flores e em outros tecidos vegetativos, que dependem da virulência da cepa, dos fatores ambientais e da interação com o hospedeiro. A disseminação do fungo ocorre a partir do inóculo presente em folhas e frutos contaminados de safras anteriores, sendo o vento e as chuvas os responsáveis pela dispersão dos esporos (De Silva *et al.*, 2017).

A ação do fungo inicia com a invasão das bagas, a qual pode ser facilitada a partir de rachaduras na superfície causadas por insetos e outras pragas. Os sintomas manifestam-se predominantemente durante a fase de maturação, caracterizados por manchas concêntricas marrom-avermelhadas sobre a película das bagas. Nas lesões, observa-se a presença de massas de conídios de coloração laranja ou salmão, conforme demonstrado na **Figura 1**. Em seguida, ocorre o escurecimento do fruto e posterior murchamento com a mumificação das bagas, de acordo com a ilustração demonstrada na **Figura 2 (a, b)** (Echeverrigaray *et al.*, 2020; Hsieh *et al.*, 2023).

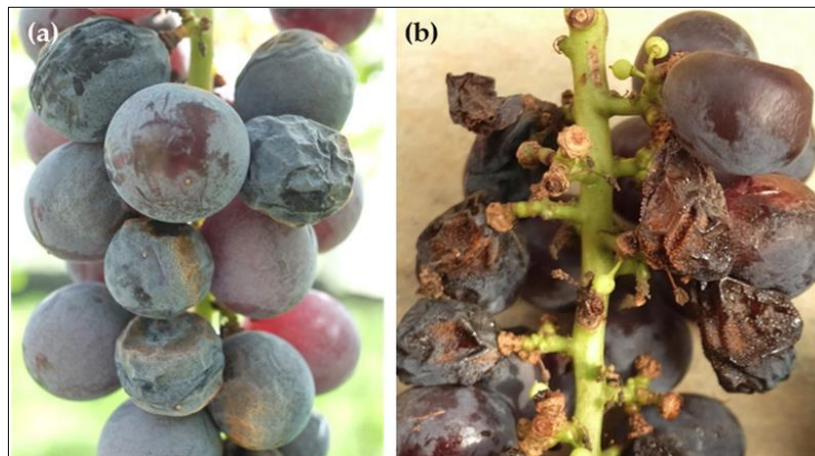
Apesar do fungo estar presente durante todas as fases do cultivo da uva, o aparecimento tardio dos sintomas, durante o amadurecimento da baga, é um dos principais motivos pelos quais ocorrem as maiores perdas de produção (Hsieh *et al.*, 2023).

Figura 1 - Fungo *Colletotrichum acutatum* em meio Ágar Batata Dextrose (BDA) cultivado 25 °C por 7 dias



Fonte: elaboração própria.

Figura 2 - Podridão da uva madura causada por *Colletotrichum* spp. em cachos de uva (a,b)



Fonte: Adaptado de Hsieh *et al.* (2023).

A infecção da uva pelo *C. acutatum* pode ter impacto negativo na qualidade da fruta, uma vez que alterações no sabor podem surgir antes mesmo da manifestação visual da doença nas bagas. Mesmo em casos de contaminação em pequena escala, cerca de 3%, já é possível observar efeitos indesejáveis nos vinhos, como a redução

da acidez titulável, indução da coloração marrom, e modificações desfavoráveis no perfil de aroma e amargor (Meunier; Steel, 2009).

2.2.2 *Botrytis cinerea*

B. cinerea também é um fungo conhecido mundialmente por estar presente em uma grande variedade de frutas e vegetais; em uva, é o fungo de maior relevância. Em geral, *B. cinerea* age de forma patogênica, comprometendo a qualidade e a produtividade (Felšöciová *et al.*, 2023). Em certas regiões viníferas, sob condições específicas de umidade e temperatura, pode proporcionar a podridão nobre, que é um efeito desejado por conferir sabores e aromas especiais aos vinhos (Lovato *et al.*, 2019).

A forma indesejável da doença do mofo cinzento está associada a alta umidade, ocorrência de chuvas ou irrigação em excesso, vento e as oscilações de temperaturas durante o desenvolvimento da uva (Fedele; Brischetto; Rossi, 2020; Thomidis *et al.*, 2016; Würz *et al.*, 2020). A germinação de conídios e as infecções ocorrem em condições de alta umidade (>94% de umidade relativa), em temperatura entre 20 e 24 °C (Kassemeyer, 2017).

A sua etiologia apresenta duas fases: uma chamada de perfeita (*Botryotinia fuckeliana*) e outra imperfeita ou conidial (*Botrytis cinerea*). A segunda fase é a responsável por causar a doença nas uvas. Apesar de poder sobreviver de forma saprófita, a grande preocupação é a forma necrotrófica, que pode causar severos prejuízos à viticultura (Calvo-Garrido *et al.*, 2019; Solairaj *et al.*, 2021; Steel; Blackman; Schmidtke, 2013).

A infecção inicia durante a floração, estágio em que o fungo invade a baga e permanece de forma latente até o começo dos primeiros sintomas, que ocorrem na maturação (Ding *et al.*, 2019). O processo de maturação da uva, faz com que ocorram alterações nos mecanismos de defesa da planta, havendo diminuição dos compostos fenólicos, taninos e pectina e aumento no teor de açúcar e a diminuição da acidez. A partir destas alterações, o fungo consegue se desenvolver liberando metabólitos e enzimas (glicerol, ácido glucônico, β -glucano, pectinases, proteases, tirosinases e lacases), que darão origem aos sintomas característicos da doença da podridão cinzenta, de acordo com a **Figura 3** (Fedele; Brischetto; Rossi, 2020; Steel; Blackman; Schmidtke, 2013).

Figura 3 - *Botrytis cinerea* em meio BDA cultivada 20°C por 14 dias e uva bordô inoculada artificialmente com *B. cinerea*, incubado a 20 °C por 14 dias



Fonte: elaboração própria.

Na uva, aparecem manchas circulares arroxeadas, que progridem para uma coloração parda e em seguida, as bagas tornam-se deprimidas, com abundante esporulação acinzentada na superfície, **Figura 3**, que posteriormente apodrecem **Figura 4**. Pode também ocorrer a podridão peduncular, que leva à perda do cacho ou de parte dele. Nas folhas, aparecem manchas de coloração marrom, que também podem levar a dessecação (Latorre; Elfar; Ferrada, 2015; Shen *et al.*, 2021).

Na pós-colheita, a ocorrência latente do fungo nas bagas pode acentuar o desenvolvimento da doença do mofo cinzento dependendo de quais forem as condições de armazenamento ou do tempo de espera até o processamento (Feng *et al.*, 2022). Durante esse período podem ocorrer alterações de cor das bagas, que de roxas passam para avermelhadas, enquanto as uvas brancas passam a ficar marrom-avermelhadas (Kgang *et al.*, 2023).

Figura 4 - Cacho de uva coletado em meio Atlântico nos EUA contaminada com o fungo *B. cinerea*



Fonte: Cosseboom *et al.* (2021).

Pode ocorrer também alterações na composição da uva pela degradação de vários compostos: os compostos fenólicos são reduzidos (antocianinas, ácidos hidroxicinâmicos e flavonóides); os compostos aromáticos, como monoterpenos, são transformados em compostos menos odoríferos (Kelly *et al.*, 2022).

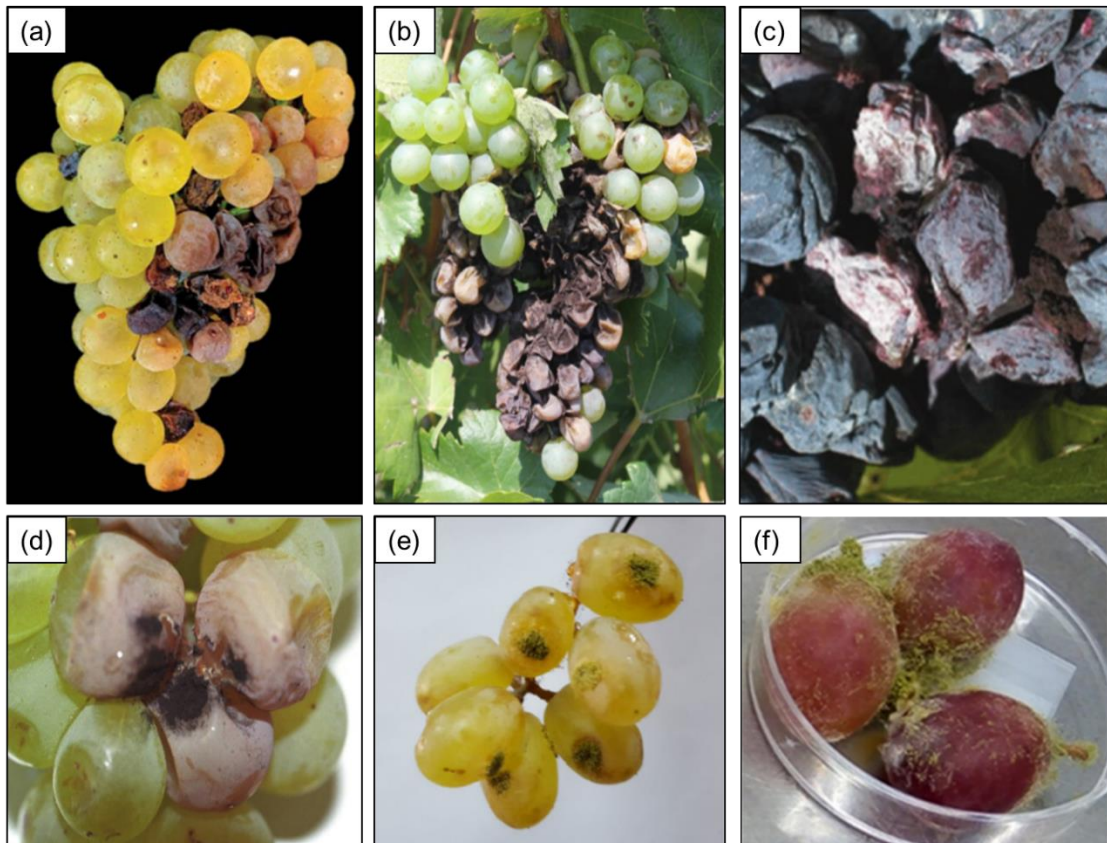
A elevada taxa de esporulação de *B. cinerea* no mosto pode resultar na produção de vinhos com odores desagradáveis caracterizados com notas terrosas e de cogumelo, sendo os compostos voláteis 1-octen-3-ona, 1-octen-3-ol, 2-heptanol e 2-octen-1-ol com notas de cogumelo ou 2-metilisoborneol os responsáveis (Rienth *et al.*, 2021).

2.2.3 *Aspergillus* sp.

As espécies de *Aspergillus* sp. são frequentemente encontradas na viticultura em diversas regiões do mundo, dentre estas espécies, estão: *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus*, *Aspergillus paradoxus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus flavus*, entre outras (Díaz *et al.*, 2009; Freire *et al.*, 2017; Gómez-Albarrán *et al.*, 2021; Taniwaki; Pitt; Magan, 2018). Já o fungo *Aspergillus flavus*, na literatura é pouco citado como contaminante de uva (Taniwaki; Pitt; Magan, 2018). No entanto, uma pesquisa recente, realizada por Tópor *et al.* (2023) revelou que este fungo foi encontrado em maior prevalência

em uvas. Esse achado é preocupante devido à capacidade deste fungo produzir aflatoxinas em alimentos. Na **Figura 5** são apresentados cachos de uva contaminados por espécies de *Aspergillus* spp.

Figura 5 – Cachos de uva contaminados com espécies de *Aspergillus* sp.



Legenda: (a) Cacho de uva coletado em Meio Atlântico nos EUA com fungo *Aspergillus*; (b) cacho de uva (cv Malagouzia) com podridão de *Aspergillus* causada por *Aspergillus* seção *Nigri*; (c) uva com podridão negra contaminação causada por *Aspergilli* preto; (d) uva Thompson sem sementes contaminada artificialmente com *Aspergillus flavus*; (e) uva contaminada por *Aspergillus carbonario* e (f) *Aspergillus flavus* como contaminante de uva vermelha.

Fonte: (a) Cosseboom *et al.* (2021), (b) Mondani *et al.* (2020); (c) Somma e Perrone *et al.* (2012); (d) Kasfi *et al.* (2018); (e) Hocking (2014) e (f) Dopazo *et al.* (2021).

Algumas espécies de *Aspergillus* merecem atenção devido a possibilidade de sintetizar micotoxinas, apresentando grande impacto agrícola, epidemiológico e econômico (Taniwaki; Pitt; Magan, 2018). Na **Tabela 1**, são apresentados os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, as micotoxinas produzidas por estes, em qual tipo de cultivar de uva foram encontrados e o país de origem.

Tabela 1 – Cultivares e micotoxinas produzidas por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* spp. já relatadas na literatura em uva

Fungo	Micotoxinas	Cultivar	Origem	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	OTA, OTB	Chardonnay (<i>Vitis vinífera</i>) biodinâmica	Brasil	Tópor <i>et al</i> , 2023
	OTA	Cabernet Sauvignon e Maratheftiko	Chipre	Pantelides <i>et al</i> , 2017
	-	Cabernet Sauvignon, Concórdia, Vidal, Pinot noir	Canadá	Qi <i>et al</i> , 2016
	-	Syrah, Touriga Nacional, Muscat Canelli	Brasil	Freire <i>et al</i> , 2017
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2	Uvas Chardonnay (<i>Vitis vinífera</i>) convencional e biodinâmica	Brasil	Tópor <i>et al</i> , 2023
	-	Pinot Blanc	Eslováquia	Felšöciová <i>et al</i> , 2023
	-	Syrah, Muscat Canelli	Brasil	Freire <i>et al</i> , 2017
	AFB1	Uvas viníferas	Líbano	Freire <i>et al</i> , 2017
	AFB1	Vitis viníferas	Eslováquia	El Khoury <i>et al</i> , 2008
	-	Uvas com práticas ecológicas e convencional	Espanha	Felšöciová <i>et al</i> , 2015 Gómez-Albarrán <i>et al</i> , 2021
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	-	Uva com práticas ecológicas	Espanha	Gómez-Albarrán <i>et al</i> , 2021

Fonte: Elaboração própria.

A incidência de espécies de *Aspergillus* na uva está correlacionada com a existência de esporos fúngicos no solo (que são dispersos pelo vento e depositados na superfície dos frutos (Mondani *et al.*, 2020); aos fatores ambientais, como altas temperaturas e a exposição à luz solar, juntamente com o amadurecimento da uva, que quanto mais madura estiver, maior a probabilidade do ataque do fungo e, conseqüentemente, maior a probabilidade de síntese de micotoxinas (Gil-Serna *et al.*, 2018; Taniwaki; Pitt; Magan, 2018). No entanto, não parece que alguns fungos do gênero *Aspergillus* sejam capazes de penetrar na casca intacta das uvas, eles necessitam que a baga seja danificada pela chuva na pré-colheita ou atacada por outros fungos patogênicos como o oídio, *Rhizopus stolonifer* ou *B. cinerea*, insetos vetores ou danos mecânicos causados por equipamento de cultivo ou colheita (Gil-Serna *et al.*, 2018; Mondani *et al.*, 2020).

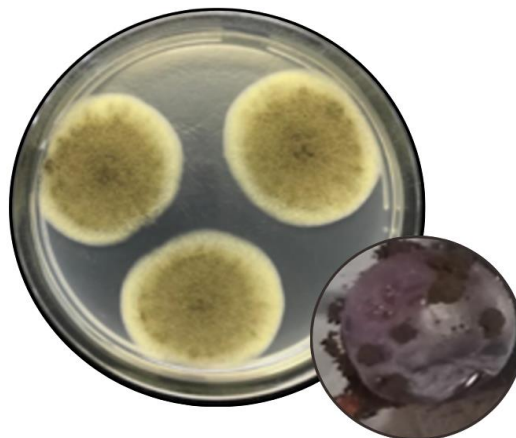
As melhores condições de desenvolvimento de *Aspergillus* ocorrem na faixa de temperatura entre 17 e 42 °C, sendo que a temperatura mínima para o crescimento se situa entre 11 e 13 °C (Kassemeyer, 2017).

Como a ocorrência da doença é mais comum ao final da maturação da uva, na colheita e pós-colheita, a disseminação do fungo e a síntese de micotoxinas serão maiores durante o armazenamento. Nesta fase, as condições de temperatura, umidade, nutrientes disponíveis e tipo de embalagem, serão cruciais para a qualidade, rendimento e segurança da fruta (Fenta; Mekonnen; Kabtimer, 2023).

Dentre as espécies de *Aspergillus*, o *Aspergillus niger* é distribuído em diversas culturas apresentando recorrências em frutas (frescas ou secas), como uvas, tomate, milho, amendoim, café, cacau e vegetais (GEOSTATISTICAL ANALYSIS OF TOMATO FRUIT ROT AND DIVERSITY OF ASSOCIATED FUNGAL SPECIES, 2020; Taniwaki; Pitt; Magan, 2018). Pantelides *et al.* (2017) encontraram que, nas variedades de uva Cabernet Sauvignon e Maratheftiko, 5,3% das espécies identificadas eram representadas por *A. niger*.

Este fungo é conhecido por causar a doença do mofo preto, podridão de *Aspergillus*, que se caracteriza por lesão marrom encharcada de água nas bagas feridas e esporulação escura de cor preta, **Figura 6** (Kgang *et al.*, 2023).

Figura 6 – *Aspergillus niger* em meio BDA cultivada 25 °C por 7 dias e uva bordô inoculada artificialmente com *A. niger*, incubado a 25 °C por 7 dias



Fonte: elaboração própria.

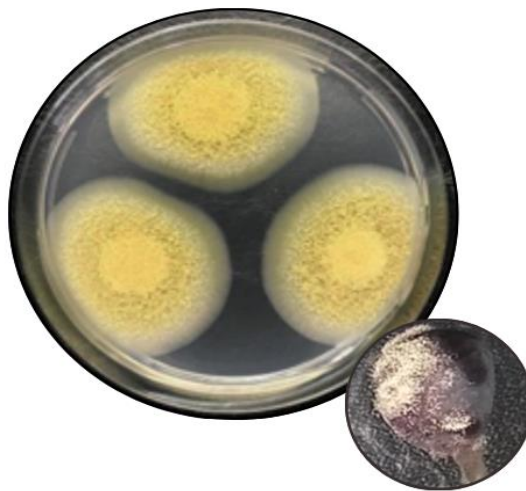
O *Aspergillus westerdijkiae* pertence ao grupo de *Aspergillus* seção *Circumdati*, que também inclui espécies de fungos encontrados em uvas. Estes fungos

contaminam muito menos as bagas quando comparado com as outras espécies; no entanto, em alguns casos, apresentam alta capacidade ocratoxigênica (Gil-Serna *et al.*, 2018).

A. westerdijkiae é comumente encontrado no solo e em alimentos armazenados. Tem como temperatura de crescimento ideal de 33 °C e produz um pigmento solúvel laranja amarelado (Visagie *et al.*, 2014) (**Figura 7**, colônias de *A. westerdijkiae* em meio de cultura BDA).

Gómez-Albarrán *et al.* (2021) encontraram, em uvas cultivadas em regiões da Espanha, espécies possivelmente ocratoxigênicas de *A. westerdijkiae*. Apesar de não terem sido o fungo predominante encontrado nas bagas, não se deve ignorar o risco potencial desta cepa de *Aspergillus*. A **Figura 7** ilustra uma baga de uva com o crescimento de *A. westerdijkiae*.

Figura 7 – *A. westerdijkiae* em meio BDA cultivada 25°C por 7 dias e uva bordô inoculada artificialmente com *A. westerdijkiae*, incubado a 25°C por 7 dias



Fonte: elaboração própria.

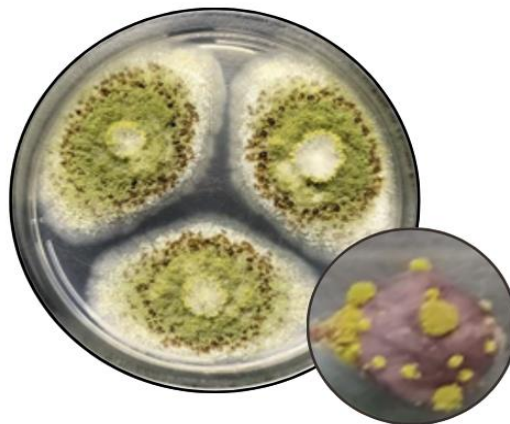
O *Aspergillus flavus* apresenta colônia filamentosa formada por hifas septadas com aproximadamente 4 µm de espessura. É um fungo saprófito, que sobrevive no solo por longos períodos quando em condições desfavoráveis ao seu crescimento. Em condições favoráveis, os escleródios germinam e produzem hifas e esporos assexuados, conhecidos como conídios. Quando germinam, formam micélios que se dispersam no ar e no meio ambiente por meio de polinizações de insetos e vento, e a partir dos conídios infectam a cultura. Os conídios apresentam coloração esverdeada

amarelada, inicialmente têm cor amarela, e, à medida que amadurecem, ficam mais escuras, **Figura 8** (Cimbalo *et al.*, 2020).

A. flavus é considerado um patógeno oportunista, cuja ação pode depender de outros insetos ou micro-organismos que causem dano à cultura para instalar a doença. Ele compromete a qualidade sanitária, física e nutricional dos grãos, sendo mais comumente associado a cereais, como trigo, soja, semente, milho, algodão, amendoim e nozes. Apesar de ser relatado com maior frequência nestes alimentos, também acomete frutas como a uva, devido a estar presente no ambiente de cultivo (Cimbalo *et al.*, 2020).

Tópor *et al.* (2023) verificaram a diversidade de fungos como contaminantes de uvas cultivadas por método convencional e biodinâmico, e, o fungo de maior ocorrência nas duas formas de cultivo foi *A. flavus*, correspondendo a 67 e 42%, respectivamente, de todas as espécies de fungos isolados nas uvas Chardonnay. Gómez-albarrán *et al.* (2021) e Melguizo *et al.* (2023) também detectaram a presença de *A. flavus* como contaminante em uvas em diferentes regiões da Espanha. Isso significa que a ocorrência deste fungo em uvas é uma preocupação crescente, uma vez que esse fungo tem a capacidade de sintetizar aflatoxinas, representando um risco emergente. As mudanças climáticas estão sendo apontadas como uma das principais razões pelo aumento de *A. flavus* na viticultura e em outras culturas (Melguizo *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2022).

Figura 8 - *Aspergillus flavus* em meio BDA cultivada 25°C por 7 dias e uva bordô inoculada artificialmente com *A. flavus*, incubado a 25°C por 7 dias



Fonte: elaboração própria.

2.3 MICOTOXINAS

Micotoxinas constituem a terceira categoria mais notificada como contaminante em alimentos destinados à nutrição humana e animal segundo dados do Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações, lançado pela União Europeia em 2021. Dentro dessa categoria, a aflatoxina B1 liderou em número de notificações, seguida pela ocratoxina A (European Commission, 2022).

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos, sendo sintetizados a partir de condições específicas para cada fungo (Cimbalo *et al.*, 2020; Thakur; Teja, 2024). Por exemplo, Passamani *et al.* (2014), encontraram que a temperatura de 15 °C, atividade de água 0,99 e pH de 5,35 foram as condições ótimas para a síntese de OTA por fungos do gênero *Aspergillus*. Um fato preocupante, é que as condições ótimas para a produção da toxina podem não coincidir com aquelas exigidas para o crescimento fúngico.

Em estudos conduzidos por Díaz *et al.* (2009) e Ferranti *et al.* (2018), foram identificadas diversas estirpes de *Aspergillus* responsáveis pela síntese de OTA em uvas *Vitis labrusca* e híbridas. Estas incluíram: *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus welwitschiae*, *Aspergillus vadensis*, *Aspergillus uvarum*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus brunneoviolaceus*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus aculeatus* e *Aspergillus labruscus*. Adicionalmente, em uvas Cabernet Sauvignon e Maratheftiko, foram encontrados outros isolados; tais como, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus sclerotioniger*, *Aspergillus sclerotiocarbonarius* e *Aspergillus ibericus*.

Em geral, *A. carbonarius* é a espécie ocratoxigênica mais importante devido à sua ocorrência frequente em uvas e à sua alta capacidade de produção de OTs. Entretanto, os agregados de *Aspergillus niger* (*A. niger*, *A. welwitschiae* e *A. tubingensis*), *Aspergillus* seção Nigri (*A. japonicus* e *A. aculeatus*) e *Aspergillus* seção Circumdati (*A. steynii*, *A. westerdijkiae* e *A. ochraceus*) também estão presentes em uvas, e algumas cepas têm a capacidade de produzir a toxina, embora em níveis mais baixos (Gil-Serna *et al.*, 2018; Taniwaki; Pitt; Magan, 2018).

Outro grande problema em relação a síntese de micotoxinas é que, uma vez sintetizadas, há uma grande dificuldade de eliminar, pois são altamente estáveis ao calor e às técnicas mais comuns de processamento de alimentos e rações (Daou *et al.*, 2021; Liu; Xie; Wei, 2022).

Considerando que os alimentos podem ser transportados por longas distâncias e por tempo prolongado e também armazenados por longos períodos até serem processados ou consumidos, todas as etapas de manuseio pós-colheita representam pontos críticos que influenciarão no maior ou menor acúmulo de micotoxinas nos produtos alimentícios e rações (Godswill Awuchi *et al.*, 2022).

Nos últimos anos, devido ao aquecimento global, muitos eventos climáticos extremos têm ocasionado redução da eficácia das medidas de controle e favorecido o crescimento fúngico. Além disso, a globalização gera o surgimento de novas pragas e insetos que podem acometer a viticultura, assim, aumentando a produção e o acúmulo de micotoxinas nas uvas (Tini; Beccari; Covarelli, 2020; Zingales *et al.*, 2022).

A presença de micotoxinas em uvas representa um elevado risco para a segurança alimentar (Gómez-Albarrán *et al.*, 2021), pois os metabólitos tóxicos produzidos pelos fungos filamentosos não são degradados pelo metabolismo humano e nem dos animais, conseqüentemente acumulam-se no organismo levando a sintomas agudos ou crônicos, mesmo em baixas doses (Bennett; Klich, 2003).

Em situações de sintomas agudos, ocorre uma reação rápida à presença das toxinas, o que pode resultar em morte. Por outro lado, os sinais crônicos estão vinculados à exposição prolongada a baixas concentrações e estão, principalmente, relacionados ao desenvolvimento de câncer. A toxicidade das micotoxinas pode ser influenciada por fatores ambientais, idade, estado de saúde e nutricional do indivíduo (Cimbalo *et al.*, 2020) e está diretamente relacionada à estrutura química de cada micotoxina. Como exemplo, temos as AFs e as OTs. As AFs são classificadas como carcinogênicas para seres humanos (grupo 1) e tem por órgão alvo o fígado, podendo causar necrose aguda, cirrose e carcinoma. A OTA é classificada como possivelmente cancerígena para humanos (grupo 2B), acometendo principalmente os rins causando nefropatias (IARC, 1993, 2012).

Devido aos riscos que a ingestão de alimentos contaminados por micotoxinas pode ocasionar à saúde humana e animal, a União Europeia e organizações brasileiras possuem regulamentos técnicos que estabelecem valores máximos tolerados para a presença de micotoxinas em algumas categorias de alimentos. Abaixo, de forma resumida, são apresentados os valores para OTA e AFs em produtos fabricados a partir da uva, conforme o quadro 1 (Brasil, 2022; UNIÃO EUROPEIA, 2023).

Quadro 1 – Teores máximos permitidos de aflatoxinas e ocratoxinas em alimentos, conforme regulamentações do Brasil e da União Europeia

Alimento ou categoria alimentos	Brasil	Comissão Europeia	
	LMT (µg/kg)	Teor máximo (µg/kg)	
Ocratoxina			
Frutas secas e desidratadas*	10	8	
Suco de uva e polpa de uva**	2	2	
Vinho e seus derivados***	2 (µg/L)	2	
Produtos que contenham pelo menos 20 % de passas de uvas	Não determinado	4	
Aflatoxinas	Soma B1 + B2 + G1 + G2	B1	Soma B1 + B2 + G1 + G2
Frutas desidratadas e secas****	10	2	4

LMT: Limites Máximos Tolerados

DESCRIÇÃO COMPLETA DA LEGISLAÇÃO UE (European Commission):

* Passas de uvas (uvas-de-corinto, uvas passas e sultanas).

** Sumo de uva, sumo de uva fabricado a partir de concentrado, sumo de uva concentrado, néctar de uva, mosto de uva e mosto de uva concentrado, colocados no mercado para o consumidor final.

***Incluindo vinhos frisantes e vinhos espumantes e excluindo vinho licoroso e vinho com teor alcoométrico não inferior a 15 % vol. O teor máximo aplica-se aos produtos provenientes das colheitas a partir de 2005.

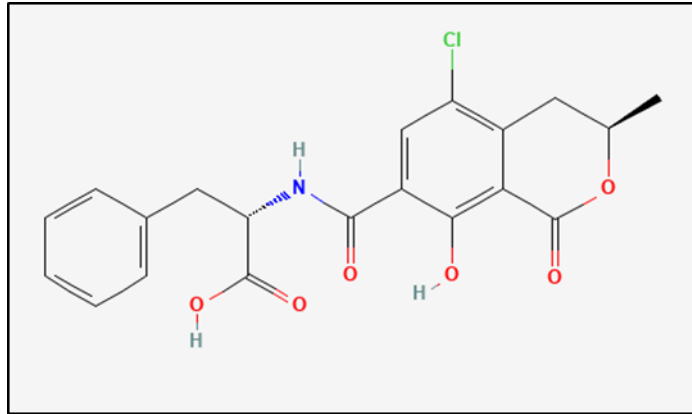
**** Frutos secos utilizados como único ingrediente ou produtos transformados a partir de frutos secos, colocados no mercado para o consumidor final ou para utilização como ingrediente em géneros alimentícios, exceto os produtos referidos no ponto 1.1.3.

Fonte: Adaptado de Brasil (2022) e União Europeia (2023).

2.3.1 Ocratoxinas

A OTA (Figura 9) é o composto mais tóxico do grupo das ocratoxinas. Trata-se de uma micotoxina orgânica solúvel, que possui uma molécula de cloro em sua estrutura, conferindo-lhe seu potencial tóxico. É produzida pelos fungos *Aspergillus* e *Penicillium* e está presente em um grande número de alimentos, como cereais, vinho, café, cerveja, cacau, frutas secas, uva e produtos de uva, carne, especiarias e também em rações (Gil-Serna *et al.*, 2018; Ráduly *et al.*, 2020).

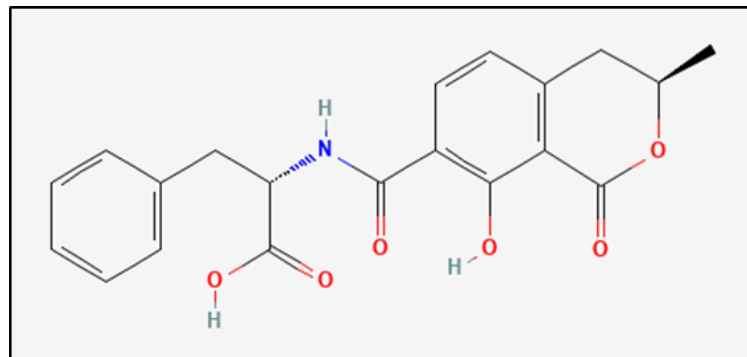
Figura 9 - Estrutura química da ocratoxina A (OTA)



Fonte: Pubchem National Library of Medicine (2024b).

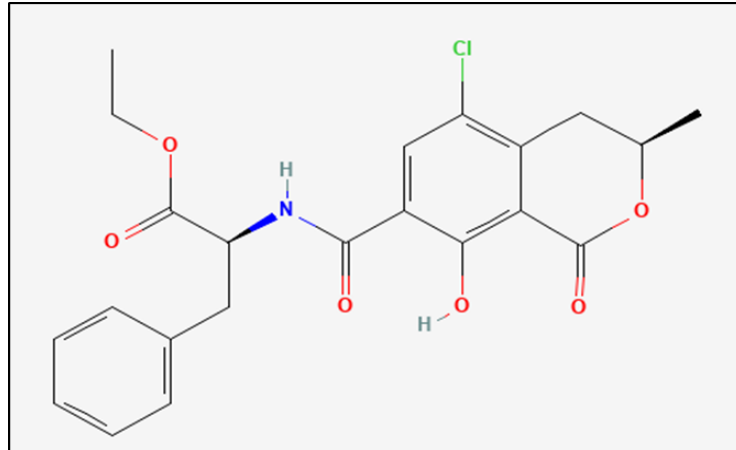
Além da OTA, outras formas de ocratoxinas têm sido reportadas como contaminantes de uva (Silveira *et al.*, 2022) e vinhos (Gil-Serna *et al.*, 2018). A OTA tem sido detectada simultaneamente com a ocratoxina B (OTB), **Figura 10**. A ocratoxina C (OTC), **Figura 11**, derivada do éster etílico da OTA, também apresenta toxicidade, embora em menor intensidade que a OTA. Além disso, é observada em quantidades elevadas em produtos de uva. Outros análogos encontrados em uva e vinho são: metil-OTA, metil-OTB e etil-OTB (Gil-Serna *et al.*, 2018), ocratoxina α ($OT\alpha$), ocratoxina β ($OT\beta$), ocratoxina α metil-éster ($OT\alpha$ metil-éster), ocratoxina α amida ($OT\alpha$ amida), N-formil-ocratoxina α amida (N-formil- $OT\alpha$ amida) (Silveira *et al.*, 2022).

Figura 10 - Estrutura química da ocratoxina B (OTB)



Fonte: Pubchem National Library of Medicine (2024c).

Figura 11 - Estrutura química da ocratoxina C (OTC)



Fonte: Pubchem National Library of Medicine (2024d).

A ingestão de alimentos contaminados por OTA pode causar efeitos adversos à saúde, devido a sua capacidade genotóxica e nefrotóxica, seguido por imunotoxicidade, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, teratogenicidade, citotoxicidade e estresse oxidativo (Akbar *et al.*, 2022). Os órgãos mais afetados são os rins, no qual ocorrem lesões, alterações hematológicas e de morfologia. No organismo, ocorre o aumento da enzima NADPH e P450, ativando a via de sinalização de caspases e induzindo a apoptose. Além disso, o estresse oxidativo induzido pela OTA nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático é capaz de inibir o ciclo celular, o metabolismo lipídico e de nucleotídeos (Cimbalo *et al.*, 2020).

Pesquisas evidenciam a presença recorrente de OTA em uvas e seus produtos derivados. Rosa *et al.* (2004) identificaram OTA em quantidade superior a 21 ng/L em 29,2% (48 amostras) das amostras avaliadas de sucos de uva comercializados na cidade de Rio de Janeiro, Brasil. Pantelides *et al.* (2017) identificaram em uvas das variedades Cabernet Sauvignon e Maratheftiko três fungos capazes de produzir OTA: *A. carbonarius*, *A. niger* e *A. welwitschiae*. As quantidades médias produzidas foram de 1.436,1 ng/g, 23,9 ng/g e 9,1 ng/g de OTA, respectivamente.

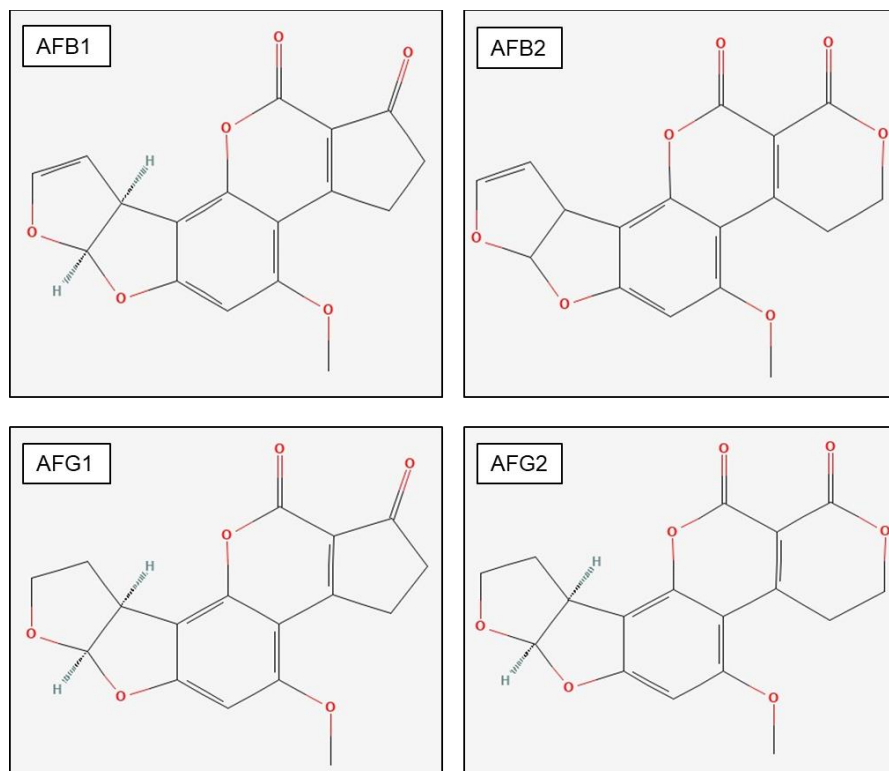
Hajoak *et al.* (2019) detectaram OTA em 26,7% das amostras de suco de uva comercializado na Polônia. Yusefi *et al.* (2018) identificaram a presença de ocratoxina A em 55,7% (39 de um total de 70 amostras) de suco de uva vermelha comercializado no Irã. Em uma amostra, os níveis foram superiores a 2 µg/L, valor acima do limite regulamentado pela UE para suco de uva. Apesar da contaminação média de OTA nas amostras analisadas ter ficado abaixo do limite máximo permitido estabelecido pela UE, a notável frequência de contaminação nesses produtos é motivo de

preocupação, visto que, crianças são um dos principais consumidores de suco de uva. Portanto, é de grande preocupação a presença de OTA em uvas e derivados, sendo assim necessário a adoção de medidas de controle para evitar que a OTA esteja presente em alimentos, desde as etapas iniciais de produção.

2.3.2 Aflatoxinas

As aflatoxinas são produzidas pelos fungos do gênero *Aspergillus*, e *A. flavus* é a espécie mais citada como produtora desta micotoxina em alimentos. Existem mais de 20 aflatoxinas, sendo as mais relevantes AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, representadas na **Figura 12**, que mostra suas estruturas químicas. As AFM1 e AFM2 são os metabólitos hidroxilados de AFB1 e AFB2, respectivamente, sendo a AFM1 excretada no leite de mamíferos (Malir *et al.*, 2023).

Figura 12 - Estrutura química das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2



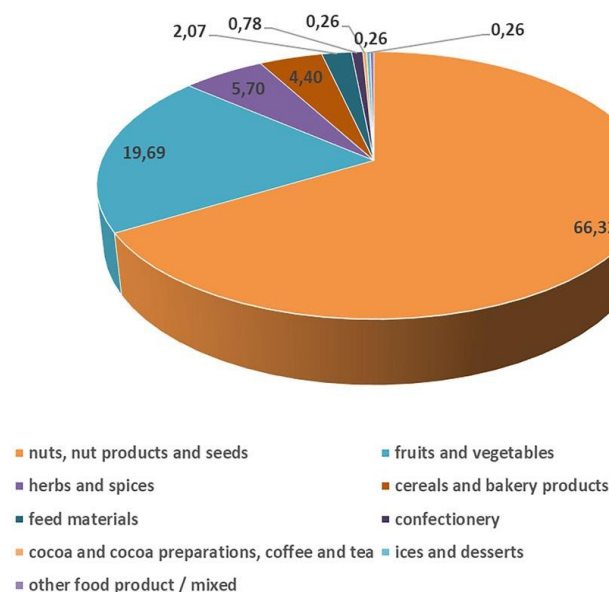
Fonte: Pubchem National Library of Medicine (2024a).

A aflatoxina B1 (AFB1) está associada à hepatocarcinogenicidade (Malir *et al.*, 2023), sendo também considerada genotóxica, imunossupressora, mutagênica e carcinogênica (Gómez-Albarrán *et al.*, 2021; IARC, 2012).

O mecanismo carcinogênico da AFB1 ocorre pela metabolização da aflatoxina em aflatoxina-8,9-exo-epóxido pelas enzimas P450, composto que pode reagir com DNA, RNA e proteínas para formar adutos, especialmente com o gene supressor de tumor P53. Em particular, o AFB1-8,9-exo-epóxido pode se ligar ao DNA formando predominantemente o aduto 8,9-di-hidro-8 (N7-guanil) -9-hidroxi-AFB1 (AFB1 – N7-Gua). É convertido em AFB1-8 e 9-epóxido no fígado, catalisado por enzimas associadas ao citocromo P450 após ser ingerido por animais, formando adutos com a base guanina do DNA, resultando em doenças agudas e crônicas chamadas aflatoxicoses em humanos (Cimbalò *et al.*, 2020).

Devido ao seu elevado potencial tóxico, as AFs destacam-se como as micotoxinas mais preocupantes identificadas em alimentos. A **Figura 13** ilustra a ocorrência de AFB1 nas categorias de alimentos segundo o comunicado da União Europeia pelo Sistema de alerta rápido para gêneros alimentícios e alimentos para animais.

Figura 13 - Contaminação por aflatoxina B1 em diferentes gêneros alimentícios e alimentos para animais (%) comunicada na União Europeia em 2021 (Sistema de alerta rápido para gêneros alimentícios e alimentos para animais, 2021)



Fonte: Loi *et al.* (2023).

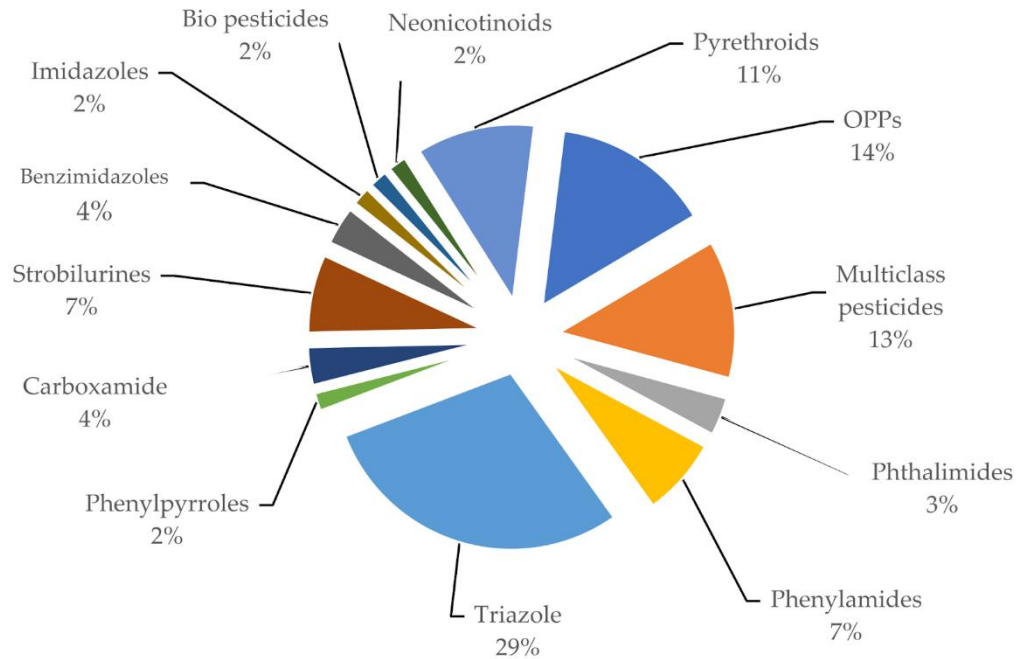
Loi *et al.* (2023) destacam que frutas e vegetais estão na segunda posição de alimentos contaminados pela AFB1. Em uva, poucos estudos relatam a síntese de AFB1. No entanto, Khashaba *et al.* (2018) encontraram AFB1 em uva seca e AFB1 e AFB2 em uva fresca, dado preocupante para a cadeia produtiva da uva.

2.4 USO DE FUNGICIDAS EM UVAS

O uso de fungicidas na agricultura tem desempenhado um papel fundamental na redução de doenças e aumento na produtividade, entretanto, seus efeitos tóxicos para planta se estende também para outros organismos, incluindo peixes, pássaros, plantas, assim como para ar, água, solo e aos alimentos colhidos. Estes resíduos, além de causarem efeitos adversos para o meio ambiente, impactam na saúde humana. As atuais mudanças climáticas têm implicado na necessidade de um maior uso e conseqüentemente a uma poluição maior (Tudi *et al.*, 2021).

Dados dos últimos dez anos trazem que os pesticidas mais frequentes encontrados em uva são da classe dos triazois, seguido pelos pesticidas organofosforados, pesticidas multiclassas, piretroides, fenilamidas e estrobilurinas. A **figura 14** ilustra as classes de pesticidas mais utilizados em uvas. A presença significativa de resíduos de triazol nas uvas indica que essa classe química é amplamente utilizada em nível global, seu maior uso está associado a sua eficácia contra pragas e patógenos fúngicos, com menor impacto tóxico no produto final. (Syrgabek; Alimzhanova, 2022).

Figura 14 - Classes de pesticidas que são mais comumente utilizadas para controlar pragas e doenças em diferentes fases do cultivo da uva



Fonte: Syrgabek e Alimzhanova (2022).

Um estudo publicou a presença de resíduos de pesticidas em uva e foram observados que em 20,4% das amostras de uva de mesa (57 amostras), a concentração de pesticidas estava acima dos limites máximos de resíduos (LMR) preconizados pela UE, relativo a três tipos de pesticidas. Ainda, os autores relataram que 37,1% das amostras de uva analisadas apresentavam mais de um resíduo. O azoxistrobina foi o pesticida de maior frequência nas uvas, no entanto, em todas as amostras esteve abaixo do LMR para UE. O segundo mais frequente foi o inseticida/acaricida clorpirifós, em que todas as amostras estiveram acima da LMR de 0,01 mg/kg. Ainda foi possível identificar o uso do fungicida carbendazim em uvas, que trata-se de um fungicida considerado um potencial desregulador endócrino e também com efeito genotóxico (Golge; Kabak, 2018).

Dados brasileiros fornecidos pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos também encontraram problemas com o uso de agrotóxicos em uvas. Foram analisadas 319 amostras, das quais 49 apresentaram resíduos em concentrações superiores ao LMR. Os agrotóxicos mais frequentemente detectados nessas amostras foram etefom, clotianidina e bifentrina. Além disso, foi observado o

uso de agrotóxicos não permitidos para uvas, como propargito, hexitiazoxi, fenpiroximato e acefato (ANVISA, 2019).

Mancozebe, fungicida largamente utilizado na agricultura e regulamentado para uso em uvas, foi avaliado por Quds *et al.* (2023) quanto aos possíveis efeitos citotóxicos pelo consumo de alimentos ou água contaminados e também os possíveis efeitos sobre a saúde de trabalhadores do campo e nas indústrias de processamento. Ao avaliar os efeitos sobre os eritrócitos humanos, constatou-se que mancozebe induziu ao estresse oxidativo, prejudicou o sistema de defesa antioxidante, causou danos à membrana e alterações morfológicas, o que afetará adversamente a estrutura e a função dos eritrócitos.

Wei; Wang; Liu (2023) realizaram uma revisão sobre o uso de pesticidas, incluindo os fungicidas como o hexaclorobenzeno (proibido em alguns países), tolilfluanida, azoxistrobina e carbendazim e seu efeito no diabetes e no metabolismo da glicose em estudos epidemiológicos e toxicológicos *in vitro* e *in vivo*. Os dados podem ser escassos para afirmar a relação entre pesticidas e diabetes, mas há evidências tanto da contaminação ambiental (oceano, solo, ar), quanto da presença destes fungicidas no organismo humano (plasma de mulheres grávidas, no sangue do cordão umbilical, na placenta e no leite materno).

2.5 MÉTODOS DE BIOCONTROLE E BACILLUS

A utilização do biocontrole, por meio de micro-organismos antagonistas, surge como uma alternativa promissora na redução da dependência do uso de agrotóxicos. Diversas organizações internacionais, como a União Europeia, buscam fazer a transição da produção agrícola convencional para uma abordagem mais sustentável, incorporando o uso de agentes biológicos. Além disso, a adoção de tal prática atende às expectativas do mercado consumidor (Boiu-Sicuia *et al.*, 2023).

Os micro-organismos antagonistas mais difundidos como agentes de controle biológico são: vírus (*Baculovirus*), bactérias (*Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Streptomyces*, *Bacillus*), fungos, leveduras (*Ulocladium* spp, *Trichoderma* spp) e nematoides (*Steinernema* e *Heterorhabditis*) (Ali *et al.*, 2022).

As bactérias são os agentes antagonistas mais utilizados, sobretudo para o controle dos fungos patogênicos e toxigênicos (Tariq *et al.*, 2020). O uso de bactérias antagonistas representa considerável vantagem, na medida em que podem ser

utilizadas tanto no período pré-colheita quanto no pós-colheita (Ren *et al.*, 2020). A maioria das bactérias utilizadas como biocontrole recebem o status "Geralmente Reconhecido como Seguro" (GRAS) pela FDA (Food and Drug Administration) (FDA, 2018, FDA, 2021, FDA, 2022).

Produtos à base de *Bacillus* estão disponíveis comercialmente como agentes de biocontrole contra fungos fitopatogênicos. O Serenade®, produzido pela Agro Bayer, é composto por *Bacillus subtilis* (QST 713, numa concentração de 10^9 UFC/g) recomendado para o controle de doenças como: mancha-de-alternaria (*Alternaria dauci*), mofo-cinzento (*B. cinerea*), antracnose (*C. gloeosporioides*) e mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) para as culturas de cenoura, coentro, alface, batata, uva, abacate, alho, maçã, amendoim, berinjela, tomate, entre outros alimentos. O Eco-shot® produzido pela Ithara, a base de *Bacillus amyloliquefaciens* D-747 (mínimo de 5×10^{10} UFC/g), é recomendado para controle de *Esclerotinia sclerotiorum*, *Podosphaera fuliginea* e *B. cinerea* para frutas, vegetais e legumes. Apesar da existência destes produtos comerciais, o surgimento de fungos resistentes cria a necessidade de pesquisar novos micro-organismos para biocontrole (Veras; Silveira; Welke, 2023).

Algumas características tornam *Bacillus* spp. atrativos para a produção industrial de bioprodutos, como a formação de endósporos, que proporciona resistência e garante a sobrevivência da bactéria mesmo em condições adversas. Além disso, apresentam alta taxa de crescimento, produção de compostos antifúngicos (enzimas líticas, lipopeptídeos, compostos orgânicos voláteis) e a capacidade de ativar os mecanismos de defesa da planta contra os fitopatógeno (Otoguro; Suzuki, 2018; Veras; Silveira; Welke, 2023; Wu *et al.*, 2022). Outros aspectos importantes são a boa estabilidade genética, a eficácia em baixas concentrações e a atuação sobre um amplo espectro de fitopatógenos (REN *et al.*, 2020).

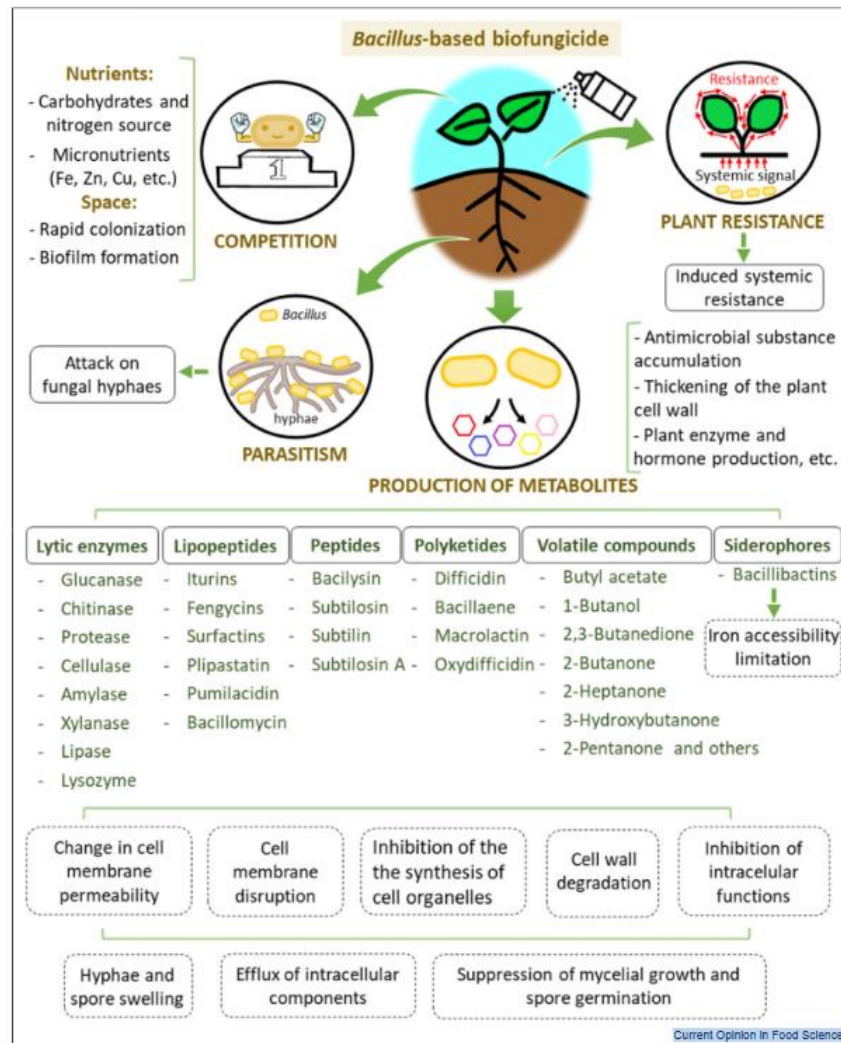
Bacillus velezensis é uma nova unidade taxonômica dentro do gênero *Bacillus*, que foi incluído na lista de Presunção Qualificada de Segurança (PQS) pela avaliação genérica de segurança para agentes biológicos pela European Food Safety Authority (EFSA), e não foi associado com intoxicação ou infecção relatada em humanos ou animais (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) *et al.*, 2020). É encontrado naturalmente no solo, na rizosfera e no ambiente marinho. Está envolvido na fermentação de alimentos como kimchi e pasta de soja fermentada, no controle

biológico de patógenos de plantas e fungos micotoxigênicos e na desintoxicação de micotoxinas. Além disso, estudos descrevem o uso de *B. velezensis* como probiótico em galinhas e peixes, sendo capaz de controlar patógenos bacterianos. Esta espécie produz compostos de interesse biotecnológico, como β -glucanases, L-asparaginase e surfactinas (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) *et al.*, 2020).

As bactérias *B. velezensis* demonstram resultados notáveis no combate a fungos patogênicos em várias culturas, incluindo maçã, pera, milho, tomate, uva, mirtilo entre outras. A atividade de biocontrole é atribuída à capacidade de produzir compostos com propriedades antifúngicas, como relatado em estudos recentes (Chacón *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2020; Silveira *et al.*, 2022; Yuan *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022). Por ser uma espécie classificada como não patogênica ou tóxica, sua aplicação na pós-colheita é segura e benéfica. Dentre estes benefícios, destaca-se a manutenção da qualidade dos alimentos, retardando o processo de senescência e estimulando a produção de compostos antioxidantes, tais como polifenóis, antocianinas e resveratrol (Wang *et al.*, 2022).

Como agente de biocontrole, *B. velezensis* age através de diferentes mecanismos de ação: (I) formação de biofilmes; (II) competição da bactéria com os fungos patogênicos por espaço e nutrientes; (III) produção de metabólitos secundários (fengicinas, iturinas, surfactinas) altamente efetivos contra fungos; (IV) produção de compostos voláteis com ação antifúngica e também, (V) ativa a resposta de defesa da planta contra os fitopatógenos (Otoguro; Suzuki, 2018; Veras; Silveira; Welke, 2023). Além disso, tem sido utilizada como rizobactéria promotora de crescimento de plantas (Ali *et al.*, 2022). A **Figura 15** representa um apanhado em forma de um esquema dos mecanismos antifúngicos das espécies de *Bacillus* (Veras *et al.*, 2023).

Figura 15 - Representação esquemática dos mecanismos antifúngicos das espécies de *Bacillus*



Fonte: Veras et al (2023).

Uma abordagem que vem sendo estudada é a combinação de diferentes micro-organismos como agente de controle biológico. Neste caso, a vantagem dessa estratégia está relacionada à produção de uma maior variabilidade de metabólitos secundários antifúngicos, bem como a possibilidade de mais de um mecanismo de ação antagonista. Além disso, tem-se a praticidade de aplicação, onde mais de um agente de controle biológico pode ser aplicado de uma só vez. No entanto, esta possibilidade deve ser melhor investigada (Calvo-Garrido *et al.*, 2019).

A vantagem do uso de *Bacillus* está em sua capacidade de permanecer no ambiente e continuar a colonização prévia da rizosfera, folhas e frutos. Dessa forma, os *Bacillus* já interagem com o ambiente e o hospedeiro, exercendo atividade

antagonista, como a competição por nutrientes, entre outros mecanismos (Calvo-Garrido *et al.*, 2019).

Em estudo anterior, Veras *et al.* (2016) avaliaram dez estirpes de *Bacillus* (*Bacillus velezensis* P1, P7, P11, P34 e P45, *Bacillus* sp. P39A, *Bacillus licheniformis* P40, *Bacillus* sp. P51, *Bacillus* sp. B312 e *Bacillus subtilis* ATCC 19659) isoladas da Amazônia brasileira quanto ao seu potencial antagônico contra fungos toxigênicos. Quatro estirpes (P1, P7, P11 e P45) se destacaram como as mais eficientes para inibir o desenvolvimento de 13 fungos, incluindo *A. flavus* e *A. carbonarius*, bem como impossibilitaram a produção de aflatoxina B1 e ocratoxina A em meio de cultura. Resultados promissores também foram verificados quando essas quatro estirpes foram usadas como estratégia de controle biológico de *A. carbonarius* em uvas, com destaque para a cepa P1, que inclusive, inibiu a síntese de OTA e de outras formas de ocratoxinas OT β , OT α metil-éster, OT α amida, N-formil-OT α amida. Além disso, a atividade hemolítica das estirpes de *Bacillus velezensis* P1, P7, P11 e P45 descartaram preliminarmente o possível potencial citotóxico dessas bactérias (Silveira *et al.*, 2022).

Dois mecanismos de ação antifúngica exercidos pelos *Bacillus* são a competição e o parasitismo. A competição pode ocorrer por espaço físico ou pela disponibilidade de nutrientes (carboidratos, compostos nitrogenados, minerais: ferro, zinco, cobre) entre o fungo e a bactéria. No que tange à competição por espaço, a rápida colonização e a habilidade de formar biofilme confere a essas bactérias uma vantagem significativa sobre os fungos na colonização efetiva na superfície de plantas ou alimentos. No entanto, esse não é relatado como o principal mecanismo de ação desta bactéria contra fungos (Fenta; Mekonnen; Kabtimer, 2023; Veras; Silveira; Welke, 2023). O parasitismo se dá através da secreção de enzimas do tipo quitinase, protease, glucanase entre outras, que degradam a parede celular dos fungos, ocasionando o extravasamento do citoplasma e a morte celular (Ali *et al.*, 2022).

A produção de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) também apresenta efeito sobre o crescimento de fungos. Esta mistura complexa de compostos de baixo peso molecular, odorosos, com baixo ponto de ebulição e elevado teor de vapor de pressão (0,01 kPa) é produzida por plantas e micro-organismos (Rabbee *et al.*, 2019). Estes compostos podem atuar na redução do crescimento de patógenos fúngicos em frutas e vegetais (Ali *et al.*, 2022), por exemplo: morango, framboesa, uva, tomate e cereja (Wang *et al.*, 2022).

As estirpes de *Bacillus* podem produzir basicamente compostos dos grupos dos ácidos, ésteres, cetonas e aldeídos (Veras; Silveira; Welke, 2023). Estirpes de *B. velezensis*, igualmente, podem produzir uma diversidade de COVs com atividade antifúngica (Guevara-Avendaño *et al.*, 2019). Alguns destes voláteis com efeito antifúngico já foram descritos: pirazina (2,5-dimetil), benzotiazol, 4-cloro-3-metil, fenol-2,4-bis (1,1-dimetiletil); dimetilsulfóxido 1-butanol acetoína; benzaldeído, diacetil, decanal, benzotiazol, 3-undecanona, 2-undecanona, 2-undecanol, undecanal, 2,4-dimetil-6-terc-butilfenol, 5-nonilamina, ácido 3-metilbutanóico, ftalato de dibutila, 2,3-butanodiona, 3-metil-1-butanol, (R,R) -2,3-butanodiol, acetoína, ácido benzóico (Grahovac; Pajčin; Vlajkov, 2023).

Guevara-avendaño *et al.* (2019) encontraram que o conjunto de voláteis produzidos pela cepa *B. velezensis* HA reduziu significativamente o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, em 32,6% quando comparado com o controle. Calvo *et al.* (2020) investigaram o uso dos voláteis produzidos pela cepa BUZ-14 contra *B. cinerea* em uva de mesa. O composto volátil diacetil foi capaz de controlar o mofo cinzento em concentrações mínimas, sendo considerado um composto promissor que poderia ser aplicado na fase de pós-colheita como em embalagem ativa para prolongar a vida útil das uvas.

Além dos mecanismos citados acima, a produção de lipopeptídeos frequentemente apresenta um efeito superior no controle de fungos quando comparada à produção de COVs ou à habilidade bacteriana de induzir resistência a doenças no hospedeiro (Wang *et al.*, 2022). *Bacillus* podem produzir os lipopeptídeos (iturina, fengicinas, surfactina, plipastatina, pumilacidina e bacilomicina), peptídeos (bacilisina, subtilosina, subtilina e subtilosina A), policetídeos (difficidina, bacileno, macrolactina e oxidificidina) e sideróforos (bacilibactina) (Veras; Silveira; Welke, 2023). Por exemplo, as iturinas e fengicinas agem alterando a estrutura e a permeabilidade da membrana celular do fungo, que afeta o crescimento micelial e a germinação de esporos. A fengicina ainda pode se associar ao DNA do fungo interrompendo seu crescimento. Já as surfactinas estão mais associadas à atividade sinérgica com as iturinas e fengicinas. Esses compostos também podem afetar funções intracelulares, como expressão gênica, síntese de organelas e outros metabólitos secundários dos fungos (Shafi; Tian; Ji, 2017; Veras; Silveira; Welke, 2023).

Em estudo *in vitro* realizado por Guardado-Valdivia *et al.* (2018), a cepa do *Bacillus atrophaeus* B5 mostrou-se capaz de reduzir a ocorrência do fungo *C. gloeosporioides*. A identificação, por PCR, de três genes (*bmyB*, *ituC* e *srfAA*), que podem estar envolvidos na produção de iturina, surfactina e bacilomicina, indica que esses compostos foram provavelmente responsáveis pela redução da doença pós-colheita (Ren *et al.*, 2020).

Liu *et al.* (2023) avaliaram o uso de *B. amyloliquefaciens* Baf1 no controle de *Fusarium incarnatum* como contaminante de melão e compararam o resultado com a aplicação do fungicida comercial fludioxonil. Da mesma forma, tanto os *Bacillus* quanto o fungicida comercial demonstraram a capacidade de inibir o crescimento do fungo. Neste caso, a atividade de biocontrole foi atribuída à produção de surfactinas C13 - C15 e bacilomicina L C17, demonstrando que um micro-organismo de biocontrole pode apresentar efeitos semelhantes aos produtos sintéticos comerciais.

2.5.1 *Bacillus* na inibição da síntese de micotoxinas

As micotoxinas, uma vez sintetizadas nas diferentes matérias-primas, apresentam elevada resistência à degradação durante o processamento. A primeira estratégia utilizada é impedir o crescimento do fungo, a fim de evitar a produção dos metabólitos tóxicos. Após sintetizadas, existem métodos físicos, químicos e biológicos para eliminá-las do produto final (Ndiaye *et al.*, 2022).

Os métodos físicos e químicos para a desintoxicação das micotoxinas possuem muitas limitações, sejam elas, pelo custo elevado ou pela segurança do alimento devido ao uso de produtos químicos tóxicos, e pela perda do valor nutricional ou alterações indesejáveis nas características sensoriais do produto (Ding *et al.*, 2023).

Em contrapartida, o uso de micro-organismos ou composto oriundos do metabolismo secundário das bactérias é uma alternativa que vem ganhando espaço na remoção ou desintoxicação das micotoxinas em produtos alimentícios e rações. Pois, não há a necessidade da utilização de produtos sintéticos tóxicos e nem ocorrem perdas na qualidade dos alimentos. As duas principais formas envolvidas na desintoxicação de micotoxinas por bactérias são a adsorção e a degradação (Wang *et al.*, 2022).

Guo *et al.* (2021) constataram que *B. velezensis* ANSB01E poderia ser capaz de degradar zearalenona a partir de enzimas secretadas pela bactéria e, assim, poderia ser uma alternativa para a indústria alimentícia e de ração.

Zhang *et al.* (2022) testaram a eficiência da suspensão de células e do sobrenadante de *B. amyloliquefaciens* YL-1 para degradar OTA produzida por *A. westerdijkiae*, em meio líquido. A OTA foi reduzida em 79,7% ao longo de 48h, enquanto não houve redução significativa no controle. Como resultado, nenhum produto de degradação foi detectado nos cromatogramas por HPLC, o que pode ser devido à transformação da OTA em compostos estruturalmente diferentes e não fluorescentes ou à possibilidade de requerer o uso de um outro comprimento de onda. A fim de elucidar o mecanismo responsável pela degradação da OTA foi avaliado o uso do sobrenadante de cultura, que exerceu maior remoção da micotoxina do que o sedimento celular. Esta descoberta sugere que a principal via de degradação da micotoxina foi devido à atividade enzimática extracelular desempenhada pelo *B. amyloliquefaciens* YL-1. Desta forma, pode-se dizer que o uso de *Bacillus* pode ser uma estratégia para degradar micotoxinas produzidas por fungos toxigênicos.

Além da aplicação de *Bacillus* para degradar as micotoxinas já sintetizadas pelos fungos na matéria-prima, o uso das cepas para impedir a produção é de maior relevância. E assim, existem muitos estudos que retratam o efeito dos *Bacillus* sobre a produção das toxinas. Por exemplo, Palazzini *et al.* (2016) encontraram que *B. velezensis* RC 218 isolado de anteras de trigo foi eficaz em reduzir a gravidade da doença e o acúmulo de desoxinivalenol, sem mostrar efeito sobre a incidência da doença causada pelo fungo *Fusarium graminearum* em trigo, em condições de campo. Os autores sugerem que os resultados de biocontrole podem estar relacionados com os lipopeptídeos secretados pela estirpe.

Bertuzzi *et al.* (2022) avaliaram a aplicação do caldo de células de *Bacillus subtilis* QST 713 contra o crescimento dos fungos toxigênicos *F. graminearum*, *Alternaria alternata*, *A. flavus*, *Fusarium verticillioides* e *A. carbonarius*. O caldo de células, *in vitro*, diminuiu completamente a produção de aflatoxina B1 desoxinivalenol, zearalenona e ácido tenuazônico e obteve redução significativa entre 93,1 e 99,7% para ocratoxina A, fumonisina B1 e B2, alternariol, monoéster de alternariol e tentoxina. Resultado que demonstra a habilidade dos *Bacillus* spp. de inibir a síntese de micotoxinas. Além disso, foi identificado a produção de enzimas e de lipopeptídeos

pertencentes à família das fengicinas, surfactinas e iturinas, que podem ser os responsáveis pela atividade antimicotoxigênica.

Silveira *et al.* (2022) também observaram a redução na produção de ocratoxina A e outras formas de ocratoxinas produzidas por *A. carbonarius*, inoculado artificialmente em uva por quatro estirpes de *B. velezensis*. Todas as quatro cepas foram eficientes em reduzir a forma mais tóxica de ocratoxina, OTA, a níveis não detectáveis em comparação com o tratamento controle.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A descrição dos “Materiais e Métodos” e a apresentação dos “Resultados e Discussão” estão inseridos no respectivo artigo. Uma discussão geral sobre os resultados está no ítem 5 desta dissertação.

5 DISCUSSÃO GERAL

Um dos principais desafios da viticultura é controlar a contaminação por fungos, que pode ocorrer durante toda a cadeia produtiva. Em cada uma das etapas é necessário adotar medidas de controle adequadas. No campo, a principal estratégia utilizada é a aplicação de fungicidas sintéticos. Na etapa de pós-colheita, a maioria destes produtos não são permitidos devido aos possíveis efeitos tóxicos à saúde (Kgang *et al.*, 2023).

A presença de fungos, assim como a utilização de pesticidas químicos, pode ser desfavorável à viticultura. Pois, a existência dos fungos pode acarretar na redução da produtividade, incidir negativamente na qualidade da uva e, ainda, causar efeitos adversos à saúde humana e de animais. No caso dos produtos químicos, pode ocorrer contaminação ambiental, levar ao surgimento de resistência fúngica e também, de alguma forma, trazer prejuízos à saúde de trabalhadores envolvidos com o manuseio e aplicação destes produtos (Solairaj *et al.*, 2021; Tudi *et al.*, 2021).

Neste contexto, temos uma situação problemática para a viticultura: onde as doenças fúngicas causam prejuízos e o uso de fungicidas sintéticos não são mais bem aceitos pelo mercado consumidor como a única estratégia para o controle de fungos. Ainda, corroborando com este cenário, de forma negativa, há muitos estudos correlacionando uma maior incidência e diversidade de fungos, em diferentes culturas, com as atuais mudanças climáticas. Conseqüentemente, está havendo a necessidade de um maior uso de fungicidas (Yin *et al.*, 2023).

O uso sistemático de fungicidas pode levar a resistência do fungo comprometendo tanto a produtividade quanto a qualidade das colheitas, sendo assim, necessário o desenvolvimento de novos produtos com mecanismos distintos para efetivamente controlar as doenças fúngicas. Dentro deste contexto, o uso de produtos a partir do controle não químico, como agentes de biocontrole pode ser uma alternativa (Yin *et al.*, 2023).

Diante desta problemática, os resultados deste estudo evidenciaram a eficácia do uso de *Bacillus velezensis* como uma alternativa sustentável e segura para o controle de fungos na viticultura. As estirpes de *B. velezensis* mostraram potencial antagonista significativo contra os principais fungos patogênicos, com maior eficácia na concentração de células de 1×10^9 UFC/mL. A inibição do crescimento micelial e da germinação de esporos, foi expressiva, evidenciando o potencial dessas estirpes

como biofungicidas. Além disso, a capacidade dessas bactérias de inibir a formação de estruturas reprodutivas fúngicas limita a propagação dos patógenos no ambiente, um fator crucial para o sucesso de futuros bioprodutos.

A aplicação de estirpes de *B. velezensis* diretamente nas uvas resultou em inibições significativas do crescimento fúngico, com alguns fungos sendo completamente suprimidos. E as combinações de estirpes mostraram-se ainda mais promissoras, garantindo a inibição total dos cinco fungos estudados.

B. cinerea e *C. acutatum*, foram os fungos mais suscetíveis a ação de biocontrole pelas quatro estirpes de *B. velezensis* em todos os experimentos realizados. É importante ressaltar que estes fungos estão presentes no cultivo da uva, assim como, em outras culturas (morango, maçã, pêssego, tangerina, pimentão, pimenta batata, mirtilo, amêndoa) causando prejuízos significativos a níveis mundiais (De Silva *et al.*, 2017; Dowling *et al.*, 2020).

A inibição da síntese de micotoxinas pelas estirpes de *B. velezensis* é um resultado de grande relevância, pois as micotoxinas representam um grave problema de saúde pública, visto que podem ser carcinogênicas, teratogênicas, nefrotóxicas, hepatotóxicas entre outros efeitos nocivos à saúde. Portanto, para um biofungicidas, a capacidade de impedir a síntese das micotoxinas, é muito importante. Neste sentido, todas as estirpes demonstraram capacidade de inibir a produção de OTA, OTB e das aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), resultado de suma importância, visto que, mesmo ocorrendo o crescimento do fungo, as estirpes impediram a produção das micotoxinas.

Os resultados deste estudo evidenciaram a eficácia das bactérias no controle de fungos na viticultura, destacando o potencial das cepas de ***Bacillus velezensis*** como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de futuros bioprodutos.

6 CONCLUSÃO

As quatro estirpes de *Bacillus velezensis* demonstraram uma alta capacidade em controlar o crescimento de fungos toxigênicos e fitopatogênicos em uvas. A síntese de ocratoxinas e aflatoxinas também foi inibida quando as estirpes foram usadas como agente de controle de fungos toxigênicos. As quatro cepas apresentaram potencial promissor para serem utilizadas como biofungicidas comerciais tanto no cultivo quanto no pós-colheita. Testes em campo são o próximo passo dessa pesquisa, visando viabilizar o uso dessas cepas em larga escala para controlar o desenvolvimento de fungos em vinhedos

REFERÊNCIAS

- ABBEY, J. A. *et al.* Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*) – prospects and challenges. **Biocontrol Science and Technology**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 207–228, 2019.
- AKBAR, A. *et al.* Mycotoxins occurrence in food commodities, their associated hazards and control strategies. **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 3853–3866, 2022.
- ALI, A. *et al.* Antagonistic Potential of Bacterial Species against Fungal Plant Pathogens (FPP) and Their Role in Plant Growth Promotion (PGP): A Review. **Phyton**, [s. l.], v. 91, n. 9, p. 1859–1877, 2022.
- ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA**. [S. l.]: ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/3770json-file-1>. Acesso em: 25 jun. 2024.
- ASKARI-KHORASGANI, O.; PESSARAKLI, M. Fruit quality and nutrient composition of grapevines: a review. **Journal of Plant Nutrition**, [s. l.], v. 42, n. 17, p. 2133–2150, 2019a.
- ASKARI-KHORASGANI, O.; PESSARAKLI, M. Grapevine selection for improving nutrient content and composition and the associated quality indices—a review. **Journal of Plant Nutrition**, [s. l.], v. 42, n. 17, p. 2176–2187, 2019b.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 497–516, 2003.
- BERTUZZI, T. *et al.* Reduction of Mycotoxigenic Fungi Growth and Their Mycotoxin Production by *Bacillus subtilis* QST 713. **Toxins**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 797, 2022.
- BOIU-SICUIA, O.-A. *et al.* In Vitro Evaluation of Some Endophytic *Bacillus* to Potentially Inhibit Grape and Grapevine Fungal Pathogens. **Plants**, [s. l.], v. 12, n. 13, p. 2553, 2023.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa - IN nº 160, de 1º de julho de 2022**. Estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. 2022. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-160-de-1-de-julho-de-2022-413367081>. Acesso em: 24 maio 2024.
- CALVO, H. *et al.* Antifungal activity of the volatile organic compounds produced by *Bacillus velezensis* strains against postharvest fungal pathogens. **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], v. 166, p. 111208, 2020.
- CALVO-GARRIDO, C. *et al.* Microbial Antagonism Toward *Botrytis* Bunch Rot of Grapes in Multiple Field Tests Using One *Bacillus ginsengihumi* Strain and Formulated Biological Control Products. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 10, p. 105, 2019.
- CHACÓN, F. I. *et al.* Native Cultivable Bacteria from the Blueberry Microbiome as Novel Potential Biocontrol Agents. **Microorganisms**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 969, 2022.
- CIMBALO, A. *et al.* Toxicity of mycotoxins in vivo on vertebrate organisms: A review. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 137, p. 111161, 2020.
- COSSEBOOM, S. D.; HU, M. Diversity, Pathogenicity, and Fungicide Sensitivity of Fungal Species Associated with Late-Season Rots of Wine Grape in the Mid-Atlantic United States. **Plant Disease**, [s. l.], v. 105, n. 10, p. 3101–3110, 2021.
- DAOU, R. *et al.* Mycotoxins: Factors influencing production and control strategies. **AIMS Agriculture and Food**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 416–447, 2021.

- DE SILVA, D. D. *et al.* Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. **Fungal Biology Reviews**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 155–168, 2017.
- DÍAZ, G. A. *et al.* Ochratoxigenic *Aspergillus* species on grapes from Chilean vineyards and *Aspergillus* threshold levels on grapes. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 133, n. 1–2, p. 195–199, 2009.
- DING, S. *et al.* Diversity of epiphytic fungi on the surface of Kyoho grape berries during ripening process in summer and winter at Nanning region, Guangxi, China. **Fungal Biology**, [s. l.], v. 123, n. 4, p. 283–289, 2019.
- DING, L. *et al.* Ochratoxin A: Overview of Prevention, Removal, and Detoxification Methods. **Toxins**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 565, 2023.
- DOPAZO, V. *et al.* Bio-Preservative Potential of Microorganisms Isolated from Red Grape against Food Contaminant Fungi. **Toxins**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 412, 2021.
- DOWLING, M. *et al.* Managing *Colletotrichum* on Fruit Crops: A “Complex” Challenge. **Plant Disease**, [s. l.], v. 104, n. 9, p. 2301–2316, 2020.
- ECHEVERRIGARAY, S. *et al.* *Colletotrichum* species causing grape ripe rot disease in *Vitis labrusca* and *V. vinifera* varieties in the highlands of southern Brazil. **Plant Pathology**, [s. l.], v. 69, n. 8, p. 1504–1512, 2020.
- EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (BIOHAZ) *et al.* Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA (2017–2019). **EFSA Journal**, [s. l.], v. 18, n. 2, 2020. Disponível em: <https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2020.5966>. Acesso em: 23 maio 2024.
- EUROPEAN COMMISSION. **Alert and cooperation network: 2021 annual report**. LU: Publications Office, 2022. Disponível em: <https://data.europa.eu/doi/10.2875/328358>. Acesso em: 25 dez. 2023.
- FEDELE, G.; BRISCHETTO, C.; ROSSI, V. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on Grape Berries as Influenced by Temperature and Humidity. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 11, p. 1232, 2020.
- FELŠÖCIOVÁ, S. *et al.* Mycobiota in Slovak wine grapes: A case study from the small Carpathians wine region. **Open Life Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 20220676, 2023.
- FENG, B. *et al.* Bioactivities evaluation of an endophytic bacterial strain *Bacillus velezensis* JRX-YG39 inhabiting wild grape. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 170, 2022.
- FENTA, L.; MEKONNEN, H.; KABTIMER, N. The Exploitation of Microbial Antagonists against Postharvest Plant Pathogens. **Microorganisms**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 1044, 2023.
- FERRANTI, L. D. S. *et al.* Diversity of *Aspergillus* section *Nigri* on the surface of *Vitis labrusca* and its hybrid grapes. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 268, p. 53–60, 2018.
- FREIRE, L. *et al.* 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**, [s. l.], v. 241, p. 181–190, 2017.
- GEMBLOUX AGRO-BIO TECH, ULIEGE (UNIVERSITY OF LIÈGE), BELGIUM *et al.* The use of *Bacillus* spp. as bacterial biocontrol agents to control plant diseases. *In*: RAVENSBERG, W. J.; KOPPERT BIOLOGICAL SYSTEMS, THE NETHERLANDS. **Burleigh Dodds Series in Agricultural Science**. [S. l.]: Burleigh Dodds Science Publishing, 2021. p. 247–300. Disponível em: <https://shop.bdspublishing.com/store/bds/detail/product/3-190-9781801462518>. Acesso em: 26 dez. 2023.

- GEOSTATISTICAL ANALYSIS OF TOMATO FRUIT ROT AND DIVERSITY OF ASSOCIATED FUNGAL SPECIES. **The Journal of Animal and Plant Sciences**, [s. l.], v. 31, n. 4, 2020. Disponível em: <http://www.thejaps.org.pk/Volume/2021/31-04/11.php>. Acesso em: 27 dez. 2023.
- GIL-SERNA, J. *et al.* Wine Contamination with Ochratoxins: A Review. **Beverages**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 6, 2018.
- GODSWILL AWUCHI, C. *et al.* Fungal Growth and Mycotoxins Production: Types, Toxicities, Control Strategies, and Detoxification. *In*: SULTAN, S.; KAUR SURINDAR SINGH, G. (org.). **Fungal Reproduction and Growth**. [S. l.]: IntechOpen, 2022. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/78611>. Acesso em: 27 dez. 2023.
- GOLGE, O.; KABAK, B. Pesticide Residues in Table Grapes and Exposure Assessment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 66, n. 7, p. 1701–1713, 2018.
- GÓMEZ-ALBARRÁN, C. *et al.* Diversity of Mycobiota in Spanish Grape Berries and Selection of *Hanseniaspora uvarum* U1 to Prevent Mycotoxin Contamination. **Toxins**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 649, 2021.
- GRAHOVAC, J.; PAJČIN, I.; VLAJKOV, V. Bacillus VOCs in the Context of Biological Control. **Antibiotics**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 581, 2023.
- GUARDADO-VALDIVIA, L. *et al.* Identification and characterization of a new *Bacillus atrophaeus* strain B5 as biocontrol agent of postharvest anthracnose disease in soursop (*Annona muricata*) and avocado (*Persea americana*). **Microbiological Research**, [s. l.], v. 210, p. 26–32, 2018.
- GUEVARA-AVENDAÑO, E. *et al.* Avocado rhizobacteria emit volatile organic compounds with antifungal activity against *Fusarium solani*, *Fusarium* sp. associated with Kuroshio shot hole borer, and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Microbiological Research**, [s. l.], v. 219, p. 74–83, 2019.
- GUO, X. *et al.* *Bacillus amyloliquefaciens* M73 reduces postharvest decay and promotes anthocyanin accumulation in Tarocco blood orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) during cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], v. 182, p. 111698, 2021.
- HAJOK, I. *et al.* A risk assessment of dietary exposure to ochratoxin A for the Polish population. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 284, p. 264–269, 2019.
- HOCKING, A. D. SPOILAGE PROBLEMS | Problems Caused by Fungi. *In*: **ENCYCLOPEDIA OF FOOD MICROBIOLOGY**. [S. l.]: Elsevier, 2014. p. 471–481. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123847300003153>. Acesso em: 25 dez. 2023.
- HSIEH, T.-F. *et al.* Insights into Grape Ripe Rot: A Focus on the *Colletotrichum gloeosporioides* Species Complex and Its Management Strategies. **Plants**, [s. l.], v. 12, n. 15, p. 2873, 2023.
- IARC. **Chemical Agents and Related occupations volume 100 F A Review of Human Carcinogens**. [S. l.]: IARC (International Agency for Research on Cancer), 2012. Disponível em: Acesso em: 24 jun. 2024.
- IARC. **EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins Volume 56**. [S. l.: s. n.], 1993. Disponível em: <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc>. Acesso em: 24 jun. 2024.

- INTERNATIONAL ORGANISATION OF VINE AND WINE - OIV. **World Statistics What we do**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.oiv.int/what-we-do/global-report?oiv>. Acesso em: 23 jun. 2024.
- KASFI, K. *et al.* Characterization of antagonistic microorganisms against *Aspergillus* spp. from grapevine leaf and berry surfaces. **Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 100, n. 2, p. 179–190, 2018.
- KASSEMAYER, H.-H. Fungi of Grapes. *In*: KÖNIG, H.; UNDEN, G.; FRÖHLICH, J. (org.). **Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 103–132. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-60021-5_4. Acesso em: 25 dez. 2023.
- KELLY, J. *et al.* Impact of *Botrytis cinerea* -infected grapes on quality parameters of red wine made from withered grapes. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 439–449, 2022.
- KGANG, I. E. *et al.* Bioassays and proteomics as early detection tools in postharvest management of table grapes (*Vitis vinifera* L.) diseases – A Review. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 53, p. 102645, 2023.
- KHASHABA, R. *et al.* Mycobiota and Mycotoxins Associated With Fresh and Dried Grape Fruits in Egypt. **Assiut Journal of Agricultural Sciences**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 121–132, 2018.
- LATORRE, B. A.; ELFAR, K.; FERRADA, E. E. Gray mold caused by *Botrytis cinerea* limits grape production in Chile. **Ciencia e investigación agraria**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 1–1, 2015.
- LIU, Y. *et al.* Antimicrobial *Bacillus velezensis* HC6: production of three kinds of lipopeptides and biocontrol potential in maize. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 128, n. 1, p. 242–254, 2020.
- LIU, J. *et al.* Biocontrol ability and action mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* Baf1 against *Fusarium incarnatum* causing fruit rot in postharvest muskmelon (cv. Yugu) fruit. **LWT**, [s. l.], v. 181, p. 114714, 2023.
- LIU, L.; XIE, M.; WEI, D. Biological Detoxification of Mycotoxins: Current Status and Future Advances. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 1064, 2022.
- LOI, M. *et al.* Advanced mycotoxin control and decontamination techniques in view of an increased aflatoxin risk in Europe due to climate change. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 13, p. 1085891, 2023.
- LOVATO, A. *et al.* Specific molecular interactions between *Vitis vinifera* and *Botrytis cinerea* are required for noble rot development in grape berries. **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], v. 156, p. 110924, 2019.
- MALIR, F. *et al.* Hazard characterisation for significant mycotoxins in food. **Mycotoxin Research**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 81–93, 2023.
- MELGUIZO, C. *et al.* Reconsidering the Co-Occurrence of *Aspergillus flavus* in Spanish Vineyards and Aflatoxins in Grapes. **Agriculture**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 1998, 2023.
- MEUNIER, M.; STEEL, C. C. Effect of *Colletotrichum acutatum* ripe rot on the composition and sensory attributes of Cabernet Sauvignon grapes and wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 223–227, 2009.
- MONDANI, L. *et al.* Pest Management and Ochratoxin A Contamination in Grapes: A Review. **Toxins**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 303, 2020.

- NDIAYE, S. *et al.* Current Review of Mycotoxin Biodegradation and Bioadsorption: Microorganisms, Mechanisms, and Main Important Applications. **Toxins**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 729, 2022.
- OSTRY, V. *et al.* Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. **Mycotoxin Research**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 65–73, 2017.
- OTOGURO, M.; SUZUKI, S. Status and future of disease protection and grape berry quality alteration by micro-organisms in viticulture. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 67, n. 2, p. 106–112, 2018.
- PALAZZINI, J. M. *et al.* *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: Genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. **Microbiological Research**, [s. l.], v. 192, p. 30–36, 2016.
- PANTELIDES, I. S. *et al.* Biodiversity and ochratoxin A profile of *Aspergillus* section *Nigri* populations isolated from wine grapes in Cyprus vineyards. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 67, p. 106–115, 2017.
- PASSAMANI, F. R. F. *et al.* Effect of Temperature, Water Activity, and pH on Growth and Production of Ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian Grapes. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 77, n. 11, p. 1947–1952, 2014.
- PUBCHEM NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **Aflatoxin**. [S. l.], 2024a. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=aflatoxin>. Acesso em: 25 jun. 2024.
- PUBCHEM NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **Ochratoxin A**. [S. l.], 2024b. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ochratoxin-A>. Acesso em: 25 jun. 2024.
- PUBCHEM NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **Ochratoxin B**. [S. l.], 2024c. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ochratoxin-B>. Acesso em: 25 jun. 2024.
- PUBCHEM NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **Ochratoxin C**. [S. l.], 2024d. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ochratoxin-c>. Acesso em: 25 jun. 2024.
- QI, T. F. *et al.* Diversity of Mycotoxin-Producing Black *Aspergilli* in Canadian Vineyards. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 64, n. 7, p. 1583–1589, 2016.
- QUDES, R. *et al.* Mancozeb-induced cytotoxicity in human erythrocytes: enhanced generation of reactive species, hemoglobin oxidation, diminished antioxidant power, membrane damage and morphological changes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 193, p. 105453, 2023.
- RABBEE, M. *et al.* *Bacillus velezensis*: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes. **Molecules**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 1046, 2019.
- RÁDULY, Z. *et al.* Toxicological and Medical Aspects of *Aspergillus*-Derived Mycotoxins Entering the Feed and Food Chain. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, p. 2908, 2020.
- REN, X. *et al.* Control of Aflatoxigenic Molds by Antagonistic Microorganisms: Inhibitory Behaviors, Bioactive Compounds, Related Mechanisms, and Influencing Factors. **Toxins**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 24, 2020.
- REVISTA ADEGA. **Uma colheita marcada pelos extremos climáticos Colheita mundial de vinho será a menor em 62 anos**. [S. l.], 2024. Disponível em: <https://revistaadega.uol.com.br/artigo/colheita-mundial-de-vinho-sera-menor-em-62-anos.html>. Acesso em: 23 jun. 2024.
- RIENTH, M. *et al.* Modifications of Grapevine Berry Composition Induced by Main Viral and Fungal Pathogens in a Climate Change Scenario. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 12, p. 717223, 2021.

- ROMERO, I. *et al.* Table Grapes during Postharvest Storage: A Review of the Mechanisms Implicated in the Beneficial Effects of Treatments Applied for Quality Retention. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 23, p. 9320, 2020.
- ROSA, C. A. R. *et al.* Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Additives & Contaminants**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 358–364, 2004.
- ROUXINOL, M. I. *et al.* Wine Grapes Ripening: A Review on Climate Effect and Analytical Approach to Increase Wine Quality. **Applied Biosciences**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 347–372, 2023.
- SHAFI, J.; TIAN, H.; JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 446–459, 2017.
- SHEN, F. *et al.* Study on the occurrence law and green control of grape gray mold from the perspective of ecological balance. **Bioengineered**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 779–790, 2021.
- SILVEIRA, R. D. *et al.* *Aspergillus carbonarius*-derived ochratoxins are inhibited by Amazonian *Bacillus* spp. used as a biocontrol agent in grapes. **Food Additives & Contaminants: Part A**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 158–169, 2022.
- SOLAIRAJ, D. *et al.* Molecular explication of grape berry-fungal infections and their potential application in recent postharvest infection control strategies. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 116, p. 903–917, 2021.
- SOMMA, S.; PERRONE, G. Diversity of black *Aspergilli* and mycotoxin risks in grape, wine and dried vine fruits The grape chain. **Phytopathologia Mediterranea**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 131–147, 2012.
- STATISTICS DEPARTMENT OF THE INTERNATIONAL ORGANISATION OF VINE AND WINE (OIV). **ANNUAL ASSESSMENT OF THE WORLD VINE AND WINE SECTOR IN 2022**. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: https://www.oiv.int/sites/default/files/documents/OIV_Annual_Assessment-2023.pdf. Acesso em: 23 jun. 2024.
- STEEL, C. C.; BLACKMAN, J. W.; SCHMIDTKE, L. M. Grapevine Bunch Rots: Impacts on Wine Composition, Quality, and Potential Procedures for the Removal of Wine Faults. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 61, n. 22, p. 5189–5206, 2013.
- SYRGABEK, Y.; ALIMZHANOVA, M. Modern Analytical Methods for the Analysis of Pesticides in Grapes: A Review. **Foods**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 1623, 2022.
- TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; MAGAN, N. *Aspergillus* species and mycotoxins: occurrence and importance in major food commodities. **Current Opinion in Food Science**, [s. l.], v. 23, p. 38–43, 2018.
- TARIQ, M. *et al.* Biological control: a sustainable and practical approach for plant disease management. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science**, [s. l.], v. 70, n. 6, p. 507–524, 2020.
- THAKUR, D.; TEJA, S. Mycotoxins and Toxic Fungus in Food: Prevention and Sustainable Management Techniques. *In*: THAKUR, M. (org.). **Sustainable Food Systems (Volume II)**. Cham: Springer Nature Switzerland, 2024. (World Sustainability Series). p. 343–363. Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/978-3-031-46046-3_17. Acesso em: 26 dez. 2023.
- THOMIDIS, T. *et al.* Effects of nitrogen and irrigation on the quality of grapes and the susceptibility to *Botrytis* bunch rot. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 212, p. 60–68, 2016.

- TINI, F.; BECCARI, G.; COVARELLI, L. Fungal species and toxins in wines and grapes in the Mediterranean area. *In: THE MEDITERRANEAN DIET*. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 503–515. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128186497000448>. Acesso em: 25 dez. 2023.
- TÓPOR, A. *et al.* Impact of biodynamic viticulture on the occurrence of fungi and mycotoxins, antioxidant activity, volatile and phenolic profile of Chardonnay grapes. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 55, p. 102978, 2023.
- TUDI, M. *et al.* Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 1112, 2021.
- UNIÃO EUROPEIA. **REGULAMENTO (UE) 2023/915 DA COMISSÃO de 25 de abril de 2023**. relativo aos teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios e que revoga o Regulamento (CE) n.o 1881/2006. 2023. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32023R0915&qid=1692107082886>. Acesso em: 25 jun. 2024.
- VERAS, F. F. *et al.* Colonization of *Aspergillus carbonarius* and accumulation of ochratoxin A in *VITIS VINIFERA*, *VITIS LABRUSCA*, and hybrid grapes – research on the most promising alternatives for organic viticulture. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 101, n. 6, p. 2414–2421, 2021.
- VERAS, F. F. *et al.* Inhibition of mycotoxin-producing fungi by *Bacillus* strains isolated from fish intestines. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 238, p. 23–32, 2016.
- VERAS, F. F.; SILVEIRA, R. D.; WELKE, J. E. *Bacillus* spp. as a strategy to control fungi and mycotoxins in food. **Current Opinion in Food Science**, [s. l.], v. 52, p. 101068, 2023.
- VISAGIE, C. M. *et al.* Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). **Studies in Mycology**, [s. l.], v. 78, n. 1, p. 1–61, 2014.
- WANG, S.-Y. *et al.* Biocontrol Ability of the *Bacillus amyloliquefaciens* Group, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. nakamurai*, and *B. siamensis*, for the Management of Fungal Postharvest Diseases: A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 70, n. 22, p. 6591–6616, 2022.
- WEI, Y.; WANG, L.; LIU, J. The diabetogenic effects of pesticides: Evidence based on epidemiological and toxicological studies. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 331, p. 121927, 2023.
- WELKE, J. E. Fungal and mycotoxin problems in grape juice and wine industries. **Current Opinion in Food Science**, [s. l.], v. 29, p. 7–13, 2019.
- WU, Q. *et al.* Differential Expression of Genes Related to Growth and Aflatoxin Synthesis in *Aspergillus flavus* When Inhibited by *Bacillus velezensis* Strain B2. **Foods**, [s. l.], v. 11, n. 22, p. 3620, 2022.
- WÜRZ, D. A. *et al.* Effects of leaf removal on grape cluster architecture and control of Botrytis bunch rot in Sauvignon Blanc grapevines in Southern Brazil. **Crop Protection**, [s. l.], v. 131, p. 105079, 2020.
- YIN, Y. *et al.* Fungicide Resistance: Progress in Understanding Mechanism, Monitoring, and Management. **Phytopathology®**, [s. l.], v. 113, n. 4, p. 707–718, 2023.

- YUAN, H. *et al.* Isolation and Characterization of *Bacillus velezensis* Strain P2-1 for Biocontrol of Apple Postharvest Decay Caused by *Botryosphaeria dothidea*. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, p. 808938, 2022.
- YUSEFI, J. *et al.* Occurrence of Ochratoxin A in Grape Juice of Iran. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 140–146, 2018.
- ZHANG, Y. *et al.* Characterization of *Bacillus velezensis* E2 with abilities to degrade ochratoxin A and biocontrol against *Aspergillus westerdijkiae* fc-1. **Toxicon**, [s. l.], v. 216, p. 125–131, 2022.
- ZHOU, Q. *et al.* Application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* NCPSJ7 against *Botrytis cinerea* in postharvest Red Globe grapes. **Food Science & Nutrition**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 1499–1508, 2020.
- ZINGALES, V. *et al.* Climate Change and Effects on Molds and Mycotoxins. **Toxins**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 445, 2022.