

## Ocorrência e Produção de Micotoxinas por Isolados de *Alternaria Alternata* em Tomate

Otniel Freitas-Silva <sup>1</sup>  
Adriana Mabel Torres <sup>2</sup>  
Maria de Lourdes Mendes Souza <sup>3</sup>  
Tânia Barretto Simões Corrêa <sup>4</sup>

A contaminação por fungos em produtos agrícolas pode ocorrer no campo, antes, durante e após a colheita, no processamento, no transporte e/ou na estocagem. Além de representar considerável perda econômica, a proliferação de fungos nos vegetais representa um risco potencial para o homem e animais, pela ingestão de metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos, denominados micotoxinas.

O fungo *Alternaria alternata*, está entre um dos mais importantes fitopatógenos, tanto por causar doenças em diversas culturas, como pelo seu alto potencial de produção de micotoxinas, dentre as quais destacam-se o alternariol (AOH), o alternariol monometil-éter (AME), o altenueno (ALT) e a altertoxina I (ATX-I). Mesmo conhecendo a toxicidade, o mecanismo de contaminação e de proliferação dos fungos produtores, nenhum levantamento foi feito no Brasil com relação à presença destas toxinas em culturas fúngicas e frutos de tomate e o risco potencial para a saúde pública.

O alternariol (AOH), o alternariol monometil éter (AME) e a altertoxina I (ATX-I) são metabólitos secundários produzidos em grandes quantidades pela maioria das espécies de *Alternaria*. Rossett et al. (1957) encontraram as duas

primeiras substâncias constituindo 13% do peso seco do micélio de um isolado de *A. tenuis*. Outros estudos evidenciaram que a concentração de AME + AOH chegava a atingir até 20% do extrato cru nos isolados de *Alternaria* (Coombe et al., 1970; Pero et al., 1973a; 1973b; Pero & Harvan, 1973).

A fitopatogenicidade do AME foi observada por Pero & Main (1970), ao induzirem a clorose em folhas da planta de tabaco intactas, pela injeção de AME extraído de culturas de *Alternaria tenuis*. Porém, esta toxina não foi detectada em folhas de tabaco naturalmente contaminadas. Não ficou demonstrado se houve inibição da produção de clorofila ou destruição da clorofila existente. Sobers & Douplik (1972), testando 137 isolados de *Alternaria longipes*, sugeriram a existência de uma relação entre patogenicidade em folhas de tabaco e em frangos de um dia de vida.

Isolados de *Alternaria* spp. de tomate, maçã, laranja, limão (Stinson et al., 1981; Robiglio & Lopez, 1995; Viñas et al., 1992) e sementes de colza (Viñas et al., 1993), produziram AME e AOH em meio de cultura sintético. Wei & Swartz (1985) testaram diferentes meios de cultura

<sup>1</sup> Eng. Agrôn., M.Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas 29501, CEP 23.020-470, Rio de Janeiro, RJ. E-mail: ofreitas@ctaa.embrapa.br

<sup>2</sup> Microbiologista, Dr., Departamento de Microbiología y Inmunología da Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta Nac. 36, Km 601, CP 5800, Río Cuarto, Córdoba, Argentina. Email: atorres@exa.unrc.edu.ar

<sup>3</sup> Farmacêutica, M.Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos. E-mail: mlourdes@ctaa.embrapa.br

<sup>4</sup> Eng. química, M.Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos. E-mail: tania@ctaa.embrapa.br

sintético, semi-sintético e natural (arroz), para a produção de AME e AOH. No teste o meio semi-sintético destacou-se em relação aos demais.

Dentre os vegetais passíveis de contaminação estão os tomates, altamente susceptíveis à *Alternaria* spp., um dos principais patógenos da cultura na pré e pós colheita, cuja contaminação ocorre principalmente nas regiões de rompimento do fruto e nas injúrias.

A podridão preta do tomate causada por *Alternaria alternata* freqüentemente provoca perdas substanciais na indústria de produtos de tomates. A formação de orvalho na superfície do fruto é o fator mais importante para o desenvolvimento da podridão preta na ausência de chuvas. A baixa temperatura (5 a 10°C) também pode predispor o fruto à infecção por *A. alternata* (Pearson & Hall, 1975).

O objetivo principal deste trabalho foi verificar a ocorrência de AOH, AME, ALT e ATX-I em isolados de *Alternaria alternata* patogênicos ao tomate por cromatografia de camada delgada (CCD).

## Material e Métodos

Foram testadas vinte culturas de *Alternaria alternata* obtidas de tomate pós-colheita e cultivadas em meio de BDA por 7 dias. Após este período houve transferência de um disco de micélio para placas contendo meio sintético de arroz para produção de micotoxinas (50g de arroz moido; 5g de licor de milho; 20g de agar em 1000mL de água destilada). As placas foram incubadas em estufa a 25°C durante 14 dias.

A determinação da capacidade toxigênica dos isolados de *Alternaria* cultivados em substrato de arroz foi realizada pelo método direto em culturas. Discos de micélio de *A. alternata* de 0,5cm de diâmetro, comprovadamente patogênicos a tomate, foram aplicados diretamente em placas de cromatografia de camada delgada (CCD), com o lado do micélio voltado para a sílica, os quais foram retirados após a impregnação. Após a corrida cromatográfica observou-se a formação de manchas que foram comparadas aos padrões das micotoxinas testadas (AOH, AME, ALT e ATX-I) aplicados na mesma placa. A cromatografia de camada delgada foi desenvolvida em placa de sílica-gel de 20 x 20 cm / 0.25cm de espessura, com indicador de fluorescência (Merck 5628) e a fase móvel utilizada na corrida foi TEF ( tolueno : acetado de etila : ác. fórmico, 6:3:1). As toxinas foram identificadas por sua fluorescência em luz de ultravioleta de ondas longas (364nm) e por comparação das amostras com relação as toxinas padrões.

## Resultados e Discussão

O potencial toxigênico avaliado dos isolados de *Alternaria alternata* foi determinado e evidenciado pela presença de fluorescência e comparação com as manchas dos padrões. Dos 20 (vinte) isolados testados, 11 (onze) foram positivos, sendo que 10 (dez) produziram AME, 7 (sete) AOH, 6 (seis) ALT e 5 (cinco) produziram simultaneamente AME, AOH e ALT. Não houve produção de ATX-I (Fig. 1).

Estudos posteriores terão como objetivo a quantificação de toxinas *A. alternata* em tomates infectados, bem como em isolados cultivados em meio sintético.

Os resultados do estudo em questão indicam o risco potencial da ocorrência de micotoxinas de *Alternaria alternata* em tomate e seus subprodutos no Brasil, especialmente para a produção de Alternariol monometil-éter. Uma das formas de evitar a formação destas micotoxinas é minimizar as portas de entrada do fungo, como ferimentos e machucaduras, principalmente durante o manuseio pós-colheita.

Este é o primeiro relato de produção de micotoxinas de *Alternaria* no Brasil.

	AME	AOH	ATX-I	ALT
<b>Padrões</b>	X	X	X	X
CNPH-6				
CNPH-8				
<b>CNPH-21</b>	X	X		
CNPH-22				
CNPH-24				
<b>CNPH-33</b>		X		
CNPH-48				
CNPH-49				
<b>CNPH-59</b>	X			
<b>CNPH-60</b>	X	X		X
<b>UFLA-2</b>	X			
UFLA-3				
UFLA-4				
<b>UFLA-5</b>	X	X		X
<b>UFLA-7</b>	X			X
UFLA-8				
<b>UFLA-9</b>	X	X		X
<b>UFLA-10</b>	X	X		X
<b>IMI</b>	X			
<b>ITEM 539</b>	X	X		X

Fig. 1. Potencial toxigênico de isolados de *Alternaria alternata*

## Referências Bibliográficas

- COOMBE, R.G.; JACOBS, J.J.; WATSON, T.R. Metabolite of some *Alternaria* species. The structures of altenusin and dehydroaltenusin. **Australian Journal of Chemistry**, Melbourne, v.23, p.2343-2351, 1970.
- PEARSON, R, C.; HALL, D. H. Factors affecting the occurrence and severity of blackmold of ripe tomato fruit caused by *Alternaria alternata*. **Phytopathology**, Saint Paul, Mimn., v.65, n.12, p.1352-1359, 1975.
- PERO, R.W.; HARVAN, D. Simultaneous detection of metabolites from several toxigenic fungi. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.80, p. 255-258, 1973.
- PERO, R.W.; MAIN, C.E. Chlorosis of tobacco induced by alternariol monomethyl ether produced by *Alternaria tenuis*. **Phytopathology**, Saint Paul, Mimn., v.60, n.12, p.1570-1573, 1970.
- PERO, R.W.; HARVAN, D.; BLOIS, M.C. Isolation of the toxin, altenusol, from the fungus, *Alternaria tenuis* Auct. **Tetrahedron Letters**, Elmsford, v.12, p.945-948, 1973a.
- PERO, R.W.; POSNER, H.; BLOIS, M.C; HARVAN, D; SPALDING. Toxicity of metabolites produced by the *Alternaria tenuis* **Environment Health Perspectives**, Research Triangle Park, NC, p.87-94, Jun., 1973b.
- ROBIGLIO, .A.L.; LOPEZ, S.E. Mycotoxin production by *Alternaria alternata* strains isolated from red delicious apples in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.24, p.413-417, 1995.
- ROSSETT, T; SANKHALA, R. H.; STICKINGS, C.E.; TALOR, M.E.U.; THOMAS, R. Studies in the biochemistry of microorganisms 103. Metabolites of *Alternaria tenuis* Auct.: Culture filtrate products. **Biochemical Journal**, Essex, v.67, p.390-400, 1957.
- SOBERS, E.K.; DOUPNIK, L.B. Relationship of pathogenicity to tobacco leaves and toxicity to chicks isolates of *Alternaria longipes*. **Applied Microbiology**, Washington, D.C., v.36, p.655-657, 1972.
- STINSON, E.E.; OSMAN, S.F.; HEISLER, E.G.; SICILIANO, J.; BILLS, D.D. Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges and lemons. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, D.C., v.29, n.4, p.790-792, 1981.
- VIÑAS, I.; BONET, J.; SANCHIS, V. Incidence and mycotoxin production by *Alternaria tenuis* in decayed apples. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.14, p.284-287, 1992.
- VIÑAS, I.; SIBILIA, A.; SALA, N.; SANCHIS, V.; VISCONTI, A. Mycotoxins and toxigenic species incidence in oilseed rape. **Food Control**, Oxford, Ames, v.4, n.2, p.79-82, 1993.
- WEI, C.; SWARTZ, D.D. Growth and production of mycotoxins by *Alternaria alternata* in synthetic, semi-synthetic and rice media. **Journal of Food Protection**, v.48, n.4, p.306-311, 1985.

### Comunicado Técnico, 42

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,  
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Agroindústria de Alimentos**  
Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba  
23020-470 - Rio de Janeiro - RJ  
Fone: (0XX21) 2410-7400  
Fax: (0XX21) 2410-1090 / 2410-7498  
E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

1ª edição  
1ª impressão (2001): 50 exemplares

### Comitê de publicações

**Presidente:** Esdras Sundfeld.  
**Executivo. Membros:** Maria Ruth Martins Leão, Neide Botrel Gonçalves, Regina Celi Araújo Lago, Renata Torrezan, Virginia Martins da Matta.

### Expediente

**Supervisor editorial:** Maria Ruth Martins Leão.  
**Editoração eletrônica:** Senai Artes Gráficas.