

DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA A PARTIR DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DE SUCO DE UVA PARA CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DO FUNGO *Alternaria alternata*

Isabella de Carvalho Fernandes Prado (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Denise Tiemi Uchida (Doutoranda), Juliana Cristina Castro (Coorientadora), Miguel Machinski Junior (Orientador), e-mail: ra112556@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

Área e subárea: Ciências da Saúde / Farmácia / Toxicologia

Palavras-chave: micotoxina, uva niágara, fungo filamentosos.

Resumo:

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um meio de cultura a partir de resíduo agroindustrial de suco de uva para o crescimento de *Alternaria alternata*. Inicialmente, foi desenvolvido o meio de cultura com resíduo. *A. alternata*, fungo deteriorante de frutas e produtor de micotoxinas, isoladas previamente de frutos de uva cultivar Niágara, foi cultivado em meio padrão, ágar batata dextrose (BDA) e meios desenvolvidos com diferentes % de resíduo (MRU). O mesmo foi avaliado quanto ao crescimento ao final do seu cultivo (10 dias). Os resultados obtidos mostraram que o meio de cultura contendo resíduo de uva foi eficaz para favorecer o crescimento fúngico. Quando comparado com o controle contendo apenas meio BDA verificou-se que o meio MRU foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$), indicando que o meio de cultura pode auxiliar em estudos científicos, uma vez que a *A. alternata* apresenta um ótimo crescimento em MRU frente a outros meios convencionais.

Introdução

A uva é um dos frutos amplamente consumido no Brasil, entre suas diversas cultivares, que além de contribuir com a economia do país, dispõe de alto teor de compostos fenólicos, compostos químicos com caráter antioxidante, como resveratrol, anti-inflamatório e atividades antimicrobianas (SCHAFFER et al., 2019). Entretanto, um dos preocupantes fatores que agravam a qualidade e comercialização deste fruto, é a presença de microrganismos deteriorantes e patogênicos durante a pré e pós-colheita.

As doenças durante a pré e pós-colheita acarretam perdas consideráveis aos viticultores frente a contaminação com microrganismos, como fungos filamentosos. Entre as formas de redução de perda da produção e manutenção da qualidade dos frutos, há a aplicação de agrotóxicos sintéticos visando a redução da contaminação dos fungos. Entretanto, a redução da utilização destes compostos, afim de contribuir com o meio ambiente é crescente (STOCCO et al., 2019).

Um dos microrganismos preocupantes nesta cultivar, é pertencente ao gênero *Alternaria*, fungo filamentosos e deteriorante e, que afeta diretamente os lucros dos agricultores, assim como qualidade dos frutos *in natura*. Este gênero pode estar presente ainda na planta e fruto de forma latente, que sob condições adequadas durante a pós-colheita, como atividade de água, temperatura e redução de compostos de defesa do fruto, se manifestam (PAVÓN MORENO et al., 2012; STOCCO et al., 2019). Visando auxiliar na otimização do crescimento e características do fungo frente a diferentes meios de crescimento para auxiliar em estudos científicos, o objetivo deste projeto propõe realizar o desenvolvimento do meio de cultura enriquecido com resíduo agroindustrial do suco de uva para crescimento do fungo isolado *Alternaria alternata*.

Materiais e Métodos

Cultivo do fungo

A cepa foi cultivada em BDA e ágar desenvolvido com resíduo de uva advinda de uma cooperativa agroindustrial. Os testes foram desenvolvidos no Laboratório de Toxicologia da Universidade Estadual de Maringá. Os meios desenvolvidos foram baseados na metodologia de Vaquera et al. (2016, com modificações), onde o meio foi preparado nas concentrações de 100; 200; 300; 400; 500 e 600 g/L do resíduo de uva (MRU), água; e 15 g de ágar. A atividade de água (Aw) do meio foi ajustada com variação da mesma de 0,95 a 0,99 com glicerol 87 % (grau analítico), com auxílio de medidor de atividade de água (AquaLab). As culturas em BDA e meios desenvolvidos (MRU) foram incubadas a 28 °C por 10 dias para extração e ensaios experimentais *in vitro*.

Morfologia do fungo - Crescimento micelial

Foram preparados meios de cultura contendo MRU nas concentrações de 100; 200; 300 e 400 g/L. O resíduo de uva foi previamente pesado, triturado em Blender com auxílio de água destilada e incorporado nessa solução 15 g de Ágar. Após, a Aw foi ajustada entre 0,95-0,99 e o meio de cultura foi autoclavado. O MRU e o BDA previamente autoclavados foram emplacados em placas de Petri (20 mL) sob fluxo laminar, inoculado o fungo *A. alternata* e incubado em câmara BOD a 25 °C. A partir do dia 0 até o dia 10, o crescimento micelial foi aferido com o auxílio de uma régua, medindo o halo em quatro eixos diferentes e seu resultado foi obtido em centímetros (cm) e transformado em porcentagem (%). Para análise estatística foi realizado um teste ANOVA seguido do teste de Tukey, utilizando o software *GraphPad Prism*.

Características micro e macroscópicas - Microcultivo

O meio de cultura BDA e MRU foram cortados em quadrados de 1x1 cm e colocados em lâmina de vidro previamente autoclavadas. Uma lamínula foi colocada sob o meio de cultura e inoculado *A. alternata*. A lâmina foi incubada em câmara

BOD por aproximadamente 3 dias. Após, foi separado as lâminas das lamínulas e o meio de cultura foi removido, sobrando apenas o fungo aderido no vidro. Em uma lâmina nova foi adicionado aproximadamente 3 gotas de lactofenol e sobre ela foi colocado a lamínula com fungo aderido. Após secagem, a lâmina foi lida em microscópio óptico Nikon Eclipse E-200 (Tóquio, Japão) e a morfologia foi analisada.

Resultados e Discussão

Cultivo do fungo

Todas as concentrações utilizadas para o desenvolvimento do meio de cultura a atividade de água entre 0,95 a 0,99 são ideais para crescimento fúngico. Através desses testes preliminares, as concentrações selecionadas e consideradas ideias para continuidade do trabalho foram de 100; 200; 300 e 400 g/L, ou seja, 10, 20, 30 e 40%, respectivamente. Nessas concentrações, foram obtidos meios de cultura mais homogêneos e de melhor estabilidade após autoclavagem.

Avaliação do crescimento micelial – características macroscópicas

Os dados obtidos com o crescimento micelial revelaram que o controle, o qual foi utilizado meio de cultura BDA, apresentou um crescimento menor que os meios de cultura contendo resíduo de uva. Através do teste de *Tukey*, todos os meios em que foi utilizado o resíduo de uva quando comparado com o controle apresentou um $p < 0,05$; ou seja, apresentou um resultado significativo. O resíduo de uva incorporado em ágar mostrou-se capaz de melhorar o crescimento micelial do fungo *A. alternata*.

Em estudo realizado por Prendes e colaboradores (2021), foi verificado que uvas de vinho para confecção do meio de cultura favoreceu o crescimento do fungo *A. alternata*, onde foi aplicada análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis, adicionando análise de comparação múltipla, para encontrar diferença significativa ($p > 0,05$).

Avaliação da morfologia – características microscópicas

Os conídios e hifas foram verificados por microscopia óptica na objetiva 10x-40x. Tanto o controle em meio BDA quanto o meio de cultura MRU, apresentaram conídios no formato de pera invertida, ovoides ou elipsoides, com a presença de 2-6 septos transversais e 1-5 septos longitudinais. Resultados semelhantes foram apresentados no trabalho de Muniz e colaboradores (2018), mensurando os conídios da *A. alternata*, foi observado que possuíam dimensões com média de 18,6 x 8,8 μm , 70% dos bicos dos conídios de média 4,7 μm , formato de pera invertida, pode ser ovoides ou elipsoides cor marrom clara, com septos longitudinais e transversais, indicando que o fungo presente nos testes é a *A. alternata*. Foi verificado ainda, que o meio de cultura MRU não alterou a morfologia do fungo quando comparado com o meio BDA, mostrando que esse meio MRU favorece o crescimento e proliferação normal do fungo.

Conclusões

Dessa forma quando comparado com o controle contendo apenas o meio BDA verificou-se que o MRU foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$) indicando que este meio de cultura pode auxiliar nos estudos científicos uma vez que a *A. alternata* apresenta uma certa dificuldade em proliferar em meio de cultura BDA. Mostrando que o meio de cultura MRU foi eficaz para o crescimento fúngico.

Agradecimentos

Ao PIBIC/CNPq-Fundação Araucária-UEM pelo pela bolsa de iniciação científica concedida.

Referências

- MUNIZ, P. H. P. C.; MARQUES, M. G.; PEIXOTO, G. H. S.; SIMÃO, K. G.; CARVALHO, D. D. C. Caracterização morfológica de *Alternaria alternata* associado a sementes de alface americana cv. 'Astra'. Revista de Agricultura Neotropical, Cassilândia-MS, v. 5, n. 1, p.82-86, jan./mar. 2018
- PAVÓN MORENO, M.Á., GONZÁLEZ ALONSO, I., MARTÍN DE SANTOS, R., GARCÍA LACARRA, T. Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. Nutrición Hospitalaria, v.27, p.1772–1781, 2012.
- PRENDES, L. P.; MERÍN, M. G.; ZACHETTI, V. G. L.; PEREYRA, A.; RAMIREZ, M. L.; MORATA DE AMBROSINI, V. I. Impact of antagonistic yeasts from wine grapes on growth and mycotoxin production by *Alternaria alternata*. Journal of Applied Microbiology, v.131, p. 833-843, 2021.
- SCHAFFER, T. K., WOHLBERG, M. F., DE SOUZA MACHADO, F., BORTOLATO, G., MARINHO, J. P., DA SILVA MEDEIROS, N. V., MELO, A., AGOSTINI, F., GERSON, S., FUNCHAL, C., DANI, C. Chronic consumption of purple grape juice in gestational-lactation and post lactation promotes anxiolity effect and antioxidant defense improvement in brain from Wistar male offsprings. Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism, v.15, p.46-54, 2019.
- STOCCO, A. F., DIAZ, M. E., RODRÍGUEZ ROMERA, M. C., MERCADO, L. A., RIVERO, M. L., PONSONE, M. L. Biocontrol of postharvest *Alternaria* decay in table grapes from Mendoza province. Biological Control, v.134, p.114-122, 2019.
- VAQUERA, S.; PATRIARCA, A.; PINTO, V. F. Influence of environmental parameters on mycotoxin production by *Alternaria arborescens*. International Journal of Food Microbiology, v.219, p.44-49, 2016.