

ECOLOGIA DAS RELACOES ENTRE  
FUNGOS DO GRUPO *Aspergillus ochraceus*  
E OUTROS FUNGOS DE ARMAZENAMENTO -  
ESTUDOS PRELIMINARES PARA CONTROLE  
BIOLOGICO DA PRODUCAO DE OCRATOXINA A

14/89

**ECOLOGIA DAS RELAÇÕES ENTRE FUNGOS DO  
GRUPO *Aspergillus ochraceus* E OUTROS FUNGOS  
DE ARMAZENAMENTO - ESTUDOS PRELIMINARES  
PARA CONTROLE BIOLÓGICO DA PRODUÇÃO DE  
OCRATOXINA A**

**06/1989**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

*Parcer*  
Este exemplar corresponde a redação  
final da tese defendida por Ilse Apa-  
recida Paschoal Moreira e aprovada  
pela comissão julgadora em 19/6/89  
Campinas, 19 de Junho de 1989.

*Junia L. Valente*  
Presidente da Banca

ECOLOGIA DAS RELAÇÕES ENTRE FUNGOS DO GRUPO  
*Aspergillus ochraceus* E OUTROS FUNGOS DE  
ARMAZENAMENTO - ESTUDOS PRELIMINARES PARA  
CONTROLE BIOLÓGICO DA PRODUÇÃO DE  
OCRATOXINA A

ILSE PASCHOAL MOREIRA  
Orientador: Profa. Dra. SONIA P. SALZBERG

Tese apresentada à Faculdade  
de Engenharia de Alimentos  
para obtenção do grau de  
mestre em Ciência de Alimentos

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

A memória de meu pai

*JOSÉ LUIZ CAMARGO MOREIRA*

Aos que estão sempre presentes

*RENATO*

*WILMA*

*MARISA*

*ELOISA*

*JOSÉ ANTONIO*

*LUÍS AUGUSTO*

*MARTHA*

## **AGRADECIMENTOS**

A Profa. Dra. **SONIA P. SALZBERG**, por possibilitar a realização deste trabalho

Aos Profs. **LUIS ANTONIO B. AGUIAR** e **SIDNEY T. GOMES**, pelas valiosas sugestões, orientação, apoio e amizade

A **ROSA TOSELLO** e **JAQUELINE GIRNOS**, incansáveis, indispensáveis e acima de tudo amigas

Aos funcionários e colegas do laboratório de Microbiologia de Alimentos **NORMA THEREZINHA, MARIA, OLIVIA, DENISE, ELISA, GLAUCIA, MARIKO** e **NEUSEL** pelo apoio e amizade em todos os momentos

Ao Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, e em especial a Profa. **MARIA JOSÉ DOS SANTOS**, pela identificação das cepas isoladas

Ao Dr. **URBAN L. DIENER**, pelo fornecimento de padrões analíticos de ocratoxina A e de material bibliográfico

A **Northern Regional Research Laboratory (NRRL)** e ao Dr. **J. J. ELLIS**, pelo fornecimento de algumas das linhagens utilizadas

A **EMBRAPA - Departamento de Informação e Documentação**, pelo auxílio na pesquisa bibliográfica

Aos Funcionários do **COMUT** e da Biblioteca

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos, **CÍCERA JARDETE** e **MARCOS**

A **FAPESP, CNPq** e **Fundação Atlantic**, pelo apoio financeiro

A **Associação Brasileira de Industrias de Alimentos (ABIA)**, pelo auxílio no custeio da confecção da tese

## INDICE GERAL

Indice Geral .....	1
Indice das Tabelas .....	5
Indice das Ilustrações .....	8
Resumo .....	10
Summary .....	12
Introdução .....	14
Revisão Bibliográfica .....	18
Ocratoxina .....	18
Introdução .....	18
Biossíntese .....	20
Microrganismos Produtores .....	21
Ocorrência de Contaminação Natural por Ocratoxi- na .....	23
Toxicidade das Ocratoxinas .....	24
Metabolismo das Ocratoxinas .....	27
Ocorrência de Ocratoxicoses .....	29
Medidas de Controle da Produção de Ocratoxina ..	30

Interações Microbiológicas e Controle da Produção de Micotoxinas .....	31
Interações entre Microrganismos .....	31
Efeito de Microrganismos Competidores no Desenvolvimento de Fungos Toxigênicos .....	33
Degradação Microbiológica de Micotoxinas .....	40
Material e Métodos .....	43
Microrganismos Toxigênicos .....	43
Outros Microrganismos .....	43
Meios de Cultura .....	44
Seleção de Fungos em Alimentos .....	45
Identificação dos Fungos Isolados .....	46
Determinação da Taxa de Crescimento dos Microrganismos .....	46
Determinação de Interação entre os Microrganismos em Meio Sólido .....	47
Preparo de Inóculo e Método de Inoculação para os Experimentos em Meio Líquido .....	49
Avaliação do Desenvolvimento dos Microrganismos em Meio Líquido .....	49
Determinação do Peso Seco .....	49
Extração da Ocratoxina .....	50
Padrão de Ocratoxina .....	50
Cromatografia de Camada Delgada (CCD) dos Extratos de Culturas .....	50
Cálculo da Concentração de Ocratoxina .....	51



Confirmação Química da Ocratoxina .....	51
Produção dos Filtrados de Culturas .....	52
Tratamentos dos Filtrados de Culturas Antagonistas.	52
Determinação da Ação dos Filtrados de Culturas An- tagonistas sobre o Desenvolvimento dos Fungos Toxi- gênicos .....	52
Ação dos Filtrados de Culturas na Germinação dos Esporos .....	53
Estudo de Degradação da Ocratoxina A em Meio Líqui- do .....	53
Preparo de Suspensão de Esporos .....	54
Bioautografia dos Filtrados de Culturas .....	54
Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas sobre a Invasão dos Fungos Toxigênicos em Sementes .....	58
Cuidados com a Contaminação do Laboratório .....	59
Resultados .....	60
Levantamento da Incidência de Fungos do Grupo Aspergillus ochraceus em Alimentos .....	60
Microrganismos Toxigênicos .....	61
Seleção de Fungos Antagonistas .....	61
Taxa de Crescimento dos Microrganismos .....	62
Interações entre as Colônias dos Microrganismos em meio de Cultura Sólido .....	62
Desenvolvimento dos Fungos Toxigênicos em Meio Lí- quido .....	65

Desenvolvimento dos Fungos Antagonistas em Meio Líquido .....	67
Determinação de Antagonismo em Meio Líquido- Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas sobre o Desenvolvimento dos Fungos Toxigênicos .....	67
Efeito do pH no Desenvolvimento dos Fungos Toxigênicos .....	76
Estudo de Degradação da Ocratoxina pelos Fungos Antagonistas em Meio Líquido .....	78
Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas sobre a Invasão dos Fungos Toxigênicos em Sementes .....	79
Discussão .....	119
Conclusões .....	130
Referências Bibliográficas .....	135

## INDICE DAS TABELAS

1	Alimentos Analisados para Seleção de Microrganismos	81
2	Microrganismos Produtores de Ocratoxina .....	83
3	Microrganismos Isolados e Estudados como Antagonis- tas .....	84
4	Microrganismos Obtidos de Coleções de Cultura e Estudados como Antagonistas .....	85
5	Taxa de Crescimento dos Microrganismos .....	86
6	Ação dos Fungos Estudados no Desenvolvimento de <i>Aspergillus alliaceus</i> NRRL 317 em CAM, de Acordo com as Classes de Interações Propostas .....	91
7	Ação dos Fungos Estudados no Desenvolvimento de <i>Aspergillus melleus</i> NRRL 3519 em CAM, de Acordo com as Classes de Interações Propostas .....	92
8	Ação dos Fungos Estudados no Desenvolvimento de <i>Aspergillus ochraceus</i> NRRL 3174 em CAM, de Acordo com as Classes de Interações Propostas .....	93
9	Ação dos Fungos Estudados no Desenvolvimento de <i>Aspergillus ochraceus</i> em CAM, de Acordo com as Classes de Interações Propostas .....	94

10	Ação dos Fungos Estudados no Desenvolvimento de <i>Aspergillus sclerotiorum</i> NRRL 5170 em CAM, de acordo com as Classes de Interações Propostas .....	95
11	Ação dos Fungos Estudados no Desenvolvimento de <i>Aspergillus sulphureus</i> NRRL 4077 em CAM, de acordo com as Classes de Interações Propostas .....	96
12	Desenvolvimento dos Fungos Ocratoxigênicos em Meio Líquido (YES) em 12 Dias de Incubação a 28°C .....	97
13	Desenvolvimento dos Fungos Antagonistas em Meio Líquido (YES) em 15 Dias de Incubação a 28°C .....	98
14	Determinação de Antagonismo em Meio Líquido- 1-Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas sobre o Desenvolvimento de <i>A. alliaceus</i> NRRL 317 .....	99
15	Determinação de Antagonismo em Meio Líquido- 2-Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas sobre o Desenvolvimento de <i>A. melleus</i> NRRL 3519 .....	100
16	Determinação de Antagonismo em Meio Líquido- 3-Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas sobre o Desenvolvimento de <i>A. ochraceus</i> NRRL 3174 .....	101
17	Determinação de Antagonismo em Meio Líquido- 4-Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas sobre o Desenvolvimento de <i>A. ochraceus</i> .....	102
18	Determinação de Antagonismo em Meio Líquido- 5-Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas sobre o Desenvolvimento de <i>A. sclerotiorum</i> NRRL 5170 .....	103

19	Determinação de Antagonismo em Meio Líquido- 6-Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas sobre o Desenvolvimento de <i>A. sulphureus</i> NRRL 4077 .....	104
20	Desenvolvimento dos Fungos Ocratoxigênicos em Meio Líquido (YES) com pH Alcalino, em 12 dias de Incubação a 28°C .....	112
21	Desenvolvimento dos Fungos Ocratoxigênicos em Meio Líquido (YES) com pH Acido, em 12 dias de Incubação a 28°C .....	113
22	Desenvolvimento dos Fungos Ocratoxigênicos nos Filtrados de Cultura dos Fungos do grupo <i>A. niger</i> com pH corrigido para 6,7 .....	117

## INDICE DAS ILUSTRAÇÕES

1	Estrutura das Ocratoxinas .....	19
2	Esquema de Inoculação para Determinação de Interação entre os Microrganismos em Meio Sólido .....	48
3	Esquema de Preparo das Placas de Bioautografia dos Filtrados de Culturas Antagonistas .....	56
4	Esquema de Preparo das Placas de Bioautografia do Filtrado de Cultura de <i>A. alliaceus</i> NRRL 317 .....	57
5	Interação entre os Pares de Fungos, em Relação ao Crescimento das Colônias- 1 - Não agressão .....	87
6	Interação entre os Pares de Fungos, em Relação ao Crescimento das Colônias- 2 - Invasão .....	88
7	Interação entre os Pares de Fungos, em Relação ao Crescimento das Colônias- 3 - Invasão Inversa .....	89
8	Interação entre os Pares de Fungos, em Relação ao Crescimento das Colônias- 4 - Entrelaçamento .....	90

9	Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas sobre o Desenvolvimento de <i>A. alliaceus</i> NRRL 317 .....	105
10	Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas sobre o Desenvolvimento de <i>A. melleus</i> NRRL 3519 .....	106
11	Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas sobre o Desenvolvimento de <i>A. ochraceus</i> NRRL 3174 .....	107
12	Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas sobre o Desenvolvimento de <i>A. ochraceus</i> .....	108
13	Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas sobre o Desenvolvimento de <i>A. sclerotiorum</i> NRRL 5170 ...	109
14	Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas sobre o Desenvolvimento de <i>A. sulphureus</i> NRRL 4077 .....	110
15	Bioautografia de <i>Aspergillus ochraceus</i> sobre Cromatografia de Camada Delgada dos Filtrados Antagonistas .....	111
16	Desenvolvimento dos Fungos Ocratoxigênicos em Diferentes pHs. Crescimento dos Fungos Toxigênicos .	114
17	Desenvolvimento dos Fungos Ocratoxigênicos em Diferentes pHs. Produção de Toxina- 6 <sup>o</sup> dia .....	115
18	Desenvolvimento dos Fungos Ocratoxigênicos em Diferentes pHs. Produção de Toxina- 12 <sup>o</sup> dia .....	116
19	Bioautografia de <i>Aspergillus niger</i> NRRL 6411 sobre Cromatografia de Camada Delgada do Filtrado de <i>Aspergillus alliaceus</i> NRRL 317 .....	118

## RESUMO

Visando o controle biológico da produção de ocratoxina, foram estudadas as interações entre alguns fungos de armazenamento e as linhagens toxigênicas *Aspergillus alliaceus* NRRL 317, *A. melleus* NRRL 3519, *A. ochraceus* NRRL 3174, *A. sclerotiorum* NRRL 5170, *A. sulphureus* NRRL 4077 e uma cepa selvagem de *A. ochraceus* isolada de feijão. Os fungos do grupo *A. ochraceus* apresentam crescimento lento, mas quando em igualdade de condições, mostraram-se bons competidores na colonização de meio de cultura sólido. Nestes experimentos, as colônias dos fungos toxigênicos só foram invadidas por *Aspergillus heteromorphus* e *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582. A produção de toxina não foi inibida, mas sua fluorescência característica no meio CAM sofreu alterações variadas, alguns dias após o contato com 16 dos 24 fungos estudados. Quando cultivados sobre o filtrado de cultura dos fungos competidores, o crescimento dos fungos toxigênicos foi totalmente inibido por *Aspergillus niger* NRRL 6411 e pela cepa selvagem de *A. niger*; inibido em mais que 50% por *A. heteromorphus*, *A. niger* ATCC 9642, *Aspergillus versicolor* ATCC 11730, *Mucor racemosus* e *Trichoderma viride*, e estimulado por *R. arrhizus* NRRL 2582 e *Trichoderma harzianum*. Nestes experimentos, a produção de toxina foi totalmente inibida, exceto nos casos onde houve estímulo ou



não inibição de crescimento. Os fungos competidores quando cultivados no filtrado de cultura de *A. alliaceus* NRRL 317 tiveram seu crescimento totalmente suprimido; entretanto *A. niger* NRRL 6411, *T. viride* e *R. arrhizus* NRRL 2582 quando cultivados pelo método de bioautografia sobre as cromatografias de camada delgada do filtrado toxigênico, não mostraram zonas de inibição de crescimento e foram capazes de degradar até 1,0 µg de ocratoxina A presente. Os filtrados de cultura de *A. heteromorphus*, *A. niger* NRRL 6411 e *T. viride*, que foram bastante eficientes no controle dos fungos toxigênicos nos experimentos em meios de cultura, não mostraram ação protetora contra a invasão de fungos em sementes de feijão.

## SUMMARY

The ecological interaction among some storage fungi and the ochratoxigenic strains *Aspergillus alliaceus* NRRL 317, *A. melleus* NRRL 3519, *A. ochraceus* NRRL 3174, *A. sclerotiorum* NRRL 5170, *A. sulphureus* NRRL 4077, and a wild strain of *A. ochraceus*, isolated from bean, was studied, having in mind, the biological control of ochratoxin production. The fungi belonging to *A. ochraceus* group are slow-growing, but they showed high competitiveness in solid culture media if same conditions are given. In the direct colony interaction experiments, the toxigenic colonies were invaded by *Aspergillus heteromorphus* and *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, and the toxin production was not inhibited, but its typical fluorescence appeared modified in several ways, after contact with 16 of 24 fungi under study. When cultivated in the culture filtrate from competitive fungi, the growth of the toxigenic fungi was totally inhibited by *Aspergillus niger* NRRL 6411 and *A. niger* wild strain, strongly inhibited (above 50%) by *A. heteromorphus*, *A. niger* ATCC 9642, *Aspergillus versicolor* ATCC 11730, *Mucor racemosus* and *Trichoderma viride*, and stimulated by *R. arrhizus* NRRL 2582 and *Trichoderma harzianum*. In these experiments, the toxin production was totally inhibited, except when the growth was not inhibited, or stimulated. All storage fungi studied had their growth totally suppressed when cultivated in

the toxigenic culture filtrate, but when cultivated by the bioautography method on thin layer chromatography, *A. niger* NRRL 6411, *R. arrhizus* NRRL 2582 and *T. viride* showed no zone of growth inhibition, and were able to degrade 1.0  $\mu$ g of ochratoxin A. The culture filtrates of *A. heteromorphus*, *A. niger* NRRL 6411 and *T. viride*, whose action in vitro was efficient to control the growth of toxigenic fungi, did not protect bean seeds against invasion of fungi.

## INTRODUÇÃO

A agricultura, para apresentar os níveis de produtividade exigidos pelo mercado consumidor, precisa estar baseada em pesquisas e tecnologias avançadas. A produção agrícola de cereais envolve atualmente aspectos mais complexos do que simplesmente plantar e colher, como seleção genética de sementes, técnicas de plantio, irrigação e colheita, cuidados com pragas e doenças.

Um aspecto importante na produção de cereais é o armazenamento da produção. Armazenamento inadequado pode causar perdas por deterioração das sementes, ação de insetos e roedores. A deterioração das sementes pode ocorrer naturalmente por ação do seu próprio metabolismo, que não é interrompido após a colheita, ou por ação de microrganismos saprófitas pertencentes à microbiota interna e externa do grão (60,88).

A presença de fungos filamentosos como microbiota normal dos grãos (os chamados fungos de armazenamento), é importante não só por causar a deterioração dos mesmos, mas também porque alguns deles produzem durante seu desenvolvimento substâncias tóxicas, que contaminam as sementes tornando-as impróprias para consumo humano ou animal. Desde a descoberta das aflatoxinas, em 1961 (80,117), até nossos dias foram identificadas centenas dessas substâncias, cuja ação em seres humanos e animais varia de intoxicações agudas a alterações citológicas e histológicas

generalizadas e alterações no material genético (mutagênese e carcinogênese). As toxinas mais conhecidas e estudadas são as aflatoxinas, ocratoxinas, citrinina, zearalenona e tricotecenos, devido às suas potencialidades toxicológicas e carcinogênicas, à frequência e extensão com que contaminam alimentos e rações e às perdas causadas à pecuária, suinocultura e outras criações (88). A maioria dessas toxinas são moléculas resistentes à ação do calor, o que torna praticamente impossível a detoxificação de um alimento (28). Alguns processos de detoxificação existentes utilizam tratamentos com álcalis fortes, mas são processos extremamente caros e inviabilizam o alimento para consumo humano (16,46).

Embora todo alimento seja um substrato adequado para qualquer fungo, a microbiota de um grão é composta de um certo número de espécies dominantes, determinado pela extensão e qualidade da contaminação inicial no campo, pela composição química do alimento e pelas condições (temperatura, umidade e aeração) em que os mesmos são armazenados.

A presença de esporos de fungos em cereais é inevitável e normal, e não implica que o mesmo esteja contaminado ou em processo de deterioração. O que determina a germinação do esporo e o desenvolvimento dos fungos são as condições de armazenamento, integridade física da semente e as relações de antagonismo e sinergismo entre as espécies presentes. Assim, o melhor meio de impedir o desenvolvimento desses fungos é através de boas práticas agrícolas e de armazenamento. É recomendável, por exemplo, o emprego de técnicas de colheita que preservem a integridade física da semente, já que a mesma dificulta que a

microbiota externa atinja o interior do grão, onde teria disponibilidade de nutrientes e umidade necessária para um rápido desenvolvimento. É necessário ainda, proteger o grão durante o amadurecimento, contra pássaros e insetos, e durante o armazenamento, contra insetos e roedores.

Os fungos de armazenamento, embora sejam mais resistentes que a maioria dos microrganismos à baixas umidades e altas temperaturas, em geral tem uma faixa de tolerância bem definida, e o seu desenvolvimento pode ser controlado através desses parâmetros. Em relação aos fungos produtores de toxina, os estudos nesta área estão bastante avançados e, atualmente o meio mais seguro de se impedir a produção de toxinas é a estocagem de cereais em silos e armazéns com temperatura, umidade e aeração estritamente controladas (97).

O Brasil tem apresentado nos últimos anos safras recordes de cereais, devido à utilização de técnicas modernas de agricultura, entretanto, a tecnologia de armazenamento está em épocas pré-históricas, e resume-se a empilhamento de sacas e grãos no interior de velhas construções e, até mesmo, em ruas e praças (3,93,100,114,115). Como controlar temperatura, umidade, aeração, ação de insetos e roedores? Como tentar controlar a produção de toxinas num país onde as faixas médias anuais de temperatura e umidade coincidem com as consideradas ótimas para o desenvolvimento dos fungos toxigênicos?

Neste caso, o estudo das interações ecológicas entre as diferentes espécies de fungos assume grande interesse para a compreensão dos mecanismos que controlam a produção da toxina na natureza. Os estudos nessa área abordam em geral a mais

conhecida das toxinas, o grupo das aflatoxinas, e tem revelado resultados esclarecedores à respeito de inibição ou estímulo na produção da toxina e no crescimento dos fungos aflatoxigênicos, por outros fungos que competem pelo mesmo ambiente. As perspectivas desses estudos são bastante amplas, pois além de permitir conhecer a dinâmica de produção das toxinas na natureza, possibilita-nos a pesquisa de substâncias inibitórias, que possam mais tarde, vir à ser produzidas com tecnologia apropriada, e utilizadas como fungicidas ou fungistáticos.

Tendo em vista estas considerações, escolheu-se o estudo das interrelações entre os fungos do grupo *Aspergillus ochraceus* produtores de ocratoxina, uma potente nefrotoxina com possíveis efeitos carcinogênicos, e outros fungos que apresentam a mesma distribuição ecológica.

## REVISAO BIBLIOGRAFICA

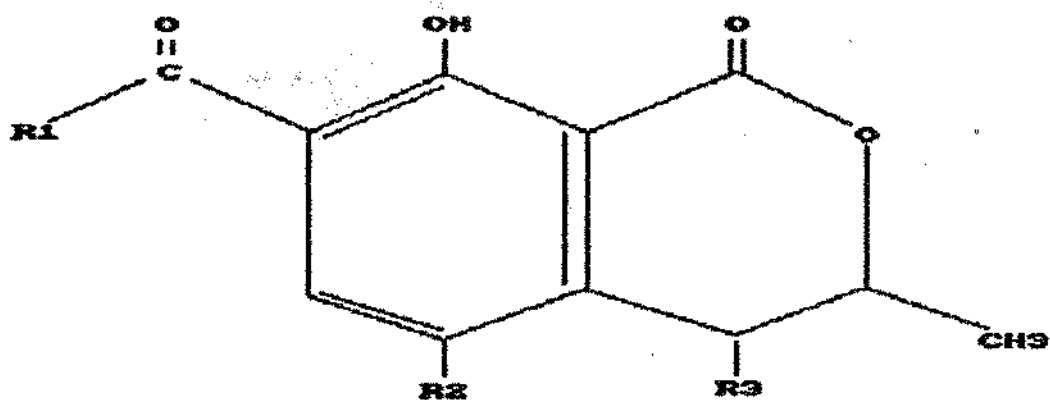
## Ocratoxina

## Introdução

O estudo de metabólitos tóxicos produzidos por fungos tornou-se de grande interesse a partir da descoberta das aflatoxinas em 1961 (80,117), após terem sido identificados como agentes responsáveis por um surto de mortalidade de perús na Inglaterra. Posteriormente, as aflatoxinas foram relacionadas como causa de surtos de intoxicações agudas em populações humanas e de micotoxicoses em animais, causados pela ingestão de alimentos contaminados com as toxinas, ou com os fungos que as produzem (30).

Esse interesse levou à descoberta em 1965 das ocratoxinas (OT) (131,132), uma série de derivados 3,4-dihidro-3-metil-isocumarinas (Figura 1), com ação nefrotóxica e hepatotóxica, produzidas por fungos do grupo *Aspergillus ochraceus* e por alguns *Penicillium* spp. São conhecidas as ocratoxinas A (PM= 403), B (PM= 369), C (PM= 431),  $\alpha$  (PM= 256),  $\beta$  (PM= 222), 4-hidroxi-ocratoxina A (ou ocratoxina D, PM= 419) e ésteres metílicos das ocratoxinas A e B ( OTA-M e OTB-M, respectivamente) (Figura 1) (21,28, 132).





R1	R2	R3	NOME
PHE	Cl	H	Ocratoxina A
PHE	H	H	Ocratoxina B
etil-PHE	Cl	H	Ocratoxina C
OH	Cl	H	Ocratoxina $\alpha$
OH	H	H	Ocratoxina $\beta$
PHE	Cl	OH	4-hidroxi-OTA
metil-PHE	Cl	H	metil-OTA
metil-PHE	H	H	metil-OTB

FIGURA 1- ESTRUTURA DAS OCRATOXINAS

### Biossíntese

As ocratoxinas são produtos do metabolismo secundário, e, como tal, sua síntese só é iniciada após o término da fase de crescimento, quando a exaustão dos elementos essenciais, como carbono, nitrogênio ou fósforo, provocam a interrupção da divisão celular e o acúmulo de substâncias produzidas durante o metabolismo primário. Esse acúmulo ativa ou induz a síntese de enzimas necessárias às reações do metabolismo secundário (128).

Estudos sobre a biossíntese de OTA mostraram que a unidade isocumarina é formada via acetato-polimalonato, à partir de uma unidade acetato e quatro unidades malonato; o grupo carboxil ( $C_{11}$ ) provém do reservatório  $C_1$  (metionina), e a unidade L- $\beta$  - fenilalanina (sintetizada via ácido chiquímico) é incorporada enzimaticamente à molécula por ligação amida com o carbono 11 (133). Ferreira & Pitout (54) demonstraram a existência de um sistema enzimático no micélio de *A. ochraceus* capaz de realizar essa ligação *in vitro*. Ainda não está bem esclarecido de que forma, e em que ponto da biossíntese, o átomo de cloro é incorporado à molécula, mas é provável a ação de uma cloroperoxidase (70). Huff e Hamilton (70) propõem um esquema de biossíntese para a ocratoxina A, em que a condensação do acetato com as quatro unidades malonato, seguida de ciclização e aromatização, fornece a meleína, um metabólito também isolado de algumas linhagens produtoras de OTA (94), a qual passa por reações de metilação e oxidação, formando OT  $\beta$ . Esta, por sua vez, sofre halogenação, formando a OT  $\alpha$ , que então reage com

um éster de fenilalanina, formando OTC. Segue-se uma reação de desesterificação para formação do metabólito final, a OTA.

A função da produção de metabólitos secundários no desenvolvimento dos fungos não está bem esclarecida. Tem sido propostas algumas hipóteses, como a de que essas substâncias funcionariam como reserva de nutrientes, ou a de que seriam uma adaptação evolutiva conferindo vantagens na colonização do ambiente (128). Para Turner (128), o importante não é o metabólito final em si, mas sim o processo metabólico, que removeria alguns produtos do metabolismo primário, impedindo que se acumulem em níveis tóxicos para a célula e permitindo que o metabolismo primário funcione continuamente. Lillehoj (83) propôs um modelo para explicar o papel dos metabólitos secundários num contexto ecológico e evolutivo, no qual o metabólito secundário tóxico concede vantagem competitiva ao organismo produtor apenas em condições de desequilíbrio ecológico. Nos períodos de estabilidade ecológica, onde ocorrem interações simbióticas entre as espécies, são desenvolvidos mecanismos de repressão da síntese de toxinas.

#### Microrganismos Produtores

Dentro das dezessete espécies que compõe o grupo *A. ochraceus* (19,110,130) foi verificado por Hesseltine et al. (64) que sete delas, *A. alliaceus*, *A. melleus*, *A. ochraceus*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, *A. sclerotiorum* e *A. sulphureus*, são capazes de produzir ocratoxinas. Bastos (10) detectou a ocorrência de OTA e OTB em esclerócios de *A. melleus* NRRL 3519;

e Paster & Lisker (102) detectaram a ocorrência de OTA nos esclerócios das linhagens NRRL 3174, NRRL 5220, NRRL 6319 e CMI 13242 de *A. ochraceus*. Cepas toxigênicas de *A. ochraceus* foram isoladas de amendoim, arroz, café, cereais, feijão, feijão vermelho, feno, lúpulo, milho, nozes pecan, peixe seco, pimenta, presunto curado, ração de aves e sorgo (21). Cepas toxigênicas de *A. melleus* e *A. sulphureus* foram isoladas de castanha-do-pará e peixe seco (21). Esses fungos encontram-se extensamente distribuídos na natureza, e são considerados pela classificação de Christensen & Kaufmann (18) como fungos de armazenamento, uma vez que, para seu desenvolvimento necessitam de umidade relativa de 80% (o que corresponde em grãos a um conteúdo de água de 15-16%), e temperatura na faixa de 20-25°C (17).

Dentro do gênero *Penicillium*, *P. commune*, *P. cyclopium*, *P. palitans*, *P. purpurescens*, *P. variabile* e *P. viridicatum* são citados como produtores de ocratoxina (21). Cepas toxigênicas de *P. viridicatum* foram isoladas de amendoim, cevada, feijão seco, milho, presunto, ração mista de aveia, centeio e cevada, salsichas fermentadas e trigo (21,76). É interessante notar que estas espécies de *Penicillium* são conhecidas como pronunciadamente psicrófilas, o que explica sua presença em alimentos estocados a baixa temperatura. *P. cyclopium* e *P. viridicatum* tem temperatura mínima de crescimento a 2°C e *P. palitans* a 4°C. (72).

Os fungos produtores de ocratoxina tem sido implicados também na produção de outros metabólitos tóxicos. Dentro do grupo *A. ochraceus*, algumas linhagens ocratoxigênicas produzem também ácido penicílico (24), meleína e 4-hidroximeleína (94),

xantomegnina e viomeleina (48,113), ácido secalônico e emodina (143), ácidos aspergílico, neoaspergílico e neohidroaspergílico (91, 141), ácido kójico (141) e aspocracina (21). No gênero *Penicillium* é muito comum a ocorrência de isolados produtores de mais de um metabólito secundário, o que levou alguns pesquisadores à propor a classificação destes fungos em grupos de acordo com suas características metabólicas (25,56). Quando os microrganismos são capazes de sintetizar mais de uma toxina, a produção e a quantidade de cada metabólito depende de condições ambientais e nutricionais. Por exemplo, no caso dos *A. ochraceus*, baixas temperaturas (10-20°C) favorecem a produção de ácido penicílico, e temperaturas mais altas (28°C) a síntese de ocratoxina (24).

#### Ocorrência de Contaminação Natural por Ocratoxina

Tem-se detectado ocratoxina A e B ocorrendo naturalmente em amostras de amendoim, aveia, café verde, centeio, cevada, feijão branco, milho, rações, ragi, sorgo e trigo (21,121). Ocratoxina C raramente é encontrada como contaminante de alimentos, mas sua ocorrência já foi constatada em rações que continham concentrações elevadas de OTA (61). Esteres das ocratoxinas A e B foram detectados somente em alimentos contaminados artificialmente em laboratório (120).

### Toxicidade das Ocratoxinas

As diferentes ocratoxinas mostram diferentes propriedades físico-químicas e toxicológicas. Chu et al. (20) demonstraram que a toxicidade das ocratoxinas está relacionada à constante de dissociação do grupo hidroxil-fenólico. Assim, as ocratoxinas A e C, que tem pK neutro (entre 7,05 e 7,10) são as mais potentes, enquanto a OT $\alpha$ , com pK alcalino (11,0) é considerada não tóxica. A OTB tem pK e toxicidade aproximadamente dez vezes menor que a OTA. Os ésteres de OTA tem toxicidade semelhante à OTA e os ésteres de OTB não apresentam toxicidade (120).

O valor de LD<sub>50</sub> oral da OTA para ratos é de 22 mg/kg para machos e 20 mg/kg para fêmeas, significando que, para esta espécie a toxicidade aguda de OTA é aproximadamente metade da toxicidade aguda da aflatoxina B<sub>1</sub> (76).

Em alguns animais de grande porte estudados, como porcos e cães Beagle, os sintomas de ocratoxicose aguda se caracterizam por anorexia inicial, perda de peso, vômitos, tenesmo, aumento de temperatura retal, conjuntivite, amigdalite, poliúria, desidratação, prostração e morte no período de 11 a 14 dias (121). A alteração da função renal é indicada por poliúria, polidipsia, glicosúria, proteinúria e aumento na excreção renal de algumas enzimas (76). As alterações histo-patológicas se concentram nos rins e tecidos linfáticos, caracterizando-se por necrose e descamação de células epiteliais nos túbulos renais proximais e necrose dos centros germinativos no baço, amígdalas, timo, linfonodos e nódulos linfáticos. Alterações moderadas no fígado e mucosa gastrointestinal podem também ocorrer quando a

dose administrada é muito alta. Essas alterações são acompanhadas de alterações bioquímicas específicas (21,76).

Hayes e Hood (63) demonstraram alguns efeitos teratogênicos de OTA em camundongos, como morte embrionária, perda de peso fetal, malformações craniofaciais, exencefalia, anoftalmia, sindactília e polidactília, entre outros. Efeitos semelhantes foram observados em ratos, hamsters e embriões de galinhas (121).

Devido à sua estrutura molecular, as ocratoxinas tem possibilidade de formar ligações hidrofílicas e iônicas com macromoléculas. A interação das ocratoxinas com as albuminas do sangue tem sido estudadas em detalhes e demonstradas *in vitro* e *in vivo* (21). Pitout (106) demonstrou *in vitro* que não ocorre ligação entre a OTA e os ácidos nucleicos.

Quanto à um possível efeito carcinogênico das ocratoxinas, devido à presença do anel lactona insaturado na molécula, há mais controvérsias do que evidências concretas (21). Um grande número de experimentos *in vitro* tem revelado a ausência de mutagenicidade para OTA. Bendele et al. (11) num trabalho recente de avaliação sobre o potencial genotóxico de OTA, realizados numa bateria de testes *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que OTA não foi mutagênica para *Salmonella thyphimurium* com ou sem ativação metabólica, em concentrações de 50-600 µg/ml (Teste de Ames) ou de 0,1-1000 µg/ml (ensaio em placa gradiente); não induziu síntese de DNA não programada (UDS) em culturas de hepatócitos de ratos expostos à concentrações de 0,000025 à 500 µg/ml; não aumentou o número de mutantes reversos L517TK<sup>+/-</sup> de linfomas de camundongos

expostos à concentrações de 0,1 à 12,5 ug/ml; bem como não provocou alterações significativas na permuta de cromátides irmãs em células de medula óssea de hamsters chineses expostos à concentrações de 25 à 400 mg OTA/Kg de peso. Para a OTB sozinha não foram realizados estudos de genotoxicidade ou carcinogenicidade, entretanto, foi demonstrada mutagenicidade no teste de Ames com ativação metabólica, para uma mistura de 85% de OTA + 15% de OTB (77). Experimentos in vivo em trutas arco-iris demonstraram um efeito co-carcinogênico da OTA quando administrada junto com ácido estercúlico, provocando aparecimento de tumores hepáticos (39). Em 1976, a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC) concluiu que todos os estudos de carcinogenicidade até então realizados para OTA eram inadequados em termos de número de animais usados e taxas de sobrevivência (76). Em 1978, Kanisawa & Suzuki (74) demonstraram em ratos indução de tumores renais por OTA, bem como, um efeito sinérgico desta toxina na hepatocarcinogenicidade de aflatoxina B<sub>1</sub>. Bendele et al. (11) realizaram um estudo de carcinogenicidade por 24 meses com camundongos BC63F (machos e fêmeas) alimentados com 0,1 e 40 ppm de OTA, a qual demonstrou ser nefrocarcinogênica e fracamente hepatocarcinogênica. Quanto ao fato de compostos, como a OTA, que apresentam respostas negativas nos testes mutagênicos, mostrarem-se carcinogênicos em alguns testes com animais de laboratório, Bendele et al. (11) atribuem três possíveis explicações: a incapacidade dos sistemas testes utilizados em gerar carcinógenos intermediários apropriados; à presença de um fator desconhecido causando neoplasia nos animais e ainda à



pureza dos compostos usados nos estudos *in vivo*.

#### Metabolismo das Ocratoxinas

Estudos de metabolismo de OTA em ratos (122) demonstraram que 6% da dose administrada intraperitonealmente (IP) ou oralmente, é excretada pela urina como OTA, 1-1.5% como 4(R)-hidroxi-OTA e 25-27% como OT  $\alpha$ . Apenas traços de OTA e OT  $\alpha$  são encontrados nas fezes. Incubando-se OTA com microsossomo de fígado humano, de rato ou porco, na presença de NADPH, formam-se dois metabólitos hidroxilados: 4(R) e 4(S)-hidroxi-OTA (122). Na presença de microsossomo de coelho e NADPH, além desses dois metabólitos hidroxilados, é formado um terceiro: 10-hidroxi-OTA (123).

Quando OTB é administrada IP em ratos, são excretadas pela urina 9,6% da dose, como OTB, 8,7% como 4-hidroxi-OTB e 5,2% como OT  $\beta$ . Na presença de microsossomos de fígado de rato e NADPH é formado um metabólito hidroxilado: 4(R)-hidroxi-OTB. Quando OTA e OTB são administradas juntas IP, não há diferença entre as proporções de metabólitos excretadas (123). A administração de OT  $\alpha$  e OT  $\beta$  em ratos mostrou que estes metabólitos não são metabolizáveis nem absorvidos pelo organismo: 90% de OT  $\alpha$  é excretada em 48 horas e 108% de OT  $\beta$  em 24 horas (122,123).

Fuchs et al. (57) estudando o metabolismo de OTC administrada a ratos por via oral ou intravenosa, demonstraram que nos dois casos a toxina é rapidamente convertida em OTA, possivelmente pela ação das esterases do sangue e da

quimotripsina do trato intestinal.

O estudo do metabolismo de OTA em vacas demonstrou que quando administrada em pequenas doses (0,25 mg/kg), ocorre excreção de OT  $\alpha$  pela urina em 30 minutos, enquanto doses elevadas (113 mg/kg) provocam excreção de OTA e OT  $\alpha$  pela urina e leite (21).

Pliszczynska & Juszkiewics (108) administrando doses orais de 5 mg/kg de peso a codornas botadeiras, detectaram OTA nos ovos, até 7 dias após a administração, sendo que a concentração máxima foi de 2,06  $\mu$ g/ovo, em 72 horas. Com doses de 1 mg/kg de peso, não foi detectada presença de OTA nos ovos; e com doses de 20 mg/kg de peso, cessa a produção dos mesmos, 96 horas após a administração.

Devido à ligação amida na molécula, as ocratoxinas podem ser hidrolisadas por algumas enzimas proteolíticas como carboxipeptidase A e  $\alpha$ -quimotripsina (107), formando OT  $\alpha$  e OT  $\beta$ , o que possivelmente funciona como um sistema de detoxificação in vivo.

O fato de alguns produtores de ocratoxinas produzirem também outras micotoxinas levou ao estudo das interações tóxicas entre elas. Assim, foi demonstrado efeito toxicológico sinérgico entre ocratoxina e citrinina (116), ácido penicílico (96,116) e patulina (21).

### Ocorrência de Ocratoxícoses

Entre animais a ocratoxina tem sido relacionada à nefropatias suínas na Dinamarca, Suécia, Irlanda e Iugoslávia (76,105) e à nefropatias em aves nos EUA (121).

Os casos de nefropatia suína na Dinamarca são endêmicos, com surtos epidêmicos em 1963 e 1971, associados às condições climáticas (76). Tem sido notada uma forte associação entre a doença e a presença de OTA em cereais usados na alimentação dos animais. O exame de 19 porcos de uma fazenda onde os animais haviam sido alimentados com um lote de cevada contaminada com OTA, demonstrou na análise histológica o desenvolvimento de nefropatia caracterizada por vários graus de degeneração dos túbulos renais proximais, formação de tecido conjuntivo intersticial e esclerosamento glomerular, bem como a presença de OT em quase 100% dos rins examinados. Esse mesmo lote de cevada foi utilizado para desenvolver experimentalmente nefropatias em porcos, demonstrando as mesmas alterações histológicas na estrutura renal. Uma posterior confirmação foi obtida quando se conseguiu desenvolver nefropatia com as mesmas características, administrando aos porcos OTA cristalina (76).

Pepeljnjak & Cvetnic (105) estudando a relação entre nefropatia suína e contaminação de alimentos em áreas nefropáticas e não nefropáticas na Iugoslávia, demonstraram ser a contaminação de alimentos por OTA muito maior nas áreas nefropáticas, apesar da distribuição similar dos fungos em ambas as áreas, bem como a ocorrência de resíduos de OTA nos rins, fígado e sangue de porcos nas áreas nefropáticas e ausência nas

áreas não nefropáticas.

Embora não tenham sido descritos casos humanos de nefropatia micotóxica, e dados de exposição humana sejam difíceis de se obter, não se pode excluir a possibilidade de que algumas doenças renais no homem sejam causadas por ocratoxina. A OTA tem sido associado como causa da Nefropatia Balcânica Endêmica, uma doença fatal, com distribuição sexo-específica, que atinge habitantes de certas áreas da Iugoslávia, Bulgária e Romênia, devido a semelhança desta doença com a nefropatia suína espontânea e induzida, e devido ao alto nível de contaminação dos alimentos com a toxina, nas áreas endêmicas (76). Entretanto a presença de OTA no sangue de habitantes de vilas consideradas hiper e hipoendêmicas foi muito similar, não permitindo uma relação causal muito clara entre OTA e a nefropatia (121).

Pesquisadores dinamarqueses também tentaram demonstrar semelhanças entre uma doença de fazendeiros em certas áreas rurais da Escandinávia e a nefropatia suína (21).

#### Medidas de Controle da Produção de Ocratoxina

As ocratoxinas são bastante estáveis ao calor, resistindo até mesmo à autoclavagem por três horas, em cereais e farinhas (126), sendo portanto difíceis de serem destruídas quando presentes em um alimento. Estudos visando o controle ou descontaminação de OTA em alimentos englobam a ação de agentes antifúngicos, como sorbatos, propionatos e benzoatos (6,111,125); substâncias naturais, como condimentos, ervas, partes de plantas e cafeína (6,14,65,66,67); inseticidas, como

fosfina, tetracloreto de carbono e diclorvos (21,142); radiações ionizantes (103) e controle de condições ambientais, principalmente umidade e temperatura (97). Chelkowski et al. (16), observando a decomposição de OTA em cromatografia de camada delgada, quando exposta à vapor de amônia, propuseram um método de descontaminação de cereais usando 2% de amônia à temperatura de 20-50°C durante 4 a 6 semanas. Madsen et al. (84) fizeram um estudo de descontaminação de cevada para posterior utilização como ração animal, usando três tipos de tratamentos: 5% NH<sub>3</sub>-70°C/96 horas, com NaOH 0,5%/490°C, e autoclavagem a 132°C/5 minutos. Os três tratamentos reduziram o conteúdo de OTA para níveis aceitáveis. Entretanto, porcos alimentados com estas rações descontaminadas, apresentaram resíduos de OTA nos rins e fígado, em concentrações mais altas que o esperado. A explicação dada pelos autores para esse fato, é que a detoxificação da OTA em solução alcalina deve ocorrer por hidrólise da unidade lactona, mas essa reação é reversível no pH ácido do estômago.

### Interações Microbiológicas e Controle da Produção de Micotoxinas

#### Interações entre Microrganismos

Uma vez que o crescimento fúngico em um alimento raramente ocorre como cultura pura, o estudo das interações ecológicas entre fungos que colonizam um mesmo substrato, pode fornecer

maior compreensão sobre os mecanismos que controlam a produção de toxina na natureza.

As interações ecológicas podem ser do tipo antagônica ou sinérgica. O antagonismo entre dois microrganismos que competem pelo mesmo substrato, pode se dar de forma ativa ou passiva. O antagonismo ativo ocorre quando há inibição por contato (a hifa do fungo antagonizado sofre plasmólise ao entrar em contato com a hifa do fungo antagonista), alteração do substrato (o antagonista produz e excreta para o ambiente, antibióticos, ácidos, etc, que inibem o crescimento do antagonizado) ou quando há micoparasitismo (as hifas dos dois fungos entrelaçam-se, sendo que o parasita pode matar seu hospedeiro ou viver em simbiose com ele). No antagonismo passivo não há inibição de um microrganismo pelo outro, mas sim competição por espaço ou por nutrientes essenciais ao desenvolvimento, com vantagem para o microrganismo que estiver em maior número, que possuir maior taxa de crescimento, ou melhor aptidão para explorar o substrato. As interações sinérgicas favorecem um ou ambos os microrganismos na ocupação do ambiente (33).

Afim de melhor explicar as relações que ocorrem entre os microrganismos na natureza, alguns autores tem proposto classificações das interações entre eles, baseados nos efeitos sobre o desenvolvimento dos microrganismos estudados. Wicklow (137) estudando a hierarquia competitiva entre ascomicetos, classificou os tipos de reações que ocorrem entre dois fungos em cinco classes : (A) entrelaçamento mútuo entre os fungos; (B) inibição mútua por contato, onde o espaço entre as duas colônias é pequeno, mas claramente definido; (C) inibição mútua à

distância; (D) inibição de um microrganismo por contato, o antagonista continua à crescer com ou sem mudança na velocidade de crescimento sobre o microrganismo inibido, (E) inibição de um microrganismo à distância, o antagonista continua à crescer, com ou sem mudança na velocidade de crescimento, sobre o microrganismo inibido. Hyppel (71) classificou os efeitos inibitórios de algumas micorrizas sobre *Fomes annosus* em quatro classes: (1) inibição, com formação de uma zona não invadida entre duas colônias; (2) não agressão, ambos os fungos crescem normalmente até que suas bordas se encontrem; (3) invasão, a micorriza cresce sobre *F. annosus*, que aparentemente cessa o crescimento; (4) invasão inversa, *F. annosus* cresce sobre a micorriza.

Em relação aos fungos toxigênicos, as interações que ocorrem entre eles e outros microrganismos, podem interferir no seu metabolismo, inibindo ou estimulando a produção de toxina. Podemos também encontrar microrganismos capazes de degradar micotoxinas, para usá-las como nutrientes, ou para não serem inibidos por elas.

#### Efeito de Microrganismos Competidores no Desenvolvimento de Fungos Toxigênicos

Embora estudos sobre interações entre fungos do grupo *A. ochraceus* e outros microrganismos sejam raros, esses estudos são extensos para os fungos produtores de aflatoxina (*A. flavus* e *A. parasiticus*).

Ashworth et al. (5) verificaram que o desenvolvimento de *A. flavus* em amendoim é limitado pela competição com outros fungos que também costumam aparecer nas sementes, como *Aspergillus niger* e *Rhizoctonia solani*. Além disso, *A. niger*, *R. solani*, *Mucor phaseoli* e *Fusarium roseum* demonstraram capacidade de degradar aflatoxina B<sub>1</sub> presente em substrato líquido ou em vagens e sementes de amendoim.

O cultivo de uma linhagem de *Rhizopus arrhizus* usada na produção de "ontjom" (bolo de amendoim fermentado, alimento típico da Indonésia) junto com *A. flavus* toxigênico, inibe a produção de aflatoxina e também metaboliza a toxina pré-formada (72).

Boller & Schroeder estudaram a influência de *Aspergillus chevalieri* (12) e *Aspergillus candidus* (13) na produção de aflatoxina em arroz por *A. parasiticus*. A inoculação simultânea de *A. parasiticus* e *A. chevalieri* não reduz a invasão dos grãos por *A. parasiticus*, mas reduz o nível de toxina em até 100%. No caso de *A. candidus*, o que se verificou foi a predominância desse fungo nos grãos em 7 dias, após o que, pouca ou nenhuma aflatoxina foi detectada. Quando o inóculo de *A. parasiticus* foi maior que o de *A. candidus*, a produção de aflatoxina foi de apenas 3 à 5% da produção obtida no controle.

Alderman et al. (1) estudaram a produção de aflatoxina e rubratoxina por *A. parasiticus* e *Penicillium rubrum* quando cultivados sozinhos, juntos, ou com *Penicillium italicum* ou *Lactobacillus plantarum*, encontrando aumento de produção da toxina na presença de culturas mistas de *P. rubrum* e *L. plantarum* e diminuição na presença de *P. italicum* +



*L. plantarum*, *P. rubrum* e *L. plantarum*. Não houve alteração de produção na presença de *P. italicum*.

Weckbach & Marth (134) simularam um ambiente competitivo para produção de aflatoxina por *A. parasiticus* NRRL 2999, inoculando esporos do fungo toxigênico em YES juntamente com esporos de *Rhizopus nigricans* NRRL 1476, células de *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-163, *Brevibacterium linens* NRRL B-4210 ou *Acetobacter aceti* NRRL B-999. Os resultados obtidos com 10 dias de incubação a 28°C demonstraram inibição de crescimento e produção de toxina, de forma acentuada em presença de *R. nigricans* e *S. cerevisiae* e menos acentuada em presença de *B. linens*; e aumento de crescimento e produção de toxina em presença de *A. aceti*.

Barbosa et al. (7) verificaram que cepas toxigênicas de *A. flavus* e *A. parasiticus* são fracas competidoras frente a 75% dos componentes da microbiota de uma determinada ração de aves. Isolados pertencentes aos gêneros *Aspergillus* grupo *wentii*, *Penicillium* sp, *Fusarium* sp e *Trichoderma* sp apresentaram índices de antagonismo superiores aos apresentados pelos fungos toxigênicos.

El-Gendy & Marth (51) estudando a interação de *A. parasiticus* e *Lactobacillus casei* em caldo de sais minerais-glicose, demonstraram que *L. casei* inibe parcialmente a síntese de aflatoxina, aumenta a taxa de degradação da toxina pelo próprio micélio e tem seu crescimento estimulado pela presença do fungo.

Durackovic et al. (47), estudando a produção de biomassa e de aflatoxina B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> por *A. parasiticus* NRRL 2999 em milho contaminado com *Trichothecium roseum* ZMTF 1226 e *Fusarium* sp ZMTF 1215, verificaram uma redução de 22 a 45% na quantidade de aflatoxina B<sub>1</sub>, e de 36 a 48% na de aflatoxina G<sub>1</sub>.

Mendes (90) verificou redução no crescimento e na produção de toxina por *A. flavus* NRRL 3357 e *A. parasiticus* UNBF A-12, causados pelos filtrados de cultura de *Aspergillus candidus* e *Penicillium steckii*. A prévia inoculação de *A. candidus* ou *P. steckii* em grãos de feijão, reduziu a colonização dos mesmos pelos fungos toxigênicos e inibiu em torno de 50% a produção de aflatoxina.

Ehrlich et al. (49) detectaram diminuição na produção de aflatoxina e ácido secalônico, usando culturas mistas de *A. flavus* ou *A. parasiticus* e *Penicillium oxalicum*, isoladas de um mesmo lote de milho com contaminação excepcionalmente baixa de aflatoxina. O cultivo destas culturas juntamente com *Fusarium* spp, também contaminante deste milho, não afetou a produção das toxinas.

A inoculação de esporos de *A. flavus* em culturas de *Streptococcus lactis* impediu a formação de toxina, embora não tenha afetado o crescimento do fungo. A inoculação de *S. lactis* em cultura de *A. flavus*, diminuiu acentuadamente o nível de aflatoxina, demonstrando que além de inibir a síntese, *S. lactis* também é capaz de degradar a toxina pré-formada (4).

Erlich (50) cultivando cepas de *A. parasiticus* toxigênicas juntamente com linhagens mutantes de *A. parasiticus* incapazes de produzir aflatoxina, observou redução substancial no nível de

toxina produzida, mesmo quando o inóculo inicial da linhagem toxigênica era 100 vezes maior que o das linhagens mutantes.

A grande coincidência entre os nichos ecológicos de *Aspergillus niger* e dos fungos do grupo *A. flavus* tem levado vários autores a estudar as interações entre eles, e os efeitos sobre a produção de aflatoxina. Burnett & Rambo (15) verificaram que o filtrado de cultura de *A. niger* inibe a síntese de aflatoxina por *A. flavus* em meio líquido e em sementes de amendoim, sendo que as substâncias inibidoras são estáveis ao calor. Foi verificado ainda, que *A. niger* detoxifica quase totalmente aflatoxina em meio líquido após 8 dias de incubação. Wicklow et al. (138) não detectaram produção de aflatoxina *in vitro*, em grãos de milho, por *A. flavus* NRRL 6432 na presença de *Aspergillus niger* NRRL 6411 ou *Trichoderma viride* NRRL 6418. Horn & Wicklow (69) determinaram que a inibição da produção de aflatoxina *in vitro* por *A. flavus* NRRL 6432 em grãos de milho por *A. niger* NRRL 6411 é devido ao abaixamento de pH para menor ou igual a 3,4. Além disso, o extrato aquoso de milho, fermentado por *A. niger*, também causa inibição na formação da toxina. Wicklow et al. (139) estudaram que efeitos, a inoculação conjunta de uma mistura de esporos de *A. flavus* (linhagens NRRL 6536, 6537, 6539, 6540, 6575, 6577, 6578, 6579, 6580 e 6581) e *A. niger* (linhagens NRRL 6408, 6411 e 13542) acarreta para a colonização e produção de aflatoxina em espigas de milho no campo, antes da colheita, e verificaram que os grãos infectados apresentavam altos níveis de contaminação com a toxina, embora substancialmente menores que o controle. O pH dos grãos infectados ficou em torno de 5,45, indicando que a espiga em

amadurecimento funciona como um sistema tamponante, impedindo que o acúmulo dos metabólitos de *A. niger* atinja um nível de acidez suficiente para prevenir a produção de aflatoxina. Posteriormente (140), foram estudados, juntamente com *A. niger*, outros quatro competidores, *Acremonium strictum* (linhagens NRRL 6415, 13540 e 13541), *Fusarium moniliforme* (linhagens NRRL 6413, 13543, 13544), *Penicillium funiculosum* (linhagens NRRL 6420, 13547 e 13548) e *Penicillium oxalicum* (linhagens NRRL 6416, 13545 e 13546), verificando-se que, apesar do alto nível de contaminação por aflatoxina nos grãos inoculados e nos grãos adjacentes a eles, os fungos competidores, particularmente *F. moniliforme*, impediram que *A. flavus* infectasse e contaminasse outros grãos na mesma espiga. Foi constatado ainda, que a infecção dos grãos pelos fungos estudados só ocorre se houver dano físico das espigas.

Devi & Polasa (35), cultivando *A. flavus* em combinação com cepas toxigênicas de *Aspergillus ochraceus* ou *Aspergillus versicolor*, obtiveram produção de aflatoxina B<sub>1</sub>, mas não de ocratoxina A ou de esterigmatocistina. Com o cultivo conjunto de *A. ochraceus* e *A. versicolor*, os autores obtiveram apenas ocratoxina A.

Mislivec et al. (92) estudaram a produção de aflatoxina por *A. flavus* em meio de cultura, na presença de várias cepas, algumas das quais toxigênicas, de *Aspergillus ochraceus* (OTA), *Aspergillus versicolor* (esterigmatocistina), *Penicillium citrinum* (citrinina), *Penicillium cyclopium* (ácido penicílico) e *Penicillium urticae* (patulina e griseofulvina), verificando que, enquanto *A. ochraceus* e *A. versicolor* aparentemente não influem

na produção da toxina, as espécies de *Penicillium* produzem metabólitos termo-estáveis, diferentes das toxinas citadas, que diminuem a produção de aflatoxina. Da mesma maneira, a produção de toxinas pelas espécies de *Penicillium* é suprimida na presença de *A. flavus*. Estes efeitos, entretanto, não foram tão evidentes quando as espécies foram cultivadas em milho, "pinto beans" e soja (127).

Barr (8) utilizou as bactérias *Klebsiella aerogenes* NCIB 10102, *Bacillus subtilis* NCIB 8872, *Lactobacillus brevis* NCIB 947, *Lactobacillus buchneri* NCIB 8007, *Pediococcus acidulati* NCIB 6990 e *Streptococcus faecium* NCIB 943, conhecidas por produzirem grande variedade de metabólitos voláteis, para estudar a ação destes compostos sobre o crescimento, esporulação e produção de toxina por cinco fungos toxigênicos: *Aspergillus ochraceus* ATCC 18642 (ocratoxina A), *Penicillium citrinum* ATCC 8506 (citrinina), *Penicillium cyclopium* ATCC 8731 (ácido penicílico), *Penicillium patulum* ATCC 18172 (patulina) e *Penicillium islandicum* IMI 40042 (antraquinonas). A alteração da atmosfera ambiente pelas bactérias afetou em diferentes graus o crescimento e esporulação dos fungos estudados. A produção de toxina em alguns casos sofreu inibição significativa, mesmo quando o crescimento não foi afetado, e em outros casos foi estimulada, mesmo ocorrendo inibição de crescimento. Foi verificada uma redução de 90% na produção de patulina na presença de *B. subtilis*, e 89% na produção de ocratoxina A e 83% na produção de ácido penicílico na presença de *P. acidulati*. Aumentos na produção de ácido penicílico, patulina e citrinina ocorreram em presença de *S. faecium*, e na produção de

citrinina em presença de *L. brevis*.

Em relação aos fungos do grupo *Aspergillus ochraceus*, alguns autores tem demonstrado sua baixa capacidade de competição na invasão de sementes, notadamente se tiverem que competir com fungos do grupo *Aspergillus glaucus* (17,118).

#### Degradação Microbiológica de Micotoxinas

Como alternativa para detoxificação de alimentos contaminados, tem-se realizado estudos exaustivos em busca de microrganismos capazes de degradar micotoxinas, inativando-as.

Ciegler et al. (23) utilizaram mais de mil microrganismos entre fungos, esporos de fungos, leveduras, bactérias, actinomicetos e algas, para selecionar aqueles com habilidade de degradar aflatoxinas, encontrando algumas cepas de *Penicillium raistrickii* e *Aspergillus niger* e esporos de *Aspergillus terreus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus luchuensis* capazes de transformar a toxina em novos compostos fluorescentes, bem como a linhagem *Flavobacterium aurantiacum* NRRL B-184, que foi capaz de detoxificar totalmente leite, óleo, manteiga de amendoim, milho e parcialmente soja.

Oliveira (99) realizando um levantamento de microrganismos resistentes a 20 µg de aflatoxina/ml de meio de cultura, obteve 93 cepas de bactérias, fungos e leveduras capazes de reduzir em 24 horas de incubação, até 60% da toxina presente no substrato.

Outros trabalhos de detoxificação microbiana de aflatoxina realizados identificaram os seguintes microrganismos capazes de metabolizar parcial ou totalmente as aflatoxinas: *Absidia*

repens, Mucor alternans, Mucor griseo-cyanus, Dactylium dendroides, Helminthosporium sativum (36), Scopulariopsis brevicauli (72), Rhizopus stolonifera, R. arrhizus, R. oryzae (26,27), Aspergillus candidus (78), Mucor ambiguus, Cunninghamella echinulata, A. niger, A. ochraceus, Penicillium chrysogenum, P. islandicum, P. citreo-viride, Paecilomyces variotii, Stachybotrys lobulata, Trichoderma viride, Candida utilis e Corynebacterium rubrum (86,87).

Doyle e Marth (40,41,42,43,44,45) através de uma série de trabalhos, demonstraram que o próprio micélio de *A. parasiticus* tem capacidade de degradar as aflatoxinas através de atividade enzimática.

Patulina, micotoxina produzida por diferentes *Penicillium* spp e *Aspergillus* spp (52) pode ser degradada por *Saccharomyces cerevisiae*, como resultado do processo de fermentação (46).

Rubratoxina, toxina produzida por *Penicillium rubrum* e *P. purpurogens* (32) é degradada pelo micélio de *P. rubrum* (46).

Kamimura (73) estudando a ação de alguns fungos cultivados em meio de cultura com zearalenona como única fonte de carbono, verificou que *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporoides*, *Penicillium frequentans*, *A. flavus* e *Fusarium acuminatum* reduzem gradualmente a toxina do meio à partir do quinto dia de incubação, com subsequente aparecimento de  $\alpha$  e  $\beta$  zearalenol, e que *Rhizopus* sp converte a zearalenona em  $\alpha$  e  $\beta$  zearalenol e em 4-  $\alpha$  - D- glucanopiranosídeo.

Em relação às ocratoxinas, Galtier & Alvinerie (58) demonstraram que bactérias e protozoários presentes na microbiota cecal de ratos tem capacidade de transformar OTA em OT  $\alpha$ . Também microrganismos presentes no rumem de vacas e carneiros demonstraram essa capacidade (58,75). Westlake et al. (136) estudando o efeito de algumas micotoxinas sobre o crescimento de *Butyrivibrio fibrisolvens* verificaram que a ocratoxina não afeta a taxa de crescimento da bactéria e pode ser degradada por ela. Wegst & Lingens (135), com uma bactéria gram-negativa, que usa fenilalanina como fonte de carbono, *Phenylobacterium immobile*, demonstraram um mecanismo natural de detoxificação da OTA, identificando os passos metabólicos do processo e o metabólito final como sendo OT  $\alpha$ .

Patterson & Damoglou (104), estudando as causas da instabilidade da citrinina produzida por *Penicillium viridicatum*, verificaram que a toxina é degradada por fatores intracelulares existentes no micélio do fungo toxigênico, formando dihidrocitrinona. Como entre os metabólitos presentes após o processo de degradação encontrava-se a OTA, os autores concluíram que *P. viridicatum*, que também é produtor da toxina, tem capacidade de transformar a molécula de dihidrocitrinona em OTA.

Os resultados obtidos por esses autores apontam para a possibilidade da utilização de microrganismos na detoxificação de alimentos, embora haja necessidade de estudos adicionais de toxicidade, bem como de estudos que comprovem a manutenção das qualidades nutricionais e organolépticas dos alimentos, e a viabilidade econômica de semelhante processo.



## MATERIAL E METODOS

**Microorganismos Toxigênicos:** Foram utilizados os fungos produtores de ocratoxina A e B, *Aspergillus alliaceus* Thom & Church NRRL 317, *A. melleus* Yukowa NRRL 3519, *A. ochraceus* Wilhelm NRRL 3174, *A. sclerotiorum* Huber NRRL 5170 e *A. sulphureus* (Fres.) Thom & Church NRRL 4077 (64). A linhagem *A. ochraceus* NRRL 3174 é também produtora de ocratoxina C (132), ácido penicílico (24), meleína e 4-hidroxi-meleína (94), xantomegnina e viomeleína (113); a linhagem *A. sclerotiorum* NRRL 5170 produz ácido penicílico (24), xantomegnina e viomeleína (113); e a linhagem *A. sulphureus* NRRL 4077 produz ácido penicílico (24). Utilizou-se ainda uma cepa de *A. ochraceus* isolada de uma amostra de feijão, durante este trabalho.

**Outros microrganismos:** Foram utilizados os seguintes fungos citados em literatura como tendo ação antagonista sobre outros fungos toxigênicos: *Absidia repens* v. Tiegh. NRRL 1336 (36), *Aspergillus niger* v. Tiegh. NRRL 6411 (138), *Mucor griseo-cyanus* (Hagem) Schipper NRRL 3359 (36), *Penicillium raistrickii* G. Smith NRRL 203B (22) *Rhizopus arrhizus* Fischer NRRL 2582 (26) e *Trichoderma viride* Pers. ex S. F. Gray (Aguiar, L.A.B., comunicação pessoal). Também foram avaliados *A. niger* ATCC 9642, *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tiraboshi

ATCC 11730 e *Penicillium funiculosum* Thom ATCC 11797, e alguns fungos isolados de amostras de alimentos durante o trabalho. As linhagens de sigla NRRL foram gentilmente cedidas pela USDA "Northern Regional Research Laboratory" (NRRL), Peoria, Illinois, USA. As linhagens de sigla ATCC foram adquiridas da "American Type Culture Collection", Rockville, Maryland, USA.

**Meios de Cultura:** Para o isolamento de microrganismos de amostras de alimentos, utilizou-se o meio CAMTX ("coconut agar medium-triton X-100") (95): 200 ml de leite de coco comercial (Ducoco, Maguary, Sococo), 16 g de agar (Cialgas, Cia. Industrial de Algas, Taboão da Serra, SP) e 4 ml de triton X-100 (Riedel, Hannover, Germany) foram diluídos em 600 ml de água destilada e o pH corrigido para 6,9 com NaOH 5N ou HCl 6N. O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e, após resfriamento à aproximadamente 40°C, foram adicionadas soluções estéreis de cloranfenicol (Carlo Erba, Rio de Janeiro, RJ) e estreptomicina (Industria Farmacêutica Fontoura Wyeth S.A., São Paulo, SP) na concentração final de 1% para cada antibiótico. Para determinação da taxa de crescimento dos microrganismos e determinação do tipo de interação entre eles, utilizou-se o meio CAM (10): leite de coco comercial, 200 ml; agar, 8 g; água destilada, 200 ml, pH 6,9. O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Para a identificação microscópica inicial dos fungos isolados, foi utilizada a técnica de microcultivo em blocos de batata-dextrose agar (BDA) (Merck, Quimitra Comércio e Industria S.A., Rio de Janeiro, RJ) (62). A montagem das lâminas foi realizada em solução de lactofenol

(Merck) e azul de algodão (Merck) (62) em partes iguais. Para identificação dos fungos do gênero *Aspergillus* à nível de grupo foi utilizado o meio "Czapeck Solution Agar" (Merck) (110). Para os estudos de interação em meio líquido, foi utilizado o meio extrato de levedura-sacarose (YES, "Yeast Extract-Sucrose") (31): extrato de levedura (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA; Biobrás, Bioquímica do Brasil S.A., Montes Claros, MG), 20 g; sacarose (Reagen, Quimibrás Industria Química S.A., Rio de Janeiro, RJ), 40 g; água destilada, 1000 ml. O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Nos experimentos de bioautografia, o meio de cultura para pulverização dos esporos foi uma modificação do meio descrito por Homans & Fuchs (68): solução 30% de glicose (Ecibra, Cetus Industria e Comércio de Produtos Químicos Ltda, São Paulo, SP), 10 ml; solução 9% de extrato de levedura, 10 ml e solução de sais, 60 ml. As soluções foram preparadas e esterilizadas separadamente em autoclave a 121°C por 15 minutos. A solução de sais foi preparada com:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck), 7 g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (Merck), 3 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (Merck), 1 g; NaCl (Merck), 1 g; água destilada, 1000 ml.

**Seleção de Fungos em Alimentos:** Foram utilizados os seguintes alimentos: amêndoas, amendoim, arroz, aveia em flocos integral, castanha de cajú, castanha-do-pará, castanha portuguesa, cevada, feijão, grão de bico, milho, noz pecan, ração para cães, trigo em grão e trigo integral moído, adquiridos em lojas de produtos naturais e supermercados da cidade de Campinas, SP. Foram triturados em liquidificador 10 g

de cada alimento com 90 ml de água destilada esterilizada. A seguir, foram feitas diluições até  $10^{-4}$ , e 1 ml de cada diluição foi inoculado em quadruplicata em meio CAMTX, por espalhamento superficial com alça de Drigalski. As placas foram incubadas por 6 dias a 25°C e 28°C, duas placas por temperatura. Foi feita então, contagem total de microrganismos, isolamento de microrganismos do grupo *A. ochraceus* produtores e não produtores de toxina, pelo método estabelecido por Moreira & Salzberg (95), e identificação dos fungos presentes.

**Identificação dos Fungos Isolados:** Primeiramente os fungos isolados foram classificados à nível de gênero de acordo com Barnett (9). Os fungos do gênero *Aspergillus* foram a seguir, classificados à nível de grupo, de acordo com Raper & Fennell (110). A identificação à nível de espécie foi realizada pelo Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

**Determinação da Taxa de Crescimento dos Microrganismos:** Os microrganismos foram inoculados por picada, no centro de uma placa de Petri contendo CAM, e incubados a 28°C até que as colônias atingissem 25 mm de diâmetro. Os experimentos foram realizados em duplicata. A taxa de crescimento foi calculada dividindo-se o diâmetro da colônia pelo tempo de incubação (em dias) (85). Cada placa foi examinada sob luz ultra-violeta de onda longa (Tohwalite TB15 BLB instalada em câmara escura), afim de se verificar a produção de substâncias fluorescentes. Também foi verificada sob luz natural, a presença de pigmentos no meio.

**Determinação de Interação entre os Microrganismos em Meio Sólido:** Os experimentos realizados em meio sólido foram idealizados para analisar o comportamento dos microrganismos na colonização de grãos e alimentos. Foi utilizado o método descrito por Wicklow (138). Os fungos toxigênicos e os fungos a serem estudados como antagonistas foram inoculados em combinação, em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, por estrias de 40 mm de comprimento, em lados opostos da placa, à distância de 30 ou 50 mm um do outro (Figura 2). A data de inoculação de cada um e a distância entre os pares, foi estabelecida de acordo com a taxa de crescimento, de modo que ambos atingissem um desenvolvimento aproximadamente similar. As placas foram incubadas a 28°C por 15 dias, e examinadas diariamente quanto ao crescimento, à alterações morfológicas macroscópicas nas colônias, à produção de toxina e ao tipo de interação entre os pares de fungos, que foi determinado de acordo com as classes propostas neste trabalho. A ação antagônica sobre a produção de toxina foi determinada qualitativamente pela alteração no halo de fluorescência azul-brilhante característico dos fungos ocratoxigênicos, de acordo com as classes também propostas neste trabalho.

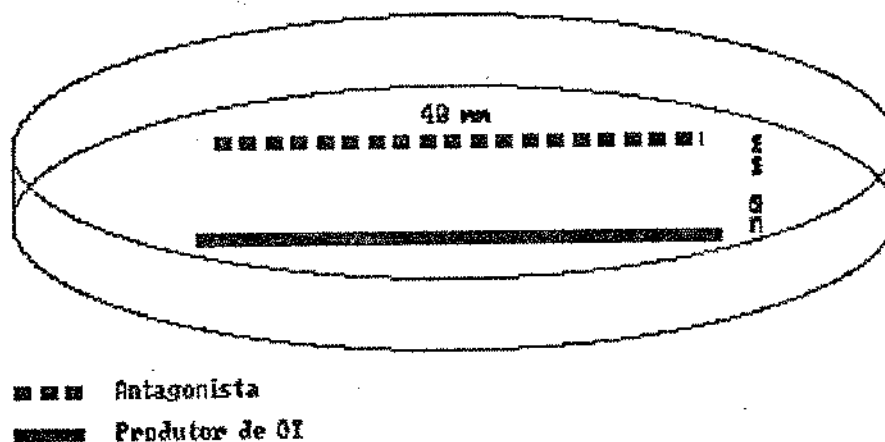


FIGURA 2- ESQUEMA DE INOCULAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE INTE-  
RAÇÃO ENTRE OS MICRORGANISMOS EM MEIO SOLIDO

**Preparo de Inóculo e Método de Inoculação para os Experimentos em Meio Líquido:** De colônias previamente cultivadas em meio Czapeck-Dox agar a 28°C até que atingissem 15 mm de diâmetro, foram cortados das bordas, discos de micélio de 3 mm de diâmetro, para serem usados como inóculo. Os discos foram inoculados nos devidos meios, na proporção de 10 discos para 100 ml de meio.

**Avaliação do Desenvolvimento dos Microrganismos em Meio Líquido:** Para avaliar o desenvolvimento dos microrganismos em meio líquido, utilizou-se como parâmetros a massa micelial produzida, a variação de pH e a produção de toxina. A massa micelial foi obtida medindo-se o peso seco do micélio ao final do período de incubação. Para a realização das medidas de pH e concentração de toxina, foram retirados de cada repetição, alíquotas de 5 ml, na metade e ao final do período de incubação. Como controle para os experimentos em meio líquido, foram determinados os parâmetros de desenvolvimento dos produtores de ocratoxina e dos fungos antagonistas em meio YES. Erlenmeyers de 250 ml, contendo 50 ml de meio YES foram inoculados em triplicata, da maneira descrita acima, e incubados a 28°C, por 12 dias, os fungos ocratoxigênicos, e 15 dias, os antagonistas.

**Determinação do Peso Seco:** O micélio, após o período de incubação, foi separado por filtração em papel Whatmann nº 1, previamente tarado, e colocado para secar em forno a 100°C, até atingir peso constante.

**Extração da Ocratoxina:** Da combinação das aliquotas dos filtrados de cultura, retiradas de cada repetição, 10 ml foram coletados e extraídos em funis de separação com clorofórmio, por três vezes, com 5 ml a cada vez (79). O extrato foi evaporado em banho-maria a 40°C até secagem total, e redissolvido em 1 ml de benzeno-ácido acético (99:1, v/v). Quando necessário, procedeu-se a limpeza do extrato clorofórmico com sulfato de sódio anidro (Ecibra) (79). Para a extração de toxina à partir de culturas em meios sólidos, o conteúdo de duas placas de Petri, com o microrganismo já desenvolvido, foi macerado com 20 ml de clorofórmio. O extrato foi então filtrado, evaporado em banho-maria a 40°C até secagem total, e redissolvido em 1 ml de benzeno-ácido acético (99:1, v/v).

**Padrão de Ocratoxina:** O padrão analítico de OTA (Sigma Co. St. Louis, Missouri, USA) foi redissolvido em benzeno-ácido acético (99:1, v/v) (98) e diluído para concentração de 0,01 µg/ul.

**Cromatografia de Camada Delgada (CCD) dos Extratos de Culturas:** A análise cromatográfica dos extratos de cultura foi realizada em placas de vidro de 20 x 20 cm, cobertas com uma camada uniforme de sílica gel 60 G (Merck) de 0,25 mm de espessura, preparadas com 30 g de sílica e 60 ml de água destilada, e ativadas por 1 hora a 110°C. Os extratos e o padrão foram aplicados a 1 cm da margem inferior da placa, em quantidades de 1; 5 e 10 µl, com 2 cm de distância entre as manchas, respeitando-se 1 cm de margem em cada lateral da placa.



Também foi aplicado um padrão interno, composto de 2 µl de padrão de OTA e 1 µl da amostra. Os cromatogramas foram desenvolvidos com benzeno-ácido acético (9:1 v/v) (21) em cubas cromatográficas saturadas, no escuro, até que a frente do solvente atingisse 15 cm de altura. Após evaporação do solvente, as placas foram observadas sob luz-UV de onda longa, as manchas fluorescentes delimitadas, os respectivos Rfs calculados, e a intensidade de fluorescência dos extratos comparada com a dos padrões, definindo-se qual concentração da amostra iguala-se a uma das concentrações do padrão. Quando a mancha da amostra de 1 µl apresentou intensidade de fluorescência diferente dos padrões, o extrato foi novamente evaporado, concentrado ou diluído, e recromatografado.

**Cálculo da Concentração de Ocratoxina:** A concentração de OTA foi calculada pelo método de comparação visual com padrões de concentração conhecida, seguindo a recomendação da AOAC (98).

**Confirmação Química da Ocratoxina:** Além da co-cromatografia, foram realizados outros testes para confirmação química das toxinas. Os cromatogramas desenvolvidos foram colocados em cubas cromatográficas, e expostos à vapor de amônia por 15 minutos (23), ou foram aspergidos com solução de cloreto férrico em etanol a 3% (59).

**Produção dos Filtrados de Culturas:** Frascos de Roux ou de Fernbach contendo 100 ou 300 ml de meio YES, respectivamente, foram inoculados da maneira descrita e incubados a 28°C. O período de incubação para produção dos filtrados antagonistas foi de 15 dias, e para o filtrado de *A. alliaceus* NRRL 317, foi de 12 dias, ao final do qual, o micélio foi separado por filtração em funil de Büchner com duas camadas de papel Whatmann nº 1 e o filtrado esterilizado em filtro Millipore (Millipore Corp., Bedford, Massachusetts, USA) com membrana Millipore de 47 mm de diâmetro e porosidade de 0,45 µ. Foi retirada uma alíquota de 5 ml para determinação do pH e extração, para controle, e do restante, alíquotas de 50 ml foram distribuídas em erlenmeyers de 250 ml, previamente esterilizados.

**Tratamentos dos Filtrados de Culturas Antagonistas:** Os filtrados de culturas antagonistas foram utilizados nos experimentos de ação sobre o desenvolvimento dos fungos toxigênicos sem e com tratamento térmico, realizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

**Determinação da Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas sobre o Desenvolvimento dos Fungos Toxigênicos:** Os fungos que se apresentaram como potencialmente antagonistas nos experimentos em meio sólido, foram selecionados para os estudos de antagonismo em meio líquido. Os filtrados destas culturas, produzidos da maneira descrita, foram inoculados em triplicata, com os fungos toxigênicos e incubados a 28°C por 12 dias. A ação antagônica foi determinada calculando-se a porcentagem de

inibição de crescimento e produção de OTA em relação ao peso seco ou concentração máxima de toxina obtido no controle em YES. Nos casos em que se verificou estímulo de crescimento ou de produção de toxina, os resultados foram apresentados como porcentagem negativa.

**Ação dos Filtrados de Cultura na Germinação dos Esporos:**  
Para avaliar qual o efeito dos filtrados de culturas antagonistas sobre a germinação dos esporos dos fungos toxigênicos, ou do filtrado de cultura de *A. alliaceus* NRRL 317 sobre os esporos dos fungos antagonistas, nos casos em que não se observou crescimento durante os experimentos de antagonismo em meio líquido; quatro gotas de filtrado de cultura, ou de meio YES como controle, foram colocados em lâminas escavadas, inoculados com esporos dos fungos a serem estudados, e incubados a 28°C por 24 horas em placas de Petri previamente esterilizadas, contendo duas camadas de papel de filtro umidecidas com 10 ml de água destilada estéril, e à seguir observados ao microscópio.

**Estudo de Degradação da Ocratoxina A em Meio Líquido:** O filtrado de cultura de *A. alliaceus* NRRL 317, com pH e concentração de toxina previamente determinados, foi inoculado com os fungos antagonistas, em triplicatas, da maneira descrita, e incubado a 28°C por 15 dias.

Preparo de Suspensão de Esporos: Suspensões densas de esporos, foram preparadas a partir de culturas previamente cultivadas em tubos com Czapeck-Dox agar por 7 dias, colhidos com tween 80 0,1%.

Bioautografia dos Filtrados de Culturas: Para avaliar com mais especificidade as interações entre os microrganismos, foram realizados experimentos de bioautografia segundo a metodologia proposta por Homans & Fuchs (68). Preparou-se placas de CCD da maneira descrita no item "Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos Extratos de Culturas", mas utilizando-se aqui uma camada de sílica gel de 0,50 mm de espessura. As placas de cromatografia, após a aplicação dos filtrados, foram desenvolvidas no solvente apropriado, em cubas cromatográficas saturadas, no escuro, até a frente do solvente atingir 15 cm de altura. As placas foram então deixadas em local ventilado, no escuro, por 24 horas, para evaporação total do solvente. A seguir 10 ml de uma suspensão densa de esporos dos fungos a serem estudados, diluídos em 40 ml de meio glicose-extrato de levedura-sais, foram pulverizados sobre as CCDs, sendo estas, então, incubadas a temperatura ambiente, no escuro, em câmara úmida por 12 dias. A umidade de 93% foi mantida constante com solução saturada estéril de fosfato monobásico de amônia. Para determinar quais compostos dos filtrados de culturas antagonistas foram responsáveis pela inibição dos fungos toxigênicos, 100 µl dos filtrados de culturas antagonistas foram aplicados à CCD com 2 cm de distância entre eles, riscando-se a sílica com uma agulha para delimitar as margens dos campos de corrida de cada filtrado

(Figura 3). As placas foram então desenvolvidas em etanol-amônia 25%-água (50:16:12 v/v/v) e a seguir inoculadas com esporos dos fungos toxigênicos. As manchas de inibição e seus Rfs foram determinadas. Para se determinar a influência do filtrado toxigênico sobre os fungos antagonistas, bem como, verificar a capacidade destes em degradar a toxina, a CCD foi dividida em dois campos, num dos quais foram aplicados 10, 25 e 100  $\mu$ l do filtrado de cultura de *A. alliaceus* NRRL 317 em manchas uniformes, e no outro foram aplicadas 50, e 100  $\mu$ l do padrão de OTA (Figura 4). As placas foram desenvolvidas em benzeno-ácido acético (9:1 v/v), e, a seguir, inoculadas da maneira descrita, com esporos dos fungos antagonistas. Foi também preparada uma placa não inoculada com esporos antagonistas, para servir de controle à degradação natural da toxina. Após o período de incubação as placas foram examinadas sob luz natural, as manchas de inibição observadas e seus Rfs calculados, em seguida as placas foram examinadas sob luz UV de onda longa para se determinar alteração ou diminuição na intensidade de fluorescência das manchas de OTA.

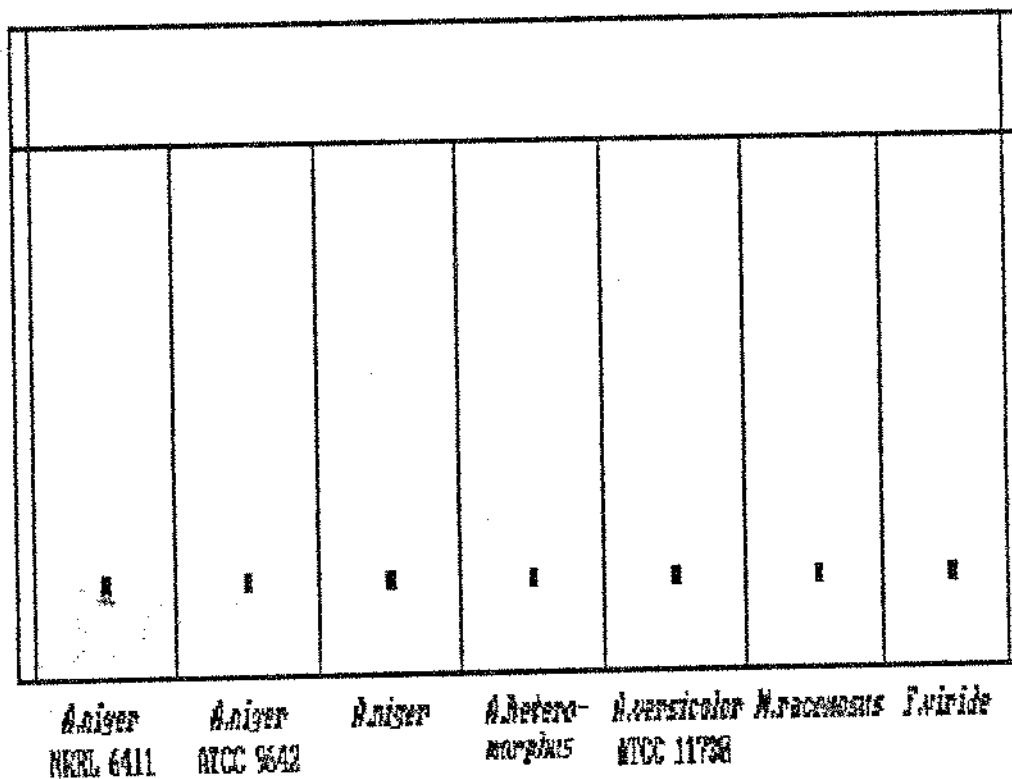


FIGURA 3 - ESQUEMA DE PREPARO DAS PLACAS DE BIAUTOGRAFIA DOS FILTRADOS DE CULTURAS ANTAGONISTAS

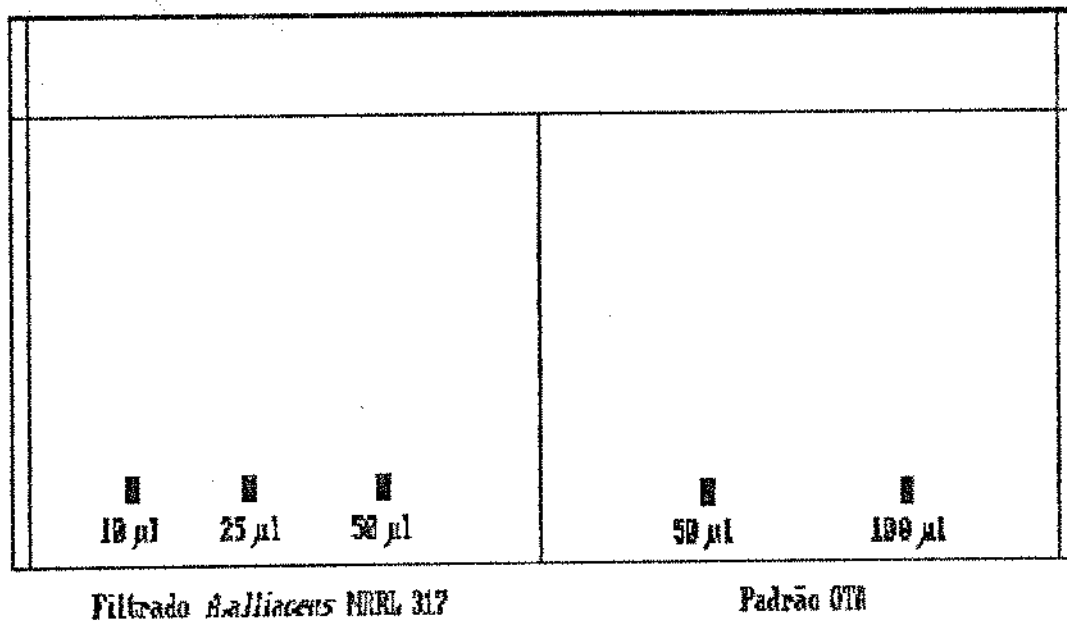


FIGURA 4 - ESQUEMA DE PREPARO DAS PLACAS DE BIOAUTOGRAFIA DO FILTRADO DE *A. alliaceus* NRRL 317

Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas sobre a invasão dos Fungos Toxigênicos em Sementes: Com o objetivo de estudar a capacidade protetora dos filtrados de culturas antagonistas contra a invasão dos fungos toxigênicos em sementes armazenadas; sementes de feijão superficialmente desinfectadas com solução de hipoclorito de sódio 1%, e lavadas quatro vezes com água destilada estéril (37), foram mergulhados nos filtrados de cultura de *Aspergillus heteromorphus*, *Aspergillus niger* NRRL 6411 e *Trichoderma viride* por 30 minutos, sendo então escorridas e colocadas para secar em placas de Petri estéreis, abertas, em câmara de fluxo laminar (Vecco, Campinas, SP). 1 ml de solução densa de esporos de *A. alliaceus* NRRL 317 ou *A. ochraceus* foi inoculado por espalhamento com alça de Drigalski, em duplicata, em placas de Petri contendo meio Czapeck-Dox agar. A seguir, 10 grãos de feijão tratados com os filtrados foram colocados sobre cada placa inoculada com os fungos toxigênicos (37) e as placas foram incubadas a 28°C por 7 dias. Foram realizados seis experimentos: (A) feijão não desinfectado, não tratado, em placas não inoculadas com fungos toxigênicos; (B) feijão não desinfectado, não tratado, em placas inoculadas com fungos toxigênicos; (C) feijão desinfectado, não tratado, em placas não inoculadas com fungos toxigênicos; (D) feijão desinfectado, não tratado, em placas inoculadas com fungos toxigênicos; (E) feijão desinfectado, tratado, em placas não inoculadas com fungos toxigênicos; e (F) feijão desinfectado, tratado, em placas inoculadas com fungos toxigênicos.



Cuidados com a Contaminação do Laboratório: Todo material contaminado, ou supostamente contaminado com as toxinas, foi deixado em imersão em uma solução de hipoclorito de sódio 2%- acetona (4:1 v/v) durante 24 horas, antes de ser lavado. Material contendo fungos ou esporos de fungos toxigênicos, foram submetidos aos mesmos procedimentos, sendo autoclavado antes da lavagem. Nos experimentos para determinação de peso seco, os fungos foram mortos com clorofórmio aplicado à rolha do frasco antes de serem separados por filtração.

OBS: Todos os reagentes utilizados foram P.A

## RESULTADOS

### Levantamento da Incidência de Fungos do grupo *Aspergillus ochraceus* em Alimentos

Foi analisada a microbiota fúngica de 34 amostras correspondentes a vários tipos de alimentos disponíveis para consumo humano e animal (Tabela 1)

Observou-se que, de um modo geral, a contaminação fúngica destes alimentos, em relação aos tipos de microrganismos presentes, apresentou-se semelhante, com predomínio dos gêneros *Aspergillus*, grupos *flavus* e *niger*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Rhizopus*.

A presença de microrganismos do grupo *Aspergillus ochraceus* foi extremamente baixa, aparecendo apenas nas amostras de amêndoa, cevada, trigo em grão e em feijão. Destes microrganismos isolados, apenas uma cepa de *Aspergillus ochraceus*, proveniente de uma das amostras de feijão, foi produtora de OTA.

### Microrganismos Toxigênicos

Foram escolhidas cinco espécies de *Aspergillus* conhecidamente produtoras de OTA, OTB (Tabela 2), e a cepa selvagem de *A. ochraceus* isolada de feijão.

Os fungos produtores de ocratoxina quando cultivados em CAM desenvolvem-se muito bem, sem alterar suas características morfológicas, e quando observados sob luz UV de onda longa, apresentam ao redor da colônia uma intensa fluorescência azul brilhante indicativa da presença da toxina (11). Por apresentar esta característica, a cepa selvagem isolada foi cultivada em CAM e submetida aos processos de extração, cromatografia em camada delgada e confirmação química, sendo então identificada como produtora de OTA.

### Seleção de Fungos Antagonistas

Dos 24 microrganismos estudados quanto ao antagonismo em relação aos fungos toxigênicos (Tabelas 3 e 4), 12 foram isolados de alimentos, 3 isolados ao acaso como contaminantes de placas de cultura pura de fungos do grupo *A. ochraceus*, 1 isolado de madeira em decomposição e os outros 9, são microrganismos provenientes de coleções de cultura.

As cepas *Aspergillus chevalieri* e *Monodyctis castaneae* isoladas produziram pigmento de cor ferrugem, difusível no meio Czapeck-Dox agar, e restrito ao redor da colônia em CAM. *Aspergillus terreus* produziu pigmento amarelo, difusível no meio Czapeck-Dox agar, e restrito ao redor da colônia em CAM. Estes

pigmentos não foram identificados. Nenhuma das cepas isoladas produziu qualquer pigmento fluorescente em CAM.

#### Taxa de Crescimento dos Microrganismos

O estudo da taxa de crescimento (Tabela 5) mostrou que os fungos do grupo *A. ochraceus* apresentaram taxa de crescimento variando entre 3,07 à 4,33 mm/dia, com exceção de *A. alliaceus* NRRL 317 que apresentou crescimento mais rápido (7,12 mm/dia). Os microrganismos testados como antagonistas mostraram taxas de crescimento variando de 2,08 mm/dia (*Aspergillus defleuctus*) à 15,25 mm/dia (*Trichoderma viride*).

#### Interações entre as Colônias dos Microrganismos em Meio de Cultura Sólido.

As reações observadas entre as colônias foram agrupadas em cinco classes: (A) não agressão - quando os dois microrganismos crescem normalmente, até que as margens das colônias se encontrem, cessando então o crescimento; (B) inibição à distância - as duas colônias de microrganismos crescem até certo ponto, observando-se entre elas uma região bem definida não invadida por micélio; (C) invasão - o microrganismo testado como antagonista cresce sobre a colônia do produtor de toxina, com ou sem mudança na sua taxa de crescimento; (D) invasão inversa - o produtor de toxina cresce sobre a colônia do microrganismo testado como antagonista, com ou sem mudança na sua taxa de crescimento; e (E) entrelaçamento - após o contato das duas

colônias, os microrganismos continuam à crescer, com ou sem mudança nas suas taxas de crescimento, ocorrendo então entrelaçamento entre as hifas de ambos. Alguns exemplos das reações observadas estão ilustrados nas figuras 5 a 8.

Os resultados de interação entre os microrganismos estudados (Tabelas 6 a 11) mostraram que quando em igualdade de condições, os fungos do grupo *A. ochraceus* são bons competidores, apresentando geralmente reações de não agressão ou de invasão inversa, crescendo sobre a outra colônia, embora quase sempre com diminuição na taxa de crescimento. Apenas dois dos fungos testados como antagonistas, *Aspergillus heteromorphus* e *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, mostraram invasividade, inibindo o crescimento de todos os fungos toxigênicos estudados e crescendo sobre eles. Esse tipo de reação também foi observado entre os pares *Absidia repens* NRRL 1336/*A. melleus* NRRL 3519, *A. repens* NRRL 1336/*A. ochraceus* NRRL 3174, e *Trichoderma viride*/*A. ochraceus* NRRL 3174.

*Rhizopus microsporus*, com taxa de crescimento de 11,50 mm/dia, cresce rapidamente sobre os fungos do grupo *A. ochraceus*, sem entretanto inibir seu crescimento, pois alguns dias após ter coberto totalmente a placa de cultura, foi verificada esporulação dos fungos toxigênicos por entre as hifas do antagonista.

Quanto à ação dos fungos testados sobre a fluorescência característica da ocratoxina produzida pelos fungos toxigênicos em CAM, as reações observadas nos levaram à propor as seguintes classes: (A) sinérgica - ocorre aumento na intensidade da fluorescência produzida pelos fungos toxigênicos; (B) neutra -

não ocorre alteração na intensidade da fluorescência produzida pelos fungos toxigênicos; (C) antagonista 1 - dias após o contato com o outro fungo, ocorre diminuição na intensidade da fluorescência produzida pelos fungos toxigênicos, passando de azul brilhante para azul opaco; (D) antagonista 2 - pouco antes do contato entre os microrganismos, ocorre no centro da placa de cultura, o aparecimento de uma linha de pigmentação amarela ou laranja, visível sob luz natural, seguida pela diminuição progressiva na intensidade de fluorescência na região de contato entre as colônias, passando de azul brilhante para azul opaco; (E) antagonista 3 - dias após o contato com o outro microrganismo, ocorre alteração na fluorescência produzida pelos fungos toxigênicos, passando de azul brilhante para verde brilhante; (F) antagonista 4 - dias após o contato entre as colônias, ocorre na região de contato entre as colônias, o aparecimento de pigmentação amarela ou laranja, visível sob luz natural, acompanhada de alteração na fluorescência produzida pelos fungos toxigênicos, passando de azul brilhante para verde brilhante.

De acordo com estas classes, verificou-se que, dos 24 fungos estudados, 16 provocaram algum tipo de alteração na fluorescência indicativa da produção de toxina (Tabelas 6 a 11). Em alguns casos a reação observada entre os pares foi de visualização bastante evidente, em outros duvidosa. A reação antagônica 1 foi observada de maneira intensa entre os produtores de OT e as duas cepas de *Trichoderma*, e de maneira menos intensa entre os produtores de OT e os fungos *Aspergillus candidus*, *Aspergillus chevalieri*, *Aspergillus versicolor*

ATCC 11730, *Monodictys castaneae*, *Mucor racemosus* e *Penicillium funiculosum* ATCC 11797. Com os pares *A. sclerotiorum* NRRL 5170/*Rhizopus microsporus* e *A. sclerotiorum* NRRL 5170/*Trichothecium roseum* foi observada a reação antagônica tipo 2. Entre os fungos toxigênicos e os fungos do grupo *Aspergillus niger*, verificou-se a reação antagônica 4. A reação antagônica 3 ocorreu na presença de *Aspergillus heteromorphus*, *Paecilomyces variotii*, *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 e *Rhizopus microsporus*. Nenhum dos microrganismos estudados apresentou reação sinérgica. *Aspergillus deflectus*, *Aspergillus terreus*, *Absidia repens* NRRL 1336, *Cladosporium* spp, *Mucor griseo-cyanus* NRRL 3359 e *Penicillium raistrickii* NRRL 2038 não provocaram alteração na fluorescência produzida pelos fungos toxigênicos.

#### Desenvolvimento dos Fungos Toxigênicos em Meio Líquido

Como controle para os estudos de antagonismo em meio líquido, inicialmente determinou-se os parâmetros de desenvolvimento dos fungos produtores de OT em meio YES com pH 6,9.

Os resultados obtidos (Tabela 12) mostraram que em geral os fungos do grupo *A. ochraceus* produzem filtrado com pH alcalino em 12 dias de incubação a 28°C. *A. alliaceus* NRRL 317 foi o fungo toxigênico que produziu filtrado mais neutro (pH 6,8). Em relação ao desenvolvimento do micélio, os que apresentaram menor crescimento foram *A. ochraceus* (0,46 g de micélio/50 ml de meio de cultura) e *A. melleus* NRRL 3519 (0,55 g de micélio/50 ml de meio de cultura); e o que apresentou

maior crescimento foi *A. sclerotiorum* NRRL 5170 (0,86 g de micélio/50 ml de meio de cultura). Além de OTA (mancha de fluorescência azul com Rf entre 0,45 e 0,50), foi detectada uma mancha fluorescente azul, com Rf entre 0,30 e 0,40 nas CCDs dos filtrados de *A. melleus* NRRL 3519 (6<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> dias), *A. ochraceus* NRRL 3174 (12<sup>o</sup> dia), *A. sclerotiorum* NRRL 5170 (6<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> dias) e *A. sulphureus* NRRL 4077 (6<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> dias); e, uma mancha fluorescente azul, com Rf entre 0,60 e 0,70, nos filtrados de *A. ochraceus* NRRL 3174 (6<sup>o</sup> dia), *A. ochraceus* (6<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> dias), *A. sclerotiorum* NRRL 5170 (6<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> dias) e *A. sulphureus* NRRL 4077 (6<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> dias). *A. alliaceus* NRRL 317 foi o maior produtor de OTA (1000 µg de OTA/50 ml de meio de cultura), seguido por *A. sclerotiorum* NRRL 5170 e *A. sulphureus* NRRL 4077 (500 µg de OTA/50 ml de meio de cultura). A linhagem *A. ochraceus* NRRL 3174 e a cepa selvagem *A. ochraceus* produziram 50 µg de OTA/50 ml de meio de cultura. Ainda em relação à produção de toxina, verificou-se que *A. alliaceus* NRRL 317 e *A. ochraceus* NRRL 3174 apresentaram o máximo de produção no 6<sup>o</sup> dia, e a concentração de toxina permaneceu constante até o final do período de incubação. *A. melleus* NRRL 3519 e *A. sclerotiorum* NRRL 5170 também apresentaram o máximo de produção no 6<sup>o</sup> dia, mas a concentração da toxina reduziu-se para a metade no 12<sup>o</sup> dia. *A. ochraceus* e *A. sulphureus* NRRL 4077 apresentaram o máximo de produção no 12<sup>o</sup> dia.



## Desenvolvimento dos Fungos Antagonistas em Meio Líquido

Como controle para os experimentos em meio líquido, cultivou-se os microrganismos antagonistas em meio YES com pH 6,8, por 15 dias. A tabela 13 apresenta os resultados obtidos. Verificou-se que, os antagonistas apresentam filtrados com pHs variando de 2,4 (*Aspergillus niger* NRRL 6411) a 8,1 (*Trichothecium roseum*) no 6º dia de incubação, e de 4,1 (*A. niger*) a 8,6 (*Aspergillus candidus*) no 15º dia de incubação; e o crescimento variando de 0,12 g/50 ml de meio de cultura (*Mucor racemosus* e *Paecilomyces variotii*) a 0,76 g/50 ml de meio de cultura (*A. niger* NRRL 6411). Nenhum dos antagonistas produziu substâncias fluorescentes com Rf e cores semelhantes à OTA, OTB ou OTC (21).

### Determinação de Antagonismo em Meio Líquido - Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas sobre o Desenvolvimento dos Fungos Toxigênicos

Os 16 fungos que provocaram alteração na fluorescência produzida pelos fungos toxigênicos nos experimentos de interação em CAM, foram selecionados para os estudos de antagonismo em meio líquido.

De acordo com sua ação sobre o crescimento e a produção de toxina pelos fungos toxigênicos, os antagonistas foram classificados em: (A) muito inibidor (de 75 à 100% de inibição), (B) inibidor (de 50 à 74% de inibição), (C) moderadamente inibidor (de 25 à 49% de inibição), (D) não inibidor (de 0 à

24% de inibição, atribuindo-se a alteração no crescimento ou produção de toxina, à limitação de nutrientes no substrato) e (E) estimulante (quando o crescimento dos fungos ou a produção de toxina foi maior que o obtido no controle). Os resultados obtidos estão apresentados nas tabelas 14 a 19, e nas figuras 9 a 14.

O filtrado de cultura de *Aspergillus candidus* apresentou pH 6,2 e, em relação ao crescimento dos fungos toxigênicos, mostrou-se moderadamente inibidor para *A. sclerotiorum* NRRL 5170 (44%), *A. alliaceus* NRRL 317 (41%), *A. sulphureus* NRRL 4077 (35%) e *A. ochraceus* (28%); e não inibidor para *A. ochraceus* NRRL 3174 (24%) e *A. melleus* NRRL 3519 (22%). Em relação a produção de toxina, o filtrado foi muito inibidor, provocando de 95% (*A. sulphureus* NRRL 4077) a 100% de inibição (*A. melleus* NRRL 3519, *A. ochraceus* NRRL 3174, *A. ochraceus* e *A. sclerotiorum* NRRL 5170). O tratamento térmico provocou diminuição no pH do filtrado (5,1), alterou a ação sobre o crescimento de *A. melleus* NRRL 3519 e *A. sulphureus* NRRL 4077, passando a ser respectivamente moderadamente inibidor (27%) e não inibidor (16%), mas não alterou o efeito muito inibidor sobre a produção de toxina.

O filtrado de *Aspergillus chevalieri* apresentou pH 6,3 e foi inibidor para o crescimento de *A. sclerotiorum* NRRL 5170 (53%), moderadamente inibidor para *A. alliaceus* NRRL 317, *A. melleus* NRRL 3519, *A. sulphureus* NRRL 4077 (42%) e *A. ochraceus* NRRL 3174 (32%), e não inibidor para *A. ochraceus* (17%). A produção de toxina foi totalmente inibida, exceto em *A. alliaceus* NRRL 317 onde foi inibida em 92% no 6º dia e em 95%

no 12<sup>o</sup>. O tratamento térmico do filtrado alterou pouco o pH (6,2), não alterou o efeito muito inibidor sobre a produção de toxina, e mostrou-se moderadamente inibidor para o crescimento de todos os microrganismos.

*Aspergillus heteromorphus* produziu filtrado com pH ácido (4,9) e mostrou-se muito inibidor para o crescimento dos fungos toxigênicos: 50% (*A. alliaceus* NRRL 317), 56% (*A. melleus* NRRL 3519 e *A. ochraceus*), 64% (*A. ochraceus* NRRL 3174), 65% (*A. sclerotiorum* NRRL 5170) e 67% (*A. sulphureus* NRRL 4077). A produção de toxina foi totalmente inibida, exceto em *A. sulphureus* NRRL 4077, onde foi inibida em 98%. O tratamento térmico do filtrado não alterou as faixas de inibição de crescimento e produção de toxina, a não ser para o crescimento de *A. alliaceus* NRRL 317 (48%).

Os filtrados de cultura dos *Aspergillus niger* estudados mostraram-se bastante antagonistas. *A. niger* NRRL 6411 produziu um filtrado extremamente ácido (1,8) e suprimiu totalmente o crescimento, a germinação de esporos e a produção de toxina. *Aspergillus alliaceus* NRRL 317, fungo toxigênico produtor de filtrado de cultura com pH mais baixo (Tabela 12), foi o único cujos esporos apresentaram formação de tubo germinativo ao serem cultivados neste filtrado, embora não ultrapassassem esse estágio. O tratamento térmico do filtrado, causando um leve aumento no pH (2,6), não alterou o efeito sobre a produção de toxina, mas, exceto para *A. melleus* NRRL 3519, não impediu totalmente o crescimento dos fungos toxigênicos, embora com inibição variando de 80% (*A. ochraceus*) a 92% (*A. ochraceus* NRRL 3174). O filtrado de *A. niger* ATCC 9642 apresentou pH pouco

menos ácido (3,4), suprimindo totalmente a produção de toxina, mas não o crescimento, tendo sido, ainda assim, muito inibidor para *A. ochraceus* NRRL 3174 (77%) e inibidor para *A. sclerotiorum* NRRL 5170, *A. melleus* NRRL 3519 (73%), *A. sulphureus* NRRL 4077 (72%), *A. ochraceus* (65%) e *A. alliaceus* NRRL 317 (61%). O tratamento térmico não modificou o pH do filtrado e a inibição da produção de toxina, mas aumentou a inibição de crescimento para *A. sulphureus* NRRL 4077 (84%), *A. melleus* NRRL 3519 (80%), *A. sclerotiorum* NRRL 5170 (75%), e diminuiu a inibição para *A. ochraceus* NRRL 3174 (64%). A cepa selvagem de *A. niger*, também apresentou pH mais alto (3,0), mas provocou inibição total do crescimento, germinação de esporos e produção de toxina. Aqui, o tratamento térmico não modificou o efeito inibidor do filtrado.

O filtrado de *Aspergillus versicolor* ATCC 11730, com pH 6,5, mostrou-se muito inibidor para o crescimento de *A. sulphureus* NRRL 4077 (82%), *A. sclerotiorum* NRRL 5170 (78%) e *A. ochraceus* NRRL 3174 (76%), e inibidor para *A. melleus* NRRL 3519 (73%), *A. alliaceus* NRRL 317 (69%) e *A. ochraceus* (65%). A produção de toxina foi totalmente suprimida. O tratamento térmico tornou o pH um pouco mais ácido, mas não afetou as taxas de inibição obtidas com o filtrado não tratado.

*Monodictys castaneae*, com pH moderadamente ácido (5,7), mostrou-se não inibidor para o crescimento de *A. sulphureus* NRRL 4077 (21%) e moderadamente inibidor para os outros fungos toxigênicos, com taxas variando de 29% (*A. melleus* NRRL 3519) a 36% (*A. sclerotiorum* NRRL 5170). Para a produção de toxina, o filtrado foi muito inibidor, suprimindo totalmente a produção

nas duas linhagens de *A. ochraceus*, inibindo *A. alliaceus* NRRL 317 e *A. sulphureus* NRRL 4077 em 95% e 98% respectivamente, *A. melleus* em 90% no 6<sup>o</sup> dia e 95% no 12<sup>o</sup>, e *A. sclerotiorum* NRRL 5170 em 99% no 6<sup>o</sup> e 100% no 12<sup>o</sup> dia. O tratamento térmico do filtrado manteve a inibição moderada de crescimento apenas para *A. ochraceus* NRRL 3174 (32%) e *A. sclerotiorum* NRRL 5170 (38%), mostrando-se não inibidor para os outros microrganismos, com taxas variando de 13% (*A. ochraceus*) a 22% (*A. alliaceus* NRRL 317). O efeito sobre a produção de toxina não foi alterado.

O filtrado de *Mucor racemosus* apresentou pH 6,1, inibindo totalmente a produção de toxina, e sendo inibidor para o crescimento de *A. sclerotiorum* NRRL 5170 (65%), *A. melleus* NRRL 3519 (54%), *A. ochraceus* NRRL 3174 e *A. sulphureus* NRRL 4077 (53%), e levemente inibidor para *A. alliaceus* NRRL 317 (44%) e *A. ochraceus* (33%). Com o tratamento térmico, o pH e o efeito de inibição total da produção de toxina não foram alterados, e o filtrado mostrou-se inibidor para o crescimento de todos os microrganismos ocratoxigênicos, com taxas variando de 55% (*A. alliaceus* NRRL 317) a 73% (*A. sclerotiorum* NRRL 5170).

O filtrado de *Paecilomyces variotii* foi levemente ácido (5,2), inibindo o crescimento de *A. sclerotiorum* NRRL 5170 (53%), inibindo moderadamente *A. ochraceus* NRRL 3174 (40%), *A. sulphureus* NRRL 4077 (37%) e *A. alliaceus* NRRL 317 (33%); e não inibindo *A. ochraceus* (24%). A produção de toxina foi reduzida com taxas de inibição variando de 75% (*A. alliaceus* NRRL 317, 6<sup>o</sup> dia e *A. melleus* NRRL 3519, 6<sup>o</sup> dia) a 100% (*A. ochraceus*; *A. melleus* NRRL 3519, 12<sup>o</sup> dia; *A. ochraceus*

NRRL 3174, 6<sup>o</sup> dia e *A. sclerotiorum* NRRL 5170, 6<sup>o</sup> dia). O tratamento térmico do filtrado aumentou a inibição, tornando-se inibidor também para o crescimento de *A. ochraceus* NRRL 3174 (56%), *A. ochraceus* (61%) e *A. sulphureus* NRRL 4077 (68%), além de *A. sclerotiorum* NRRL 5170 (69%), mas não modificou o efeito sobre o crescimento de *A. alliaceus* NRRL 317 (48%) e *A. melleus* NRRL 3519 (45%), nem sobre as faixas de inibição da produção de toxina.

*Penicillium funiculosum* ATCC 11797 produziu um filtrado levemente ácido (5,7) e bastante viscoso, mas sem efeito inibidor sobre o crescimento dos fungos toxigênicos, com taxas de inibição variando de 2% (*A. ochraceus*) a 23% (*A. sclerotiorum* NRRL 5170). Em relação a produção toxina o filtrado inibiu totalmente apenas *A. ochraceus* NRRL 3174; *A. sulphureus* NRRL 4077 foi inibido em 60%; *A. alliaceus* NRRL 317 e *A. melleus* NRRL 3519 apresentaram inibição de 50% no 6<sup>o</sup> dia e de 75% no 12<sup>o</sup> dia; *A. sclerotiorum* NRRL 5170 não apresentou inibição no 6<sup>o</sup> dia, mas a toxina foi reduzida em 60% no 12<sup>o</sup> dia, e a cepa selvagem de *A. ochraceus* teve a produção de toxina retardada, pois apresentou 100% de inibição no 6<sup>o</sup> dia e 0% no 12<sup>o</sup> dia. O tratamento térmico do filtrado manteve o efeito não inibidor sobre o crescimento de *A. alliaceus* NRRL 317 (19%), *A. ochraceus* NRRL 3174 (13%) e *A. sulphureus* NRRL 4077 (19%), mas causou inibição moderada em *A. melleus* NRRL 3519 (27%) e *A. sclerotiorum* NRRL 5170 (28%), e estímulo de crescimento em *A. ochraceus* (4% a mais que o crescimento obtido no controle). O efeito inibitório sobre a produção de toxina aumentou com o tratamento térmico, tendo sido observada também inibição total

em *A. ochraceus*; inibição de 90% em *A. sulphureus* NRRL 4077; 95% de inibição no 12<sup>o</sup> dia para *A. alliaceus* NRRL 317 e 80% no 12<sup>o</sup> dia para *A. sclerotiorum* NRRL 5170. Apenas para *A. melleus* NRRL 3519 a inibição foi menor, ficando em 50%.

As espécies de *Rhizopus* estudadas apresentaram filtrados com pH alcalino (7,9). *R. arrhizus* NRRL 2582 causou aumento no crescimento de *A. melleus* NRRL 3519 (estímulo de 16%), *A. ochraceus* NRRL 3174 (estímulo de 10%), *A. ochraceus* e *A. sulphureus* NRRL 4077 (estímulo de 17%) e não inibiu *A. alliaceus* NRRL 317 (8%) e *A. sclerotiorum* NRRL 5170 (16%). O filtrado não inibiu a produção de toxina em *A. sclerotiorum* NRRL 5170; atrasou a produção de toxina em *A. ochraceus* (100% no 6<sup>o</sup> dia e 0% no 12<sup>o</sup> dia); inibiu em 50% *A. sulphureus* NRRL 4077, *A. melleus* NRRL 3519 e *A. alliaceus* NRRL 317, mas nos últimos, a produção foi reduzida no 12<sup>o</sup> dia a 25% e 90%, respectivamente; e inibiu a produção em *A. ochraceus* NRRL 3174 em 90% no 6<sup>o</sup> dia e 100% no 12<sup>o</sup> dia. Com o tratamento térmico do filtrado, verificou-se alteração apenas no efeito sobre o crescimento de *A. ochraceus* NRRL 3174, onde em lugar de estímulo houve uma não inibição de 8%. O efeito sobre a produção de toxina foi alterado apenas para *A. sclerotiorum* NRRL 5170, onde verificou-se inibição de 60%. *R. microsporus* mostrou-se não inibidor para *A. ochraceus* (15%) e moderadamente inibidor para os outros fungos toxigênicos com taxas variando de 25% (*A. alliaceus* NRRL 317) a 34% (*A. sclerotiorum* NRRL 5170). *A. ochraceus* NRRL 3174 teve a produção de toxina totalmente inibida; *A. sclerotiorum* NRRL 5170 foi inibido em 80%; *A. melleus* NRRL 3519 e *A. sulphureus* NRRL 4077 foram

inibidos em 50%; *A. alliaceus* NRRL 317 foi inibido em 50% e 90%, nos 6º e 12º dias; e *A. ochraceus* teve a produção de toxina atrasada (100% no 6º dia e 0% no 12º dia). O tratamento térmico do filtrado não modificou o efeito sobre a produção de toxina e provocou inibição moderada no crescimento de todos os fungos toxigênicos, com taxas variando de 25% (*A. melleus* NRRL 3519) a 48% (*A. sclerotiorum* NRRL 5170).

As espécies de *Trichoderma* mostraram ação diferenciada sobre o crescimento dos fungos toxigênicos. *T. harzianum*, com pH alcalino (7,7) provocou estímulo de crescimento com taxas variando de 8% (*A. ochraceus* NRRL 3174) a 42% (*A. sulphureus* NRRL 4077), exceto em *A. sclerotiorum* NRRL 5170, onde verificou-se uma não inibição de 2%. A produção de toxina não foi inibida em *A. ochraceus*; em *A. sclerotiorum* NRRL 5170, foi inibida em 50%; em *A. alliaceus* NRRL 317 e *A. melleus* NRRL 3519 houve inibição de 50% no 6º dia e de 90 e 95%, respectivamente, no 12º dia; em *A. melleus* NRRL 3519 verificou-se inibição de 90% (6º dia) e 100% (12º dia); e *A. sclerotiorum* NRRL 5170 foi inibido em 80% (12º dia), sem ter sido constatada produção de toxina no 6º dia. O tratamento térmico do filtrado aumentou o pH para 8,2, e diminuiu as taxas de estímulo de crescimento para 5% (*A. melleus* NRRL 3519) e 11% (*A. ochraceus*), provocando nos outros fungos uma não inibição com taxas variando de 3% (*A. alliaceus* NRRL 317, *A. ochraceus* NRRL 3174 e *A. sulphureus* NRRL 4077) a 15% (*A. sclerotiorum* NRRL 5170). Apenas observou-se atraso na produção de toxina por *A. ochraceus* com o tratamento térmico do filtrado. Já *T. viride*, produziu um filtrado com pH 6,3 e com forte cheiro de coco,



característico da espécie (29), que se mostrou muito inibidor para *A. sulphureus* NRRL 4077 (75%), *A. ochraceus* NRRL 3174 (76%), e *A. sclerotiorum* NRRL 5170 (77%), e inibidor para *A. alliaceus* NRRL 317 e *A. ochraceus* (72%) e *A. melleus* NRRL 3519 (71%). A produção de toxina foi totalmente inibida, exceto para 6<sup>o</sup> dia de *A. alliaceus* NRRL 317 onde a inibição foi de 97%. Com o tratamento térmico, não se alterou o efeito sobre a produção de toxina, mas o efeito sobre o crescimento de *A. alliaceus* NRRL 317 e *A. ochraceus* tornou-se muito inibidor (80 e 76%, respectivamente).

*Trichothecium roseum* produziu o mais alcalino dos filtrados de cultura estudados (pH 8,5), sendo inibidor para o crescimento de *A. alliaceus* NRRL 317 (52%) e *A. sclerotiorum* NRRL 5170 (51%) e moderadamente inibidor para *A. melleus* NRRL 3519 (44%), *A. ochraceus* NRRL 3174 (45%), *A. ochraceus* (33%) e *A. sulphureus* NRRL 4077 (48%). A produção de toxina foi totalmente suprimida. O tratamento térmico do filtrado não alterou o efeito sobre a produção de toxina, mas diminuiu o efeito inibidor sobre o crescimento de *A. alliaceus* NRRL 317 (42%) e aumentou sobre *A. melleus* NRRL 3519 (74%) e *A. sulphureus* NRRL 4077 (63%).

O pH, durante o desenvolvimento dos fungos toxigênicos nos filtrados de culturas antagonistas seguiu o mesmo padrão de variação observado no controle (Tabela 12).

Quanto à resistência frente aos filtrados antagonistas, a cepa selvagem de *A. ochraceus* foi a que se mostrou mais resistente à inibição ao crescimento e a produção de toxina, *A. sclerotiorum* NRRL 5170 o mais sensível a inibição ao

crescimento, e *A. ochraceus* NRRL 3174 o mais sensível a inibição a produção de toxina.

Com o objetivo de verificar quais substâncias presente nos filtrados de cultura dos fungos antagonistas foram responsáveis pela inibição dos fungos toxigênicos, utilizou-se o método de bioautografia, cultivando-se a cepa selvagem de *A. ochraceus*, mais resistente à inibição, e *A. sclerotiorum* NRRL 5170, menos resistente à inibição ao crescimento, sobre CCD dos filtrados de culturas antagonistas, desenvolvidos em etanol-amônia 25%- água (50:16:12, v/v/v), onde apresentaram boa separação de substâncias. Após o período de incubação, os fungos toxigênicos apresentaram crescimento e esporulação, não se notando zonas de inibição (Figura 15).

#### Efeito do pH no Desenvolvimento dos Fungos Toxigênicos

Os filtrados de culturas antagonistas apresentaram, após 7 dias de incubação, pHs variando de 2,5 a 8,1 (Tabela 13). Para examinar a influência desses pHs nas inibições observadas nos experimentos em meio líquido, foram determinadas as condições de desenvolvimento dos fungos toxigênicos em YES com pHs extremos (Tabelas 20 e 21, Figuras 16,17 e 18). O crescimento dos fungos toxigênicos em pH alcalino foi semelhante ao crescimento em pH normal, com poucas diferenças no peso seco final do micélio. A produção de toxina por *A. alliaceus* NRRL 317, *A. melleus* NRRL 3519 e *A. sulphureus* NRRL 4077, foi reduzida a metade devido a alcalinização do substrato. *A. ochraceus* NRRL 3174 produziu apenas 10% da toxina até o 6º dia, e a mesma não foi

detectada no filtrado ao final do período de incubação. *A. ochraceus* e *A. sclerotiorum* NRRL 5170 não mostraram alteração na produção de toxina, embora a diminuição da toxina do 6º para o 12º dia em *A. sclerotiorum* NRRL 5170 tenha sido maior que a verificada no controle em pH próximo a neutro. Verificou-se que, em pHs ácidos os fungos toxigênicos não crescem e não produzem toxina, exceto *A. alliaceus* NRRL 317, que apresentou crescimento moderado (0,33 g de micélio/50 ml de meio de cultura) em comparação com o crescimento em pH próximo a neutro (0,67 g de micélio/50 ml de meio de cultura), mas não produziu toxina.

Uma vez que os filtrados de cultura dos fungos do grupo *Aspergillus niger* mostraram pHs muito baixos, e que isso pode ser a causa da inibição dos fungos toxigênicos observada, cultivou-se os fungos toxigênicos nos filtrados dessas culturas, neutralizando-se o pH para 6,7, com NaOH 5N. Com a correção do pH do filtrado de *A. niger* NRRL 6411, a inibição de crescimento foi alterada de 100%, para 68% (*A. sulphureus* NRRL 4077), 69% (*A. ochraceus*), 73% (*A. melleus* NRRL 3519), 74% (*A. ochraceus* NRRL 3174), 76% (*A. alliaceus* NRRL 317) e 86% (*A. sclerotiorum* NRRL 5170). O filtrado de *A. niger* ATCC 9642 com pH corrigido, mostrou-se inibidor para todos os fungos toxigênicos, exceto para *A. sclerotiorum* NRRL 5170 (80%). A correção do pH do filtrado da cepa selvagem de *A. niger*, diminuiu o efeito inibidor sobre o crescimento, mas ainda assim, o filtrado mostrou-se muito inibidor, com taxas variando de 75% (*A. alliaceus* NRRL 317) a 85% (*A. sclerotiorum* NRRL 5170); e inibidor para *A. ochraceus* (69%). Em nenhum dos casos a produção

de toxina deixou de ser totalmente inibida pela correção do pH (Tabela 22).

#### Estudo de Degradação da Ocratoxina pelos Fungos Antagonistas em Meio Líquido

Por ter se mostrado o melhor produtor de OTA e por ter sido o único à produzir filtrado com pH próximo a neutro, *A. alliaceus* NRRL 317 foi escolhido para os estudos de degradação de ocratoxina pelos fungos antagonistas. O filtrado utilizado nestes estudos apresentou pH 6,1 e 20 µg de OTA/ml de filtrado. Além disso, apresentou um pigmento amarelo não fluorescente com Rf 0,67, não identificado. Nestas condições, o filtrado de *A. alliaceus* NRRL 317 inibiu totalmente o crescimento de todos os fungos antagonistas. A germinação dos esporos também foi inibida, com exceção dos esporos de *Aspergillus candidus*, *Aspergillus niger* NRRL 6411, *A. niger* e *Aspergillus versicolor* ATCC 11730, que formaram tubo germinativo, mas não apresentaram desenvolvimento adicional, indicando que nos experimentos em meio líquido tiveram seu desenvolvimento interrompido. Durante o período de incubação, houve uma pequena variação de pH, observada também no controle (6,5 no 7º dia e 5,8 no 12º dia). A concentração de OTA permaneceu constante durante todo o tempo de incubação. Os antagonistas cultivados sobre seus próprios filtrados apresentaram desenvolvimento normal.

Com o objetivo de verificar se foi a OTA ou alguma outra substância presente no filtrado de *A. alliaceus* NRRL 317, a causa da inibição do desenvolvimento dos fungos antagonistas, e também para esclarecer a capacidade de alteração de fluorescência observada nos experimentos em CAM, foram escolhidos um representante de três das classes antagonistas propostas para interação em relação a produção de toxina, para a bioautografia com o filtrado de cultura toxigênico: *A. niger* NRRL 6411 (reação antagônica 4), *R. arrhizus* NRRL 2582 (reação antagônica 3) e *T. viride* (reação antagônica 1). O crescimento e esporulação destes fungos antagonistas sobre a CCD do filtrado de *A. alliaceus* NRRL 317 e do padrão de OTA não foi afetado, não mostrando zonas de inibição. Por outro lado, as manchas fluorescentes presentes inicialmente, desapareceram das CCDs após o crescimento e esporulação dos fungos antagonistas, o que não ocorreu na CCD sem inóculo usada como controle. Também não se verificou a formação de novas manchas fluorescentes (Figura 19).

#### Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas sobre a Invasão dos Fungos Toxigênicos em Sementes

Para verificar se os filtrados de culturas antagonistas que apresentaram melhores resultados inibitórios, teriam capacidade de proteger sementes armazenadas contra invasão pelos fungos toxigênicos, sementes de feijão foram tratadas com os filtrados de *Aspergillus heteromorphus*, *Aspergillus niger* NRRL 6411 e *Trichoderma viride*, e testadas contra *A. alliaceus*

NRRL 317 e *A. ochraceus*. As sementes de feijão quando não esterilizadas superficialmente (experimento A), apresentaram-se totalmente cobertas por fungos, predominantemente *Fusarium* sp, *Aspergillus* grupo *flavus* e *Penicillium* sp, e mais raramente, *Aspergillus* grupos *ochraceus* e *niger*. Com desinfecção superficial (experimento C), as sementes também apresentaram-se totalmente cobertas pelas mesmas espécies de microrganismos. Inoculando-se as sementes não desinfectadas e desinfectadas superficialmente, com os fungos toxigênicos (experimentos B e D), observou-se o desenvolvimento dos *Aspergillus* grupo *flavus* e *Penicillium* sp, embora com menos vigor que nos experimentos anteriores, e início de colonização das sementes pelos fungos toxigênicos. Nos experimentos em que as sementes de feijão foram tratadas com os filtrados antagonistas (E e F), constatou-se o desenvolvimento das mesmas espécies de microrganismos, nos mesmos padrões descritos acima.

TABELA 1- Alimentos Analisados para Seleção de Microrganismos

PRODUTOS	Nº DE AMOSTRAS	DE CONTAGEM TOTAL DE FUNGOS*	FUNGOS ISOLADOS		OUTROS GENEROS
			A. ochraceus** P	NP	
AMENDOAS#	1	$9,3 \times 10^5$	0	2	A. flavus A. niger Fusarium spp Penicillium spp Rhizopus spp
AMENDOIM	1	$6 \times 10$	0	0	A. flavus A. niger Penicillium spp Rhizopus spp
ARROZ	10	$1 \times 10^2$	0	0	A. flavus A. niger Aspergillus spp Fusarium spp Penicillium spp Rhizopus spp
AVEIA	1	$4 \times 10$	0	0	Cladosporium spp Mucor spp Penicillium spp
CASTANHA DE CAJÚ	1	$2 \times 10^3$	0	0	Penicillium spp
CASTANHA-DO PARA	1	$3 \times 10^3$	0	0	A. flavus Penicillium spp Rhizopus spp
CASTANHA PORTUGUESA#	2	$>300 \times 10^4$	0	0	Fusarium spp Penicillium spp Rhizopus spp
CEVADA	1	$5 \times 10$	0	9	A. flavus Aspergillus spp Cladosporium spp Penicillium spp Trichoderma spp

(continua)

TABELA 1- Alimentos Analisados para Seleção de Microrganismos (cont.)

PRODUTOS	Nº DE AMOSTRAS	DE CONTAGEM TOTAL DE FUNGOS*	FUNGOS ISOLADOS		OUTROS GENEROS
			A. ochraceus** P	NP	
FEIJAO	10	9 x 10	1	2	A. flavus Aspergillus spp Cladosporium spp Fusarium spp Penicillium spp Rhizopus spp
GRÃO DE BICO	1	5 x 10	0	0	Cladosporium spp Fusarium spp Penicillium spp T. roseum Rhizopus spp
MILHO	1	3 x 10 <sup>5</sup>	0	0	A. flavus Fusarium spp
NOZ PECAN#	1	9 x 10	0	0	Fusarium spp Penicillium spp
RAÇÃO	1	1,3 x 10 <sup>3</sup>	0	0	Aspergillus spp Cladosporium spp Fusarium spp Penicillium spp Rhizopus spp
TRIGO EM GRÃO 1		4 x 10	0	1	Aspergillus spp Cladosporium spp Penicillium spp Rhizopus spp
TRIGO MOIDO	1	3 x 10	0	0	Penicillium spp Rhizopus spp

\* Unidades formadoras de colônia/g de produto

\*\* P= produtor de ocratoxina, NP= não produtor de ocratoxina

# Amostras visivelmente mofadas



TABELA 2- Microrganismos Produtores de Ocratoxina

MICROORGANISMO		CAM
A. alliaceus	NRRL 317	+*
A. melleus	NRRL 3519	+
A. ochraceus	NRRL 3174	+
A. sclerotiorum	NRRL 5170	+
A. sulphureus	NRRL 4077	+

\* Presença de halo de fluorescência azul brilhante ao redor da colônia, indicativo da produção de ocratoxina, em meio de agar-coco (CAM), em observação sob luz UV de onda longa,

TABELA 3- Microrganismos Isolados e Estudados como Antagonistas.

MICROORGANISMO	ORIGEM
<i>Aspergillus candidus</i> Link	FEIJAO
<i>Aspergillus chevalieri</i> (Mang.) Thom & Raper	ARROZ
<i>Aspergillus deflectus</i> Fennel & Raper	FEIJAO
<i>Aspergillus heteromorphus</i> Batista e Maia	CONTAMINANTE
<i>Aspergillus niger</i> v. Tiegh.	ARROZ
<i>Aspergillus terreus</i> var <i>aureus</i> Thom & Raper	ARROZ
<i>Cladosporium</i> sp 1	CONTAMINANTE
<i>Cladosporium</i> sp 2	AVEIA
<i>Cladosporium</i> sp 3	GRAO DE BICO
<i>Monodyctis castaneae</i> (Wallr.) Huglos	AVEIA
<i>Mucor racemosus</i> Fr.f.sphaerospermus(Hagem)Schipper	AVEIA
<i>Paecilomyces variotti</i> Bainier	CONTAMINANTE
<i>Rhizopus microsporus</i> v.Tiegh. var <i>chimensis</i> (Saito) Schipper & Stalpers	GRAO DE BICO
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	CEVADA
<i>Trichoderma viride</i> Pers. ex S. F. Gray	MADEIRA
<i>Trichothecium roseum</i> (Pers.) Link & Gray	GRAO DE BICO

TABELA 4- Microrganismos Obtidos de Coleções de  
Cultura e Estudados como Antagonistas

MICROORGANISMO	CAM
<i>Absidia repens</i> v. Thiegh. NRRL 1336	—*
<i>A. niger</i> v. Thiegh. NRRL 6411	—
<i>A. niger</i> v. Thiegh. ATCC 9642	—
<i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tiraboshi ATCC 11730	—
<i>M. griseo-cyanus</i> (Hagem) Schipper NRRL 3359	—
<i>P. funiculosum</i> Thom ATCC 11797	—
<i>P. raistrickii</i> G. Smith NRRL 2038	—
<i>R. arrhizus</i> Fischer NRRL 2582	—

\* Ausência de halo de fluorescência ao redor da colônia, em meio de agar-coco (CAM), em observação sob luz UV de onda longa.

TABELA 5- Taxa de Crescimento dos Microrganismos.\*

MICROORGANISMO		TAXA DE CRESCIMENTO mm/dia **	
<i>Aspergillus alliaceus</i>	NRRL 317		7,12
<i>Aspergillus melleus</i>	NRRL 3519		3,07
<i>Aspergillus ochraceus</i>	NRRL 3174		4,33
<i>Aspergillus ochraceus</i>			4,16
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	NRRL 5170		4,25
<i>Aspergillus sulphureus</i>	NRRL 4077		4,20
<i>Absidia repens</i>	NRRL 1336		6,12
<i>Aspergillus candidus</i>			3,42
<i>Aspergillus chevalieri</i>			3,84
<i>Aspergillus deflectus</i>			2,08
<i>Aspergillus heteromorphus</i>			3,06
<i>Aspergillus niger</i>	NRRL 6411		9,16
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 9642		8,83
<i>Aspergillus niger</i>			9,66
<i>Aspergillus terreus</i>			5,12
<i>Aspergillus versicolor</i>	ATCC 11730		2,52
<i>Cladosporium</i> sp 1			2,08
<i>Cladosporium</i> sp 2			4,33
<i>Cladosporium</i> sp 3			2,08
<i>Monodictys castaneae</i>			4,50
<i>Mucor griseo-cyanus</i>	NRRL 3359		11,99
<i>Mucor racemosus</i>			2,50
<i>Paecilomyces variotii</i>			6,50
<i>Penicillium funiculosum</i>	ATCC 11797		3,18
<i>Penicillium raistrickii</i>	NRRL 2038		2,38
<i>Rhizopus arrhizus</i>	NRRL 2582		13,30
<i>Rhizopus microsporus</i>			11,50
<i>Trichoderma harzianum</i>			13,50
<i>Trichoderma viride</i>			15,25
<i>Trichothecium roseum</i>			5,00

- \* Os valores representam a média de experimentos em triplicata  
 \*\* A taxa de crescimento foi calculada, dividindo-se o diâmetro da colônia cultivada em CAM, pelo número de dias de incubação a 28°C.

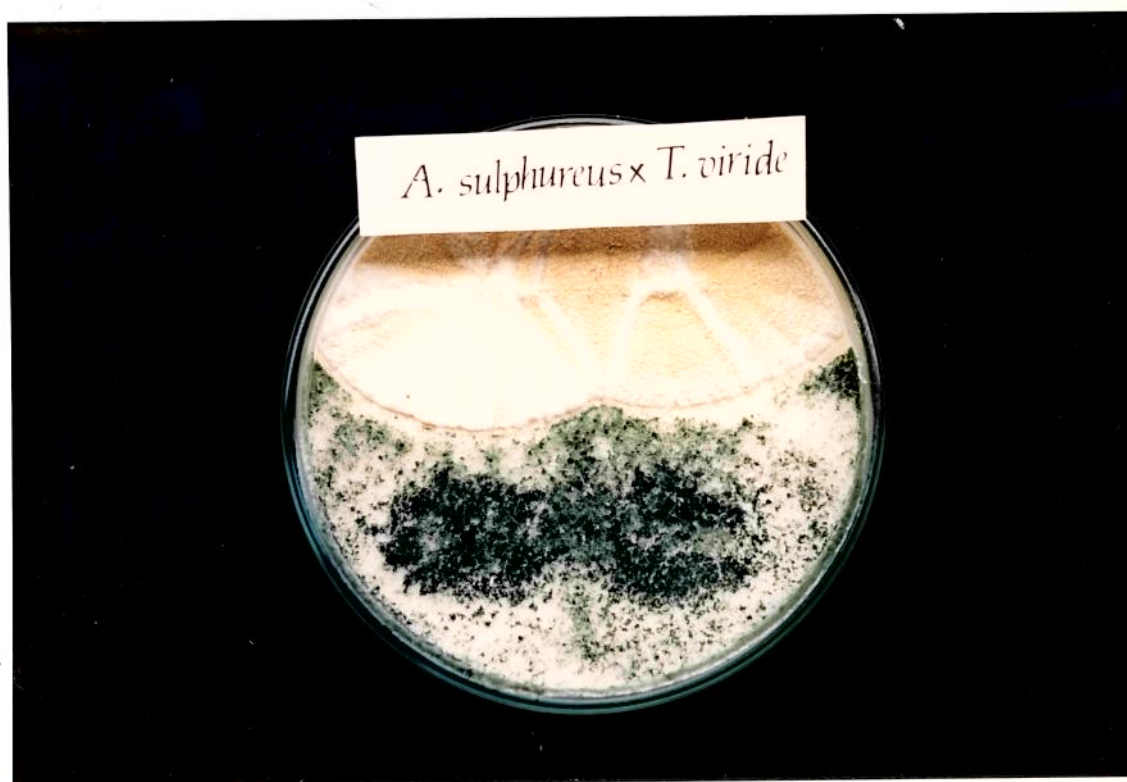


FIGURA 5 - INTERAÇÃO ENTRE OS PARES DE FUNGOS EM RELAÇÃO AO CRESCIMENTO DAS COLÔNIAS - 1 - NÃO AGRESSÃO: Interação entre as colônias de *Aspergillus sulphureus* NRRL 4077 e *Trichoderma viride*.



FIGURA 6 - INTERAÇÃO ENTRE OS PARES DE FUNGOS EM RELAÇÃO AO CRESCIMENTO DAS COLÔNIAS - 2 - INVASÃO: Interação entre as colônias de *Aspergillus sulphureus* NRRL 4077 e *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, com *R. arrhizus* encobrendo totalmente a colônia toxigênica.

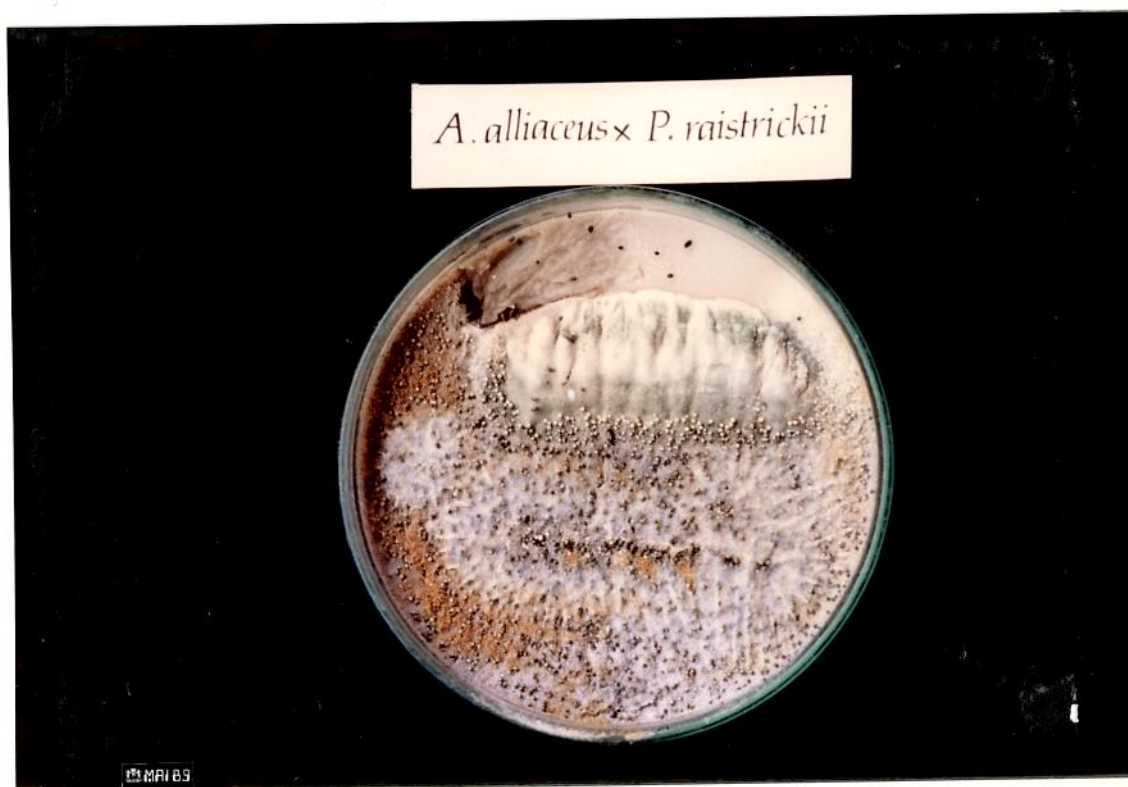


FIGURA 7 - INTERAÇÃO ENTRE OS PARES DE FUNGOS EM RELAÇÃO AO CRESCIMENTO DAS COLONIAS - 3 - INVASÃO INVERSA: Interação entre as colônias de *Aspergillus alliaceus* NRRL 317 e *Penicillium raistrickii* NRRL 2018, com o fungo toxigênico iniciando a invasão.



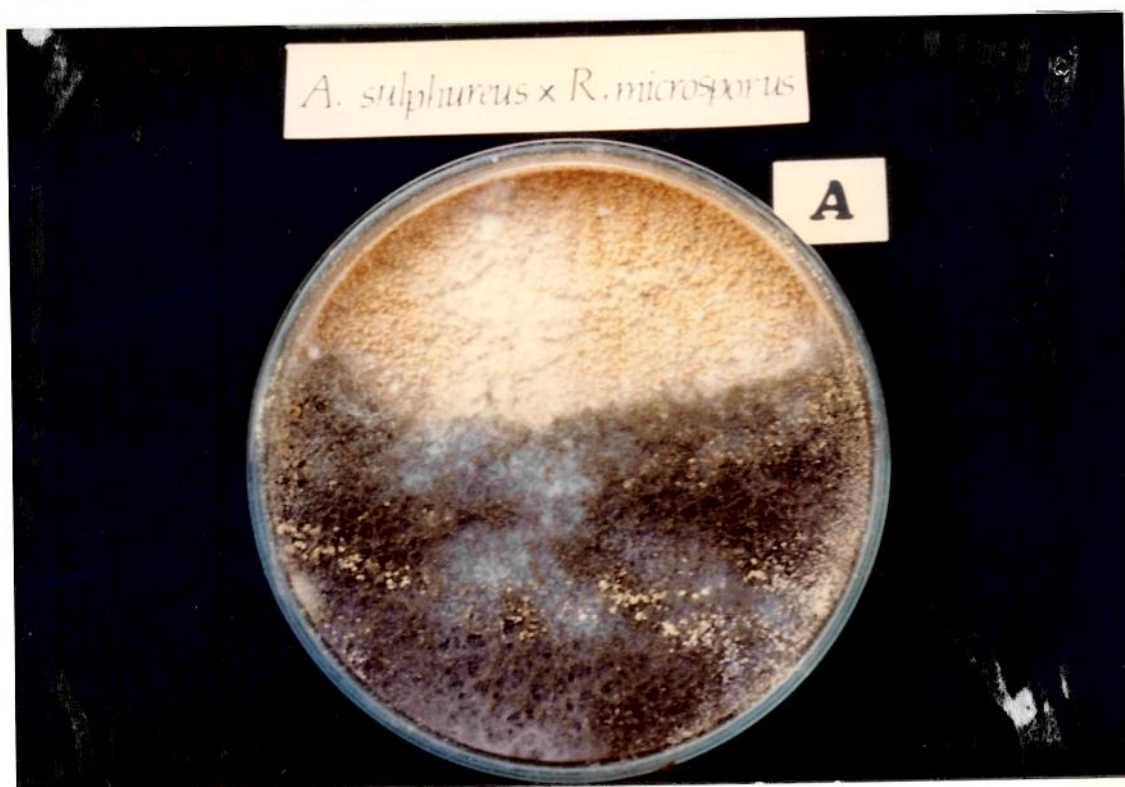


FIGURA 8 - INTERAÇÃO ENTRE OS PARES DE FUNGOS EM RELAÇÃO AO CRESCIMENTO DAS COLÔNIAS - 4 - ENTRELAÇAMENTO: Interação entre as colônias de *Aspergillus sclerotiorum* NRRL 5170 e *Rhizopus microsporus*, com o fungo toxigênico esporulando por entre as hifas de *R. microsporus*.



TABELA 6- Ação dos Fungos Estudados no Desenvolvimento de *Aspergillus alliaceus* NRRL 317 em CAM, de acordo com as Classes de Interação Propostas.\*

MICROORGANISMO	AÇÃO SOBRE CRESCIMENTO**	AÇÃO SOBRE PRODUÇÃO OT#
<i>Absidia repens</i> NRRL 1336	Invasão inversa	Neutra
<i>Aspergillus candidus</i>	Não agressão	Antagônica 1
<i>Aspergillus chevalieri</i>	Invasão inversa	Antagônica 1
<i>Aspergillus deflectus</i>	Invasão inversa	Antagônica 3
<i>Aspergillus heteromorphus</i>	Invasão	Antagônica 3
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 6411	Não agressão	Antagônica 4
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642	Não agressão	Antagônica 4
<i>Aspergillus niger</i>	Não agressão	Antagônica 4
<i>Aspergillus terreus</i>	Não agressão	Neutra
<i>Aspergillus versicolor</i> ATCC 11730	Não agressão	Neutra
<i>Cladosporium</i> sp 1	Invasão inversa	Neutra
<i>Cladosporium</i> sp 2	Invasão inversa	Neutra
<i>Cladosporium</i> sp 3	Invasão inversa	Neutra
<i>Monodyctis castaneae</i>	Não agressão	Antagônica 1
<i>Mucor griseo-cyanus</i> NRRL 3359	Invasão inversa	Neutra
<i>Mucor racemosus</i>	Invasão inversa	Antagônica 3
<i>Paecilomyces variotii</i>	Invasão inversa	Antagônica 3
<i>Penicillium funiculosum</i> NRRL 11797	Não agressão	Antagônica 1
<i>Penicillium raistrickii</i> NRRL 2038	Invasão inversa	Neutra
<i>Rhizopus arrhizus</i> NRRL 2582	Invasão	Antagônica 3
<i>Rhizopus microsporus</i>	Entrelaçamento	Antagônica 3
<i>Trichoderma harzianum</i>	Invasão inversa	Antagônica 1
<i>Trichoderma viride</i>	Não agressão	Antagônica 1
<i>Trichothecium roseum</i>	Não agressão	Neutra

\* Os experimentos foram realizados em triplicata, com incubação a 28° C.

\*\* Tipos de interação observados entre os fungos toxigênicos e os outros fungos estudados, em relação ao crescimento das colônias, de acordo com as classes propostas.

# Tipos de interação observados entre os fungos toxigênicos e os outros fungos estudados, em relação a produção de toxina, de acordo com as classes propostas.

TABELA 7- Ação dos Fungos Estudados no Desenvolvimento de *Aspergillus melleus* NRRL 3519 em CAM de Acordo com as Classes de Interação Propostas.

MICROORGANISMO	AÇÃO SOBRE CRESCIMENTO**	AÇÃO SOBRE PRODUÇÃO OT#
<i>Absidia repens</i> NRRL 1336	Invasão	Neutra
<i>Aspergillus candidus</i>	Não agressão	Antagônica 1
<i>Aspergillus chevalieri</i>	Invasão inversa	Antagônica 1
<i>Aspergillus deflectus</i>	Não agressão	Neutra
<i>Aspergillus heteromorphus</i>	Não agressão	Antagônica 3
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 6411	Não agressão	Antagônica 4
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642	Não agressão	Antagônica 4
<i>Aspergillus niger</i>	Não agressão	Antagônica 4
<i>Aspergillus terreus</i>	Não agressão	Neutra
<i>Aspergillus versicolor</i> ATCC 11730	Não agressão	Antagônica 3
<i>Cladosporium</i> sp 1	Invasão inversa	Neutra
<i>Cladosporium</i> sp 2	Invasão inversa	Neutra
<i>Cladosporium</i> sp 3	Invasão inversa	Neutra
<i>Monodyctis castaneae</i>	Não agressão	Antagônica 1
<i>Mucor griseo-cyanus</i> NRRL 3359	Invasão inversa	Neutra
<i>Mucor racemosus</i>	Invasão inversa	Antagônica 1
<i>Paecilomyces variotii</i>	Invasão inversa	Antagônica 3
<i>Penicillium funiculosum</i> NRRL 11797	Não agressão	Antagônica 1
<i>Penicillium raistrickii</i> NRRL 2038	Invasão inversa	Neutra
<i>Rhizopus arrhizus</i> NRRL 2582	Invasão	Antagônica 3
<i>Rhizopus microsporus</i>	Entrelaçamento	Antagônica 3
<i>Trichoderma harzianum</i>	Não agressão	Antagônica 1
<i>Trichoderma viride</i>	Não agressão	Antagônica 1
<i>Trichothecium roseum</i>	Não agressão	Neutra

\* Os experimentos foram realizados em triplicata, com incubação a 28° C.

\*\* Tipos de interação observados entre os fungos toxigênicos e os outros fungos estudados, em relação ao crescimento das colônias, de acordo com as classes propostas.

# Tipos de interação observados entre os fungos toxigênicos e os outros fungos estudados, em relação a produção de toxina, de acordo com as classes propostas.

TABELA 8 - Ação dos Fungos Estudados no Desenvolvimento de *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 em CAM de Acordo com as Classes de Interação Propostas.\*

MICROORGANISMO	AÇÃO SOBRE CRESCIMENTO**	AÇÃO SOBRE PRODUÇÃO OT#
<i>Absidia repens</i> NRRL 1336	Invasão	Neutra
<i>Aspergillus candidus</i>	Não agressão	Antagônica 1
<i>Aspergillus chevalieri</i>	Invasão inversa	Antagônica 1
<i>Aspergillus deflectus</i>	Não agressão	Neutra
<i>Aspergillus heteromorphus</i>	Invasão	Neutra
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 6411	Não agressão	Antagônica 4
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642	Não agressão	Antagônica 4
<i>Aspergillus niger</i>	Não agressão	Antagônica 4
<i>Aspergillus terreus</i>	Não agressão	Neutra
<i>Aspergillus versicolor</i> ATCC 11730	Não agressão	Antagônica 1
<i>Cladosporium</i> sp 1	Invasão inversa	Neutra
<i>Cladosporium</i> sp 2	Invasão inversa	Neutra
<i>Cladosporium</i> sp 3	Invasão inversa	Neutra
<i>Monodyctis castaneae</i>	Não agressão	Antagônica 1
<i>Mucor griseo-cyanus</i> NRRL 3359	Invasão inversa	Neutra
<i>Mucor racemosus</i>	Invasão inversa	Antagônica 1
<i>Paecilomyces variotii</i>	Invasão inversa	Antagônica 3
<i>Penicillium funiculosum</i> NRRL 11797	Não agressão	Antagônica 1
<i>Penicillium raistrickii</i> NRRL 2582	Invasão inversa	Neutra
<i>Rhizopus arrhizus</i> NRRL 2582	Invasão	Antagônica 3
<i>Rhizopus microsporus</i>	Entrelaçamento	Antagônica 3
<i>Trichoderma harzianum</i>	Invasão	Antagônica 1
<i>Trichoderma viride</i>	Não agressão	Antagônica 1
<i>Trichothecium roseum</i>	Não agressão	Neutra

\* Os experimentos foram realizados em triplicata, com incubação a 28° C.

\*\* Tipos de interação observados entre os fungos toxigênicos e os outros fungos estudados, em relação ao crescimento das colônias, de acordo com as classes propostas.

# Tipos de interação observados entre os fungos toxigênicos e os outros fungos estudados, em relação a produção de toxina, de acordo com as classes propostas.

TABELA 9 - Ação dos Fungos Estudados no Desenvolvimento de *Aspergillus ochraceus* em CAM de Acordo com as Classes de Interação Propostas.\*

MICROORGANISMO	AÇÃO SOBRE CRESCIMENTO**	AÇÃO SOBRE PRODUÇÃO OT#
<i>Absidia repens</i> NRRL 1336	Invasão inversa	Neutra
<i>Aspergillus candidus</i>	invasão inversa	Neutra
<i>Aspergillus chevalieri</i>	Não agressão	Antagônica 1
<i>Aspergillus deflectus</i>	Invasão inversa	Antagônica 1
<i>Aspergillus heteromorphus</i>	Não agressão	Neutra
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 6411	Não agressão	Antagônica 4
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642	Não agressão	Antagônica 4
<i>Aspergillus niger</i>	Não agressão	Antagônica 4
<i>Aspergillus terreus</i>	Não agressão	Neutra
<i>Aspergillus versicolor</i> ATCC 11730	Não agressão	Antagônica 1
<i>Cladosporium</i> sp 1	Invasão inversa	Neutra
<i>Cladosporium</i> sp 2	Invasão inversa	Neutra
<i>Cladosporium</i> sp 3	Invasão inversa	Neutra
<i>Monodictis castaneae</i>	Não agressão	Antagônica 1
<i>Mucor griseo-cyanus</i> NRRL 3359	Invasão inversa	Neutra
<i>Mucor racemosus</i>	Invasão inversa	Antagônica 1
<i>Paecilomyces variotii</i>	Invasão inversa	Antagônica 1
<i>Penicillium funiculosum</i> NRRL 11797	Não agressão	Antagônica 1
<i>Penicillium raistrickii</i> NRRL 2038	Invasão inversa	Neutra
<i>Rhizopus arrhizus</i> NRRL 2582	Invasão	Neutra
<i>Rhizopus microsporus</i>	Entrelaçamento	Antagônica 1
<i>Trichoderma harzianum</i>	Invasão	Antagônica 1
<i>Trichoderma viride</i>	Não agressão	Antagônica 1
<i>Trichothecium roseum</i>	Não agressão	Antagônica 1

\* Os experimentos foram realizados em triplicata, com incubação a 28° C.

\*\* Tipos de interação observados entre os fungos toxigênicos e os outros fungos estudados, em relação ao crescimento das colônias, de acordo com as classes propostas.

# Tipos de interação observados entre os fungos toxigênicos e os outros fungos estudados, em relação a produção de toxina, de acordo com as classes propostas.

TABELA 10- Ação dos Fungos Estudados no Desenvolvimento de *Aspergillus sclerotiorum* NRRL 5170 em CAM de acordo com as Classes de Interação Propostas. #

MICROORGANISMO	AÇÃO SOBRE CRESCIMENTO**	AÇÃO SOBRE PRODUÇÃO OT#
<i>Absidia repens</i> NRRL 1336	Invasão inversa	Neutra
<i>Aspergillus candidus</i>	Não agressão	Antagônica 1
<i>Aspergillus chevalieri</i>	Invasão inversa	Antagônica 1
<i>Aspergillus deflectus</i>	Não agressão	Neutra
<i>Aspergillus heteromorphus</i>	Invasão	Antagônica 3
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 6411	Não agressão	Antagônica 4
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642	Não agressão	Antagônica 4
<i>Aspergillus niger</i>	Não agressão	Antagônica 4
<i>Aspergillus terreus</i>	Não agressão	Neutra
<i>Aspergillus versicolor</i> ATCC 11730	Invasão inversa	Antagônica 1
<i>Cladosporium</i> sp 1	Invasão inversa	Neutra
<i>Cladosporium</i> sp 2	Invasão inversa	Neutra
<i>Cladosporium</i> sp 3	Invasão inversa	Neutra
<i>Monodyctis castaneae</i>	Não agressão	Antagônica 1
<i>Mucor griseo-cyanus</i> NRRL 3359	Invasão inversa	Neutra
<i>Mucor racemosus</i>	Invasão inversa	Antagônica 1
<i>Paecilomyces variotii</i>	Invasão inversa	Antagônica 3
<i>Penicillium funiculosum</i> NRRL 11797	Não agressão	Antagônica 1
<i>Penicillium raistrickii</i> NRRL 2038	Invasão inversa	Neutra
<i>Rhizopus arrhizus</i> NRRL 2582	Invasão	Antagônica 3
<i>Rhizopus microsporus</i>	Entrelaçamento	Antagônica 3
<i>Trichoderma harzianum</i>	Não agressão	Antagônica 1
<i>Trichoderma viride</i>	Não agressão	Antagônica 1
<i>Trichothecium roseum</i>	Não agressão	Antagônica 2

\* Os experimentos foram realizados em triplicata, com incubação a 28° C.

\*\* Tipos de interação observados entre os fungos toxigênicos e os outros fungos estudados, em relação ao crescimento das colônias, de acordo com as classes propostas.

# Tipos de interação observados entre os fungos toxigênicos e os outros fungos estudados, em relação a produção de toxina, de acordo com as classes propostas.

TABELA 11- Ação dos Fungos Estudados no Desenvolvimento de *Aspergillus sulphureus* NRRL 4077 em CAM de acordo com as Classes de Interação Propostas.\*

MICROORGANISMO	AÇÃO SOBRE CRESCIMENTO**	AÇÃO SOBRE PRODUÇÃO DT#
<i>Absidia repens</i> NRRL 1336	Invasão inversa	Neutra
<i>Aspergillus candidus</i>	Não agressão	Antagônica 1
<i>Aspergillus chevalieri</i>	Invasão inversa	Antagônica 1
<i>Aspergillus deflectus</i>	Invasão inversa	Neutra
<i>Aspergillus heteromorphus</i>	Invasão	Antagônica 3
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 6411	Não agressão	Antagônica 4
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642	Não agressão	Antagônica 4
<i>Aspergillus niger</i>	Não agressão	Antagônica 4
<i>Aspergillus terreus</i>	Não agressão	Neutra
<i>Aspergillus versicolor</i> ATCC 11730	Invasão inversa	Antagônica 1
<i>Cladosporium</i> sp 1	Invasão inversa	Neutra
<i>Cladosporium</i> sp 2	Invasão inversa	Neutra
<i>Cladosporium</i> sp 3	Invasão inversa	Neutra
<i>Monodyctis castaneae</i>	Não agressão	Antagônica 1
<i>Mucor griseo-cyanus</i> NRRL 3359	Invasão inversa	Neutra
<i>Mucor racemosus</i>	Invasão inversa	Neutra
<i>Paecilomyces variotii</i>	Invasão inversa	Antagônica 3
<i>Penicillium funiculosum</i> NRRL 11797	Não agressão	Antagônica 1
<i>Penicillium raistrickii</i> NRRL 2038	Invasão inversa	Neutra
<i>Rhizopus arrhizus</i> NRRL 2582	Invasão	Antagônica 3
<i>Rhizopus microsporus</i>	Entrelaçamento	Antagônica 3
<i>Trichoderma harzianum</i>	Não agressão	Antagônica 1
<i>Trichoderma viride</i>	Não agressão	Antagônica 1
<i>Trichothecium roseum</i>	Não agressão	Neutra

- \* Os experimentos foram realizados em triplicata, com incubação a 28° C.
- \*\* Tipos de interação observados entre os fungos toxigênicos e os outros fungos estudados, em relação ao crescimento das colônias, de acordo com as classes propostas.
- # Tipos de interação observados entre os fungos toxigênicos e os outros fungos estudados, em relação a produção de toxina, de acordo com as classes propostas.

TABELA 12- Desenvolvimento dos Fungos Ocratoxigênicos em Meio Líquido (YES) em 12 Dias de Incubação a 28° C. #

MICROORGANISMO	pH			PESO SECO**	OTA***	
	INICIAL	7º d	12ºd		6ºd	12ºd
A. alliaceus NRRL 317	6,9	6,0	6,8	0,64	1000	1000
A. melleus NRRL 3519	6,9	6,7	7,9	0,55	100	50
A. ochraceus NRRL 3174	6,9	5,9	8,3	0,62	50	50
A. ochraceus	6,9	6,1	8,6	0,46	5	50
A. sclerotiorum NRRL 5170	6,9	6,6	7,3	0,86	500	250
A. sulphureus NRRL 4077	6,9	7,2	8,3	0,57	ND	500

\* Os valores representam a média de experimentos em triplicata

\*\* g de micélio/50 ml de meio de cultura.

\*\*\* µg de OTA/50 ml de meio de cultura. ND = toxina não detectada pelo método utilizado

TABELA 13- Desenvolvimento dos Fungos Antagonistas em Meio Líquido (YES) em 15 Dias de Incubação a 28° C. #

MICROORGANISMO	INICIAL	pH		PESO SECO*
		7º d	15ºd	
A. candidus	6,8	6,7	8,6	0,70
A. chevalieiri	6,8	6,5	7,5	0,58
A. heteromorphus	6,8	5,3	7,8	0,74
A. niger NRRL 6411	6,8	2,4	3,1	0,76
A. niger ATCC 9642	6,8	4,1	5,2	0,40
A. niger	6,8	3,4	4,1	0,63
A.versicolor ATCC 11730	6,8	7,5	8,7	0,51
M. castane	6,8	5,5	6,3	0,70
Mucor racemosus	6,8	5,9	7,1	0,12
P. variotii	6,8	7,5	7,9	0,12
P. funiculosum ATCC 11797	6,8	4,9	8,2	0,40
R. arrhizus NRRL 2582	6,8	7,9	7,9	0,52
R. microsporum	6,8	8,0	8,0	0,23
T. harzianum	6,8	5,7	7,7	0,58
T. viride	6,8	6,0	7,8	0,65
T. roseum	6,8	8,1	8,4	0,73

# Os valores representam a média de experimentos em triplicata  
 \* g de micélio/50 ml de meio de cultura



TABELA 14 - Determinação de Antagonismo em Meio Líquido  
1-Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas  
sobre o Desenvolvimento de *A. alliaceus*  
NRRL 317.\*

MICROORGANISMO		pH INICIAL	PESO SECO**	OTA***	
				6º d	12ºd
CONTROLE		6,9	0,64	1000	1000
<i>A. candidus</i>	NT#	6,2	0,38	5	5
	TT	5,1	0,35	5	5
<i>A. chevalieri</i>	NT	6,3	0,37	75	50
	TT	6,2	0,43	50	50
<i>A. heteromorphus</i>	NT	4,9	0,32	ND	ND
	TT	5,0	0,31	ND	ND
<i>A. niger</i> NRRL 6411	NT	1,8	-	ND	ND
	TT	2,6	-	ND	ND
<i>A. niger</i> ATCC 9642	NT	3,4	0,25	ND	ND
	TT	3,5	0,24	ND	ND
<i>A. niger</i>	NT	3,0	-	ND	ND
	TT	3,1	-	ND	ND
<i>A. versicolor</i> ATCC 11730	NT	6,5	0,20	ND	ND
	TT	6,0	0,18	ND	ND
<i>M. castaneae</i>	NT	5,7	0,45	50	50
	TT	5,4	0,50	25	5
<i>M. racemosus</i>	NT	6,1	0,36	ND	ND
	TT	6,1	0,29	ND	ND
<i>P. variotii</i>	NT	5,2	0,43	250	100
	TT	5,2	0,33	100	100
<i>P. funiculosum</i> ATCC 11797	NT	5,7	0,50	500	250
	TT	5,4	0,52	500	50
<i>R. arrhizus</i> NRRL 2582	NT	7,9	0,59	500	100
	TT	8,5	0,58	500	500
<i>R. microsporus</i>	NT	7,9	0,48	500	100
	TT	8,4	0,45	500	50
<i>T. harzianum</i>	NT	7,7	0,75	500	100
	TT	8,2	0,62	500	100
<i>T. viride</i>	NT	6,3	0,18	25	ND
	TT	6,5	0,13	5	ND
<i>T. roseum</i>	NT	8,5	0,31	ND	ND
	TT	9,0	0,37	50	ND

\* Os valores representam a média de experimentos em triplicata  
\*\* g de micélio/50 ml de meio de cultura, em 12 dias de incubação a 28º C.

\*\*\* µg de OTA/50 ml de meio de cultura. ND = toxina não detectada pelo método utilizado.

# NT = filtrado, sem tratamento. TT = filtrado com tratamento térmico

TABELA 15 - Determinação de Antagonismo em Meio Líquido  
2-Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas  
sobre o Desenvolvimento de *A. melleus*  
NRRL 3519.\*

MICROORGANISMO		pH INICIAL	PESO SECO**	OTA***	
				6 <sup>o</sup> d	12 <sup>o</sup> d
CONTROLE		6,9	0,55	100	100
<i>A. candidus</i>	NT#	6,2	0,43	ND	ND
	TT	5,1	0,40	ND	ND
<i>A. chevalieri</i>	NT	6,3	0,32	ND	ND
	TT	6,2	0,37	ND	ND
<i>A. heteromorphus</i>	NT	4,9	0,24	ND	ND
	TT	5,0	0,24	ND	ND
<i>A. niger</i> NRRL 6411	NT	1,8	-	ND	ND
	TT	2,6	-	ND	ND
<i>A. niger</i> ATCC 9642	NT	3,4	0,15	ND	ND
	TT	3,5	0,11	ND	ND
<i>A. niger</i>	NT	3,0	-	ND	ND
	TT	3,1	-	ND	ND
<i>A. versicolor</i> ATCC 11730	NT	6,5	0,15	ND	ND
	TT	6,0	0,14	ND	ND
<i>M. castaneae</i>	NT	5,7	0,39	10	5
	TT	5,4	0,47	ND	5
<i>M. racemosus</i>	NT	6,1	0,25	ND	ND
	TT	6,1	0,21	ND	ND
<i>P. variotii</i>	NT	5,2	0,39	25	ND
	TT	5,2	0,30	10	ND
<i>P. funiculosum</i> ATCC 11797	NT	5,7	0,51	50	25
	TT	5,4	0,40	50	50
<i>R. arrhizus</i> NRRL 2582	NT	7,9	0,64	50	75
	TT	8,5	0,60	50	75
<i>R. microsporus</i>	NT	7,9	0,45	50	50
	TT	8,4	0,41	50	25
<i>T. harzianum</i>	NT	7,7	0,68	50	5
	TT	8,2	0,58	50	5
<i>T. viride</i>	NT	6,3	0,19	ND	ND
	TT	6,5	0,16	ND	ND
<i>T. roseum</i>	NT	8,5	0,31	ND	ND
	TT	9,0	0,14	ND	ND

\* Os valores representam a média de experimentos em triplicata  
\*\* g de micélio/50 ml de meio de cultura, em 12 dias de incubação a 28<sup>o</sup> C.

\*\*\* µg de OTA/50 ml de meio de cultura. ND = toxina não detectada pelo método utilizado.

# NT = filtrado, sem tratamento. TT = filtrado com tratamento térmico

TABELA 16 - Determinação de Antagonismo em Meio Líquido  
3-Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas  
sobre o Desenvolvimento de *A. ochraceus*  
NRRL 3174.\*

MICROORGANISMO		pH INICIAL	PESO SECO**	OTA***	
				6º d	12ºd
CONTROLE		6,9	0,62	50	5
<i>A. candidus</i>	NT#	6,2	0,47	ND	ND
	TT	5,1	0,48	ND	ND
<i>A. chevalieri</i>	NT	6,3	0,42	ND	ND
	TT	6,2	0,40	ND	ND
<i>A. heteromorphus</i>	NT	4,9	0,22	ND	ND
	TT	5,0	0,23	ND	ND
<i>A. niger</i> NRRL 6411	NT	1,8	-	ND	ND
	TT	2,6	0,05	ND	ND
<i>A. niger</i> ATCC 9642	NT	3,4	0,14	ND	ND
	TT	3,5	0,22	ND	ND
<i>A. niger</i>	NT	3,0	-	ND	ND
	TT	3,1	-	ND	ND
<i>A. versicolor</i> ATCC 11730	NT	6,5	0,15	ND	ND
	TT	6,0	0,14	ND	ND
<i>M. castaneae</i>	NT	5,7	0,43	ND	ND
	TT	5,4	0,42	ND	ND
<i>M. racemosus</i>	NT	6,1	0,29	ND	ND
	TT	6,1	0,18	ND	ND
<i>P. variotii</i>	NT	5,2	0,37	ND	5
	TT	5,2	0,27	5	5
<i>P. funiculosum</i> ATCC 11797	NT	5,7	0,53	ND	ND
	TT	5,4	0,54	ND	ND
<i>R. arrhizus</i> NRRL 2582	NT	7,9	0,68	5	ND
	TT	8,5	0,57	5	ND
<i>R. microsporus</i>	NT	7,9	0,46	ND	ND
	TT	8,4	0,42	ND	ND
<i>T. harzianum</i>	NT	7,7	0,67	5	ND
	TT	8,2	0,60	5	ND
<i>T. viride</i>	NT	6,3	0,15	ND	ND
	TT	6,5	0,14	ND	ND
<i>T. roseum</i>	NT	8,5	0,34	ND	ND
	TT	9,0	0,32	ND	ND

\* Os valores representam a média de experimentos em triplicata

\*\* g de micélio/50 ml de meio de cultura, em 12 dias de incubação a 28° C.

\*\*\* µg de OTA/50 ml de meio de cultura. ND = toxina não detectada pelo método utilizado.

# NT = filtrado, sem tratamento. TT = filtrado com tratamento térmico

TABELA 17 - Determinação de Antagonismo em Meio Líquido  
4-Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas  
sobre o Desenvolvimento de *A. ochraceus*.

MICROORGANISMO		pH INICIAL	PESO SECO**	OTA***	
				60 d	120d
CONTROLE		6,9	0,46	5	50
<i>A. candidus</i>	NT#	6,2	0,33	ND	ND
	TT	5,1	0,34	ND	ND
<i>A. chevalieri</i>	NT	6,3	0,38	ND	ND
	TT	6,2	0,34	ND	ND
<i>A. heteromorphus</i>	NT	4,9	0,20	ND	ND
	TT	5,0	0,22	ND	ND
<i>A. niger</i> NRRL 6411	NT	1,8	-	ND	ND
	TT	2,6	0,09	ND	ND
<i>A. niger</i> ATCC 9642	NT	3,4	0,16	ND	ND
	TT	3,5	0,17	ND	ND
<i>A. niger</i>	NT	3,0	-	ND	ND
	TT	3,1	-	ND	ND
<i>A. versicolor</i> ATCC 11730	NT	6,5	0,16	ND	ND
	TT	6,0	0,12	ND	ND
<i>M. castaneae</i>	NT	5,7	0,31	ND	ND
	TT	5,4	0,40	ND	ND
<i>M. racemosus</i>	NT	6,1	0,31	ND	ND
	TT	6,1	0,25	ND	ND
<i>P. variotii</i>	NT	5,2	0,35	ND	ND
	TT	5,2	0,18	ND	5
<i>P. funiculosum</i> ATCC 11797	NT	5,7	0,45	ND	50
	TT	5,4	0,48	ND	ND
<i>R. arrhizus</i> NRRL 2582	NT	7,9	0,54	ND	50
	TT	8,5	0,50	ND	50
<i>R. microsporus</i>	NT	7,9	0,39	ND	50
	TT	8,4	0,34	ND	50
<i>T. harzianum</i>	NT	7,7	0,60	5	50
	TT	8,2	0,51	ND	50
<i>T. viride</i>	NT	6,3	0,13	ND	ND
	TT	6,5	0,11	ND	ND
<i>T. roseum</i>	NT	8,5	0,31	ND	ND
	TT	9,0	0,32	ND	ND

\* Os valores representam a média de experimentos em triplicata

\*\* g de micélio/50 ml de meio de cultura, em 12 dias de incubação a 28° C.

\*\*\* µg de OTA/50 ml de meio de cultura. ND = toxina não detectada pelo método utilizado.

# NT = filtrado, sem tratamento. TT = filtrado com tratamento térmico

TABELA 18 - Determinação de Antagonismo em Meio Líquido  
5-Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas  
sobre o Desenvolvimento de *A. sclerotiorum*  
NRRL 5170.\*

MICROORGANISMO		pH INICIAL	PESO SECO**	OTA***	
				6º d	12ºd
CONTROLE		6,9	0,86	500	500
<i>A. candidus</i>	NT#	6,2	0,48	ND	ND
	TT	5,1	0,47	ND	ND
<i>A. chevalieri</i>	NT	6,3	0,40	ND	ND
	TT	6,2	0,49	ND	ND
<i>A. heteromorphus</i>	NT	4,9	0,30	ND	ND
	TT	5,0	0,32	ND	ND
<i>A. niger</i> NRRL 6411	NT	1,8	-	ND	ND
	TT	2,6	0,08	ND	ND
<i>A. niger</i> ATCC 9642	NT	3,4	0,23	ND	ND
	TT	3,5	0,21	ND	ND
<i>A. niger</i>	NT	3,0	-	ND	ND
	TT	3,1	-	ND	ND
<i>A. versicolor</i> ATCC 11730	NT	6,5	0,19	ND	ND
	TT	6,0	0,15	ND	ND
<i>M. castaneae</i>	NT	5,7	0,55	5	ND
	TT	5,4	0,53	5	ND
<i>M. racemosus</i>	NT	6,1	0,30	ND	ND
	TT	6,1	0,23	ND	ND
<i>P. variotii</i>	NT	5,2	0,40	ND	10
	TT	5,2	0,27	ND	10
<i>P. funiculosum</i> ATCC 11797	NT	5,7	0,66	500	100
	TT	5,4	0,62	500	50
<i>R. arrhizus</i> NRRL 2582	NT	7,9	0,72	500	250
	TT	8,5	0,74	500	100
<i>R. microsporus</i>	NT	7,9	0,57	500	50
	TT	8,4	0,45	500	50
<i>T. harzianum</i>	NT	7,7	0,84	500	50
	TT	8,2	0,73	500	50
<i>T. viride</i>	NT	6,3	0,20	ND	ND
	TT	6,5	0,12	ND	ND
<i>T. roseum</i>	NT	8,5	0,42	ND	ND
	TT	9,0	0,42	ND	ND

- \* Os valores representam a média de experimentos em triplicata  
 \*\* g de micélio/50 ml de meio de cultura, em 12 dias de incubação a 28º C.  
 \*\*\* µg de OTA/50 ml de meio de cultura. ND = toxina não detectada pelo método utilizado.  
 # NT = filtrado, sem tratamento. TT = filtrado com tratamento térmico

TABELA 19 - Determinação de Antagonismo em Meio Líquido  
6-Ação dos Filtrados de Culturas Antagonistas  
sobre o Desenvolvimento de *A. sulphureus*  
NRRL 4077.\*

MICROORGANISMO		pH INICIAL	PESO SECO**	OTA***	
				60 d	120d
CONTROLE		6,9	0,57	ND	500
<i>A. candidus</i>	NT#	6,2	0,37	ND	25
	TT	5,1	0,48	ND	12,5
<i>A. chevalieri</i>	NT	6,3	0,33	ND	ND
	TT	6,2	0,33	ND	ND
<i>A. heteromorphus</i>	NT	4,9	0,19	ND	ND
	TT	5,0	0,22	ND	10
<i>A. niger</i> NRRL 6411	NT	1,8	-	ND	ND
	TT	2,6	0,05	ND	ND
<i>A. niger</i> ATCC 9642	NT	3,4	0,16	ND	ND
	TT	3,5	0,09	ND	ND
<i>A. niger</i>	NT	3,0	-	ND	ND
	TT	3,1	-	ND	ND
<i>A. versicolor</i> ATCC 11730	NT	6,5	0,10	ND	ND
	TT	6,0	0,13	ND	ND
<i>M. castaneae</i>	NT	5,7	0,45	ND	10
	TT	5,4	0,48	ND	10
<i>M. racemosus</i>	NT	6,1	0,27	ND	ND
	TT	6,1	0,25	ND	ND
<i>P. variotii</i>	NT	5,2	0,36	ND	10
	TT	5,2	0,18	ND	10
<i>P. funiculosum</i> ATCC 11797	NT	5,7	0,50	ND	200
	TT	5,4	0,46	ND	50
<i>R. arrhizus</i> NRRL 2582	NT	7,9	0,67	ND	250
	TT	8,5	0,59	ND	250
<i>R. microsporus</i>	NT	7,9	0,38	ND	250
	TT	8,4	0,35	ND	250
<i>T. harzianum</i>	NT	7,7	0,81	ND	250
	TT	8,2	0,55	ND	250
<i>T. viride</i>	NT	6,3	0,14	ND	ND
	TT	6,5	0,13	ND	ND
<i>T. roseum</i>	NT	8,5	0,30	ND	ND
	TT	9,0	0,21	ND	ND

\* Os valores representam a média de experimentos em triplicata  
\*\* g de micélio/50 ml de meio de cultura, em 12 dias de incubação a 28° C.

\*\*\* µg de OTA/50 ml de meio de cultura. ND = toxina não detectada pelo método utilizado.

# NT = filtrado, sem tratamento. TT = filtrado com tratamento térmico

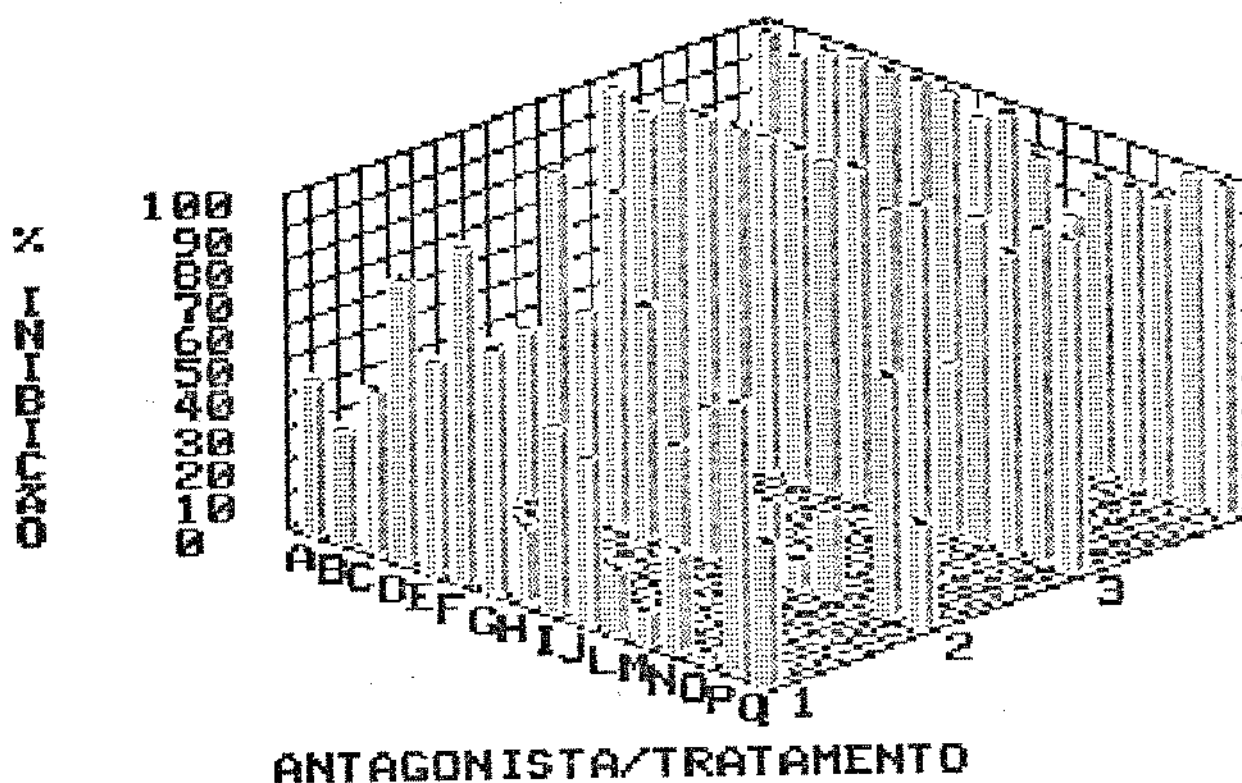


FIGURA 9 - AÇÃO DOS FILTRADOS DE CULTURAS ANTAGONISTAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *A. alliaceus* NRRL 317: Antagonistas - (A) *A. candidus*, (B) *A. chevalieri*, (C) *A. heteromorphus*, (D) *A. niger* NRRL 6411, (E) *A. niger* ATCC 9642, (F) *A. niger*, (G) *A. versicolor* ATCC 11730, (H) *M. castaneae*, (I) *M. racemosus*, (J) *P. variotii*, (L) *P. funiculosum* ATCC 11797, (M) *R. arrhizus* NRRL 2582, (N) *R. microsporus*, (O) *T. harzianum*, (P) *T. viride*, (Q) *T. roseum*; Tratamentos - (1) ação do filtrado com tratamento térmico sobre o crescimento, (2), ação do filtrado sem tratamento sobre o crescimento, (3) ação do filtrado com tratamento térmico sobre a produção de toxina, (4) ação do filtrado sem tratamento sobre a produção de toxina.

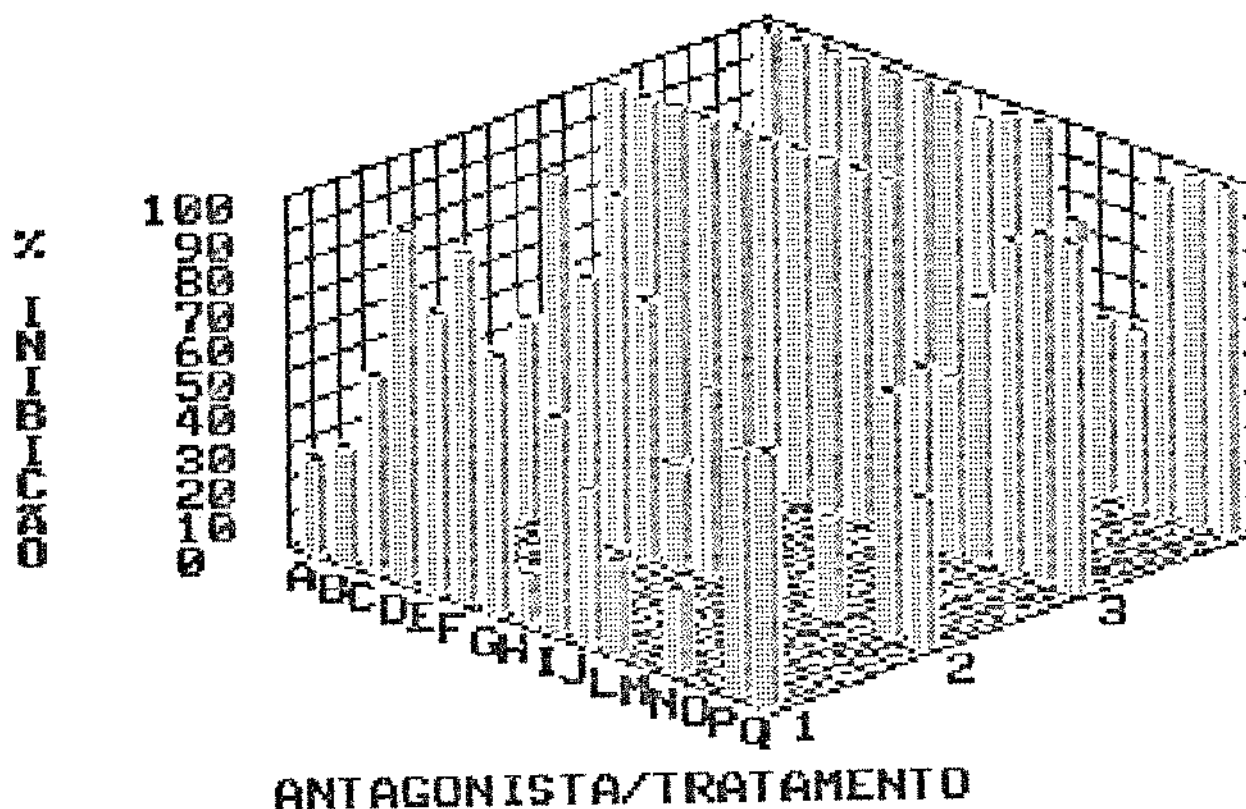


FIGURA 10- AÇÃO DOS FILTRADOS DE CULTURAS ANTAGONISTAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *A. melleus* NRRL 3519: Antagonistas - (A) *A. candidus*, (B) *A. chevalieri*, (C) *A. heteromorphus*, (D) *A. niger* NRRL 6411, (E) *A. niger* ATCC 9642, (F) *A. niger*, (G) *A. versicolor* ATCC 11730, (H) *M. castaneae*, (I) *M. racemosus*, (J) *P. variotii*, (L) *P. funiculosum* ATCC 11797, (M) *R. arrhizus* NRRL 2582, (N) *R. microsporus*, (O) *T. harzianum*, (P) *T. viride*, (Q) *T. roseum*  
 Tratamentos - (1) ação do filtrado com tratamento térmico sobre o crescimento, (2), ação do filtrado sem tratamento sobre o crescimento, (3) ação do filtrado com tratamento térmico sobre a produção de toxina, (4) ação do filtrado sem tratamento sobre a produção de toxina.



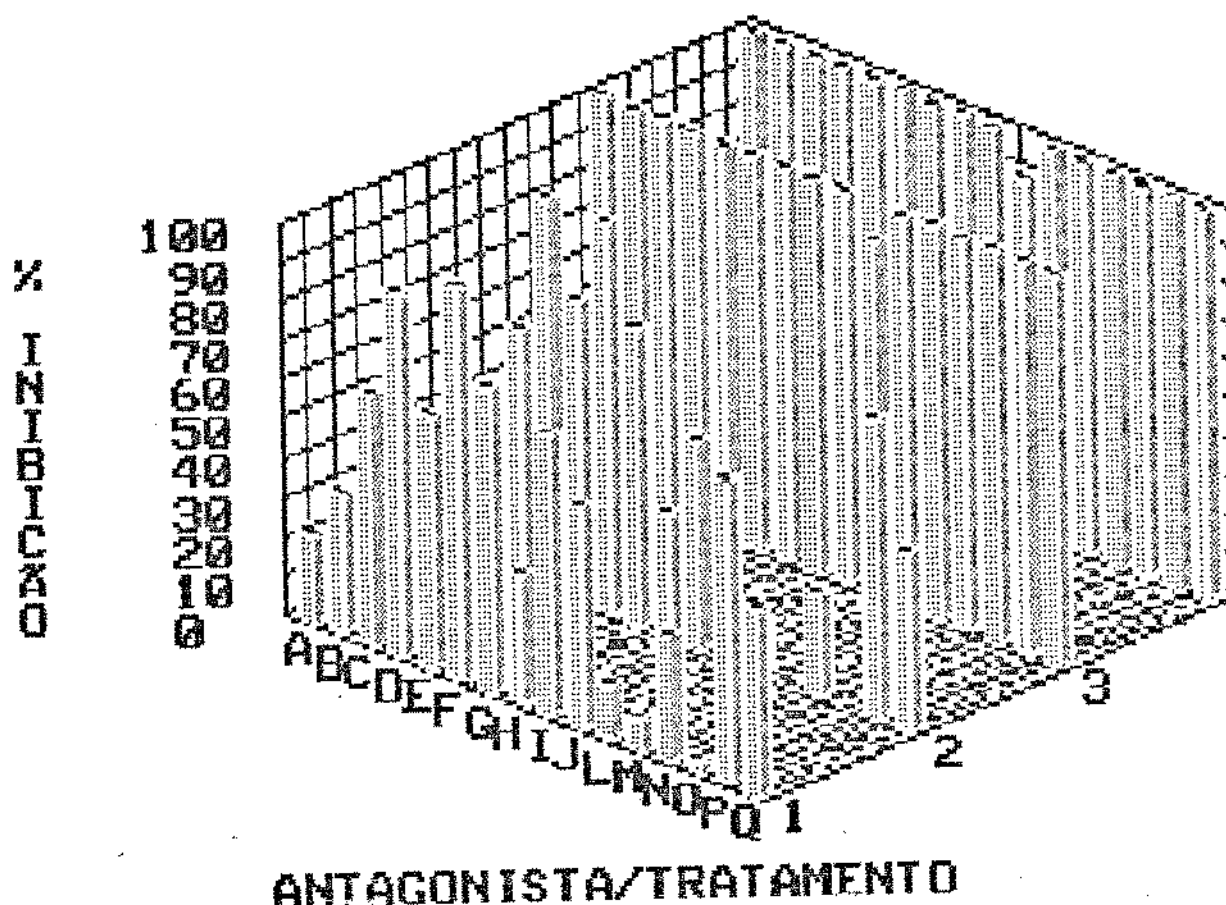


FIGURA 11 - AÇÃO DOS FILTRADOS DE CULTURAS ANTAGONISTAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *A. ochraceus* NRRL 3174: Antagonistas - (A) *A. candidus*, (B) *A. chevalieri*, (C) *A. heteromorphus*, (D) *A. niger* NRRL 6411, (E) *A. niger* ATCC 9642, (F) *A. niger*, (G) *A. versicolor* ATCC 11730, (H) *M. castaneae*, (I) *M. racemosus*, (J) *P. variotii*, (L) *P. funiculosum* ATCC 11797, (M) *R. arrhizus* NRRL 2582, (N) *R. microsporus*, (O) *T. harzianum*, (P) *T. viride*, (Q) *T. roseum* Tratamentos - (1) ação do filtrado com tratamento térmico sobre o crescimento, (2), ação do filtrado sem tratamento sobre o crescimento, (3) ação do filtrado com tratamento térmico sobre a produção de toxina, (4) ação do filtrado sem tratamento sobre a produção de toxina.

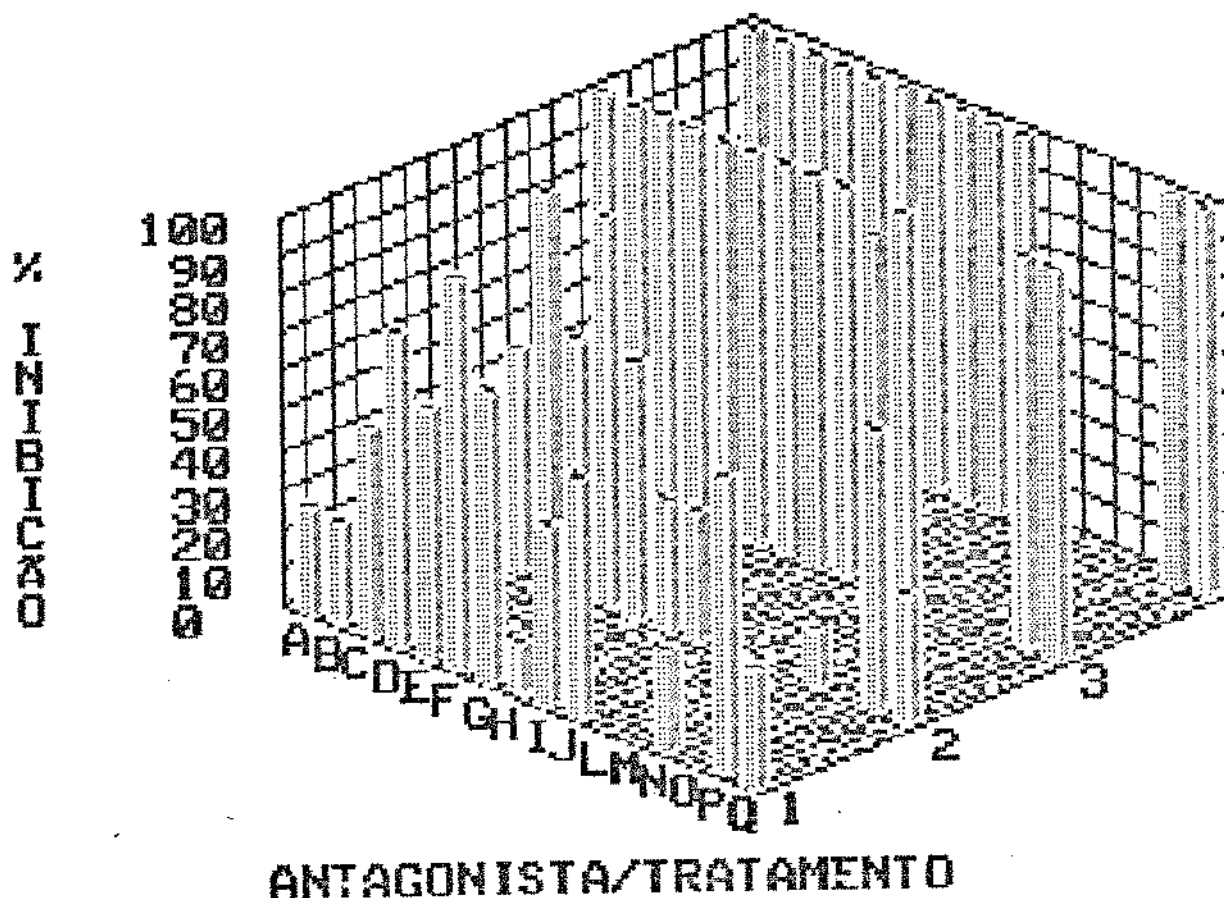


FIGURA 12 - AÇÃO DOS FILTRADOS DE CULTURAS ANTAGONISTAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *A. ochraceus*: Antagonistas - (A) *A. candidus*, (B) *A. chevalieri*, (C) *A. heteromorphus*, (D) *A. niger* NRRL 6411, (E) *A. niger* ATCC 9642, (F) *A. niger*, (G) *A. versicolor* ATCC 11730, (H) *M. castaneae*, (I) *M. racemosus*, (J) *P. variotii*, (L) *P. funiculosum* ATCC 11797, (M) *R. arrhizus* NRRL 2582, (N) *R. microsporus*, (O) *T. harzianum*, (P) *T. viride*, (Q) *T. roseum*; Tratamentos - (1) ação do filtrado com tratamento térmico sobre o crescimento, (2), ação do filtrado sem tratamento sobre o crescimento, (3) ação do filtrado com tratamento térmico sobre a produção de toxina, (4) ação do filtrado sem tratamento sobre a produção de toxina.

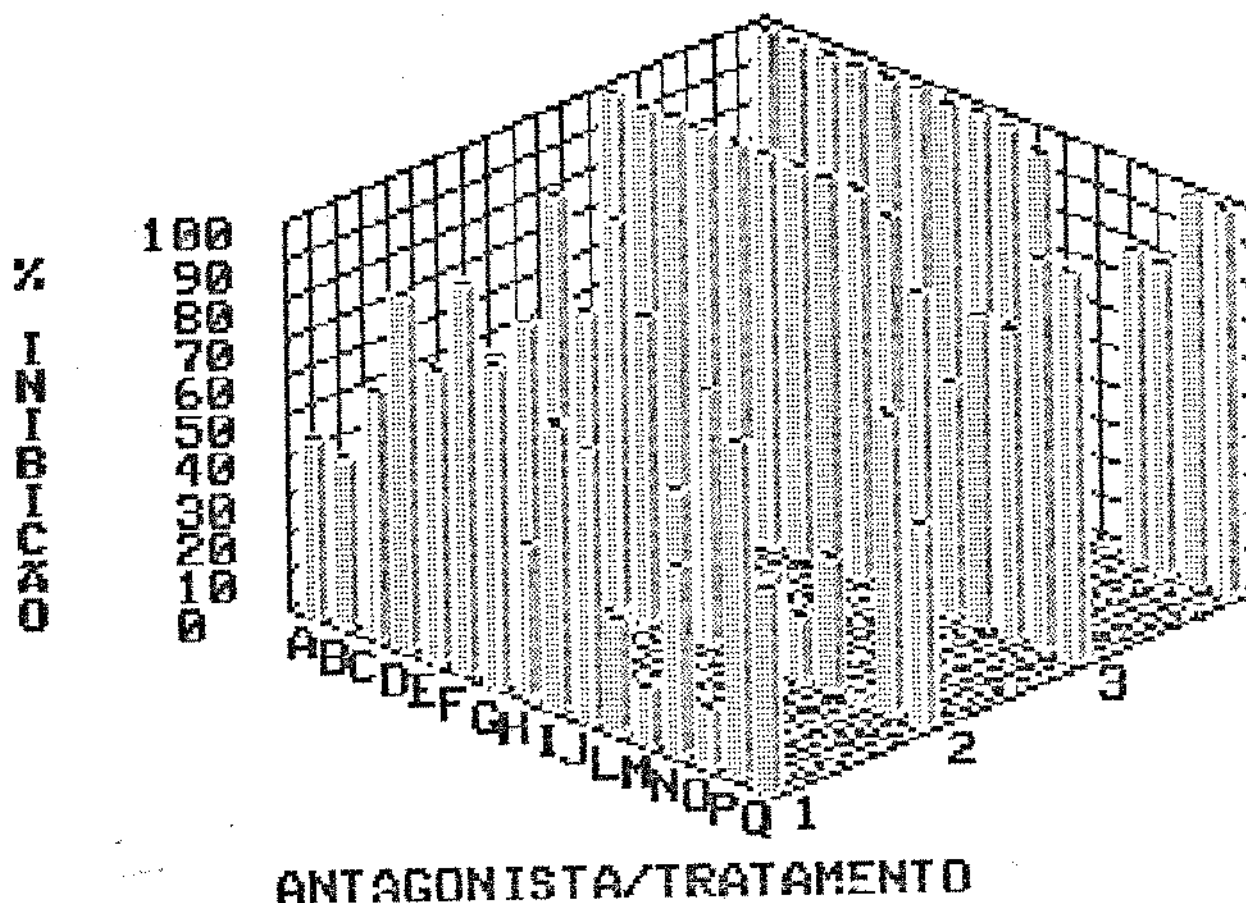


FIGURA 13 - AÇÃO DOS FILTRADOS DE CULTURAS ANTAGONISTAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *A. sclerotiorum* NRRL 5170: Antagonistas - (A) *A. candidus*, (B) *A. chevalieri*, (C) *A. heteromorphus*, (D) *A. niger* NRRL 6411, (E) *A. niger* ATCC 9642, (F) *A. niger*, (G) *A. versicolor* ATCC 11730, (H) *M. castaneae*, (I) *M. racemosus*, (J) *P. variotii*, (L) *P. funiculosum* ATCC 11797, (M) *R. arrhizus* NRRL 2582, (N) *R. microsporus*, (O) *T. harzianum*, (P) *T. viride*, (Q) *T. roseum* Tratamentos - (1) ação do filtrado com tratamento térmico sobre o crescimento, (2), ação do filtrado sem tratamento sobre o crescimento, (3) ação do filtrado com tratamento térmico sobre a produção de toxina, (4) ação do filtrado sem tratamento sobre a produção de toxina.

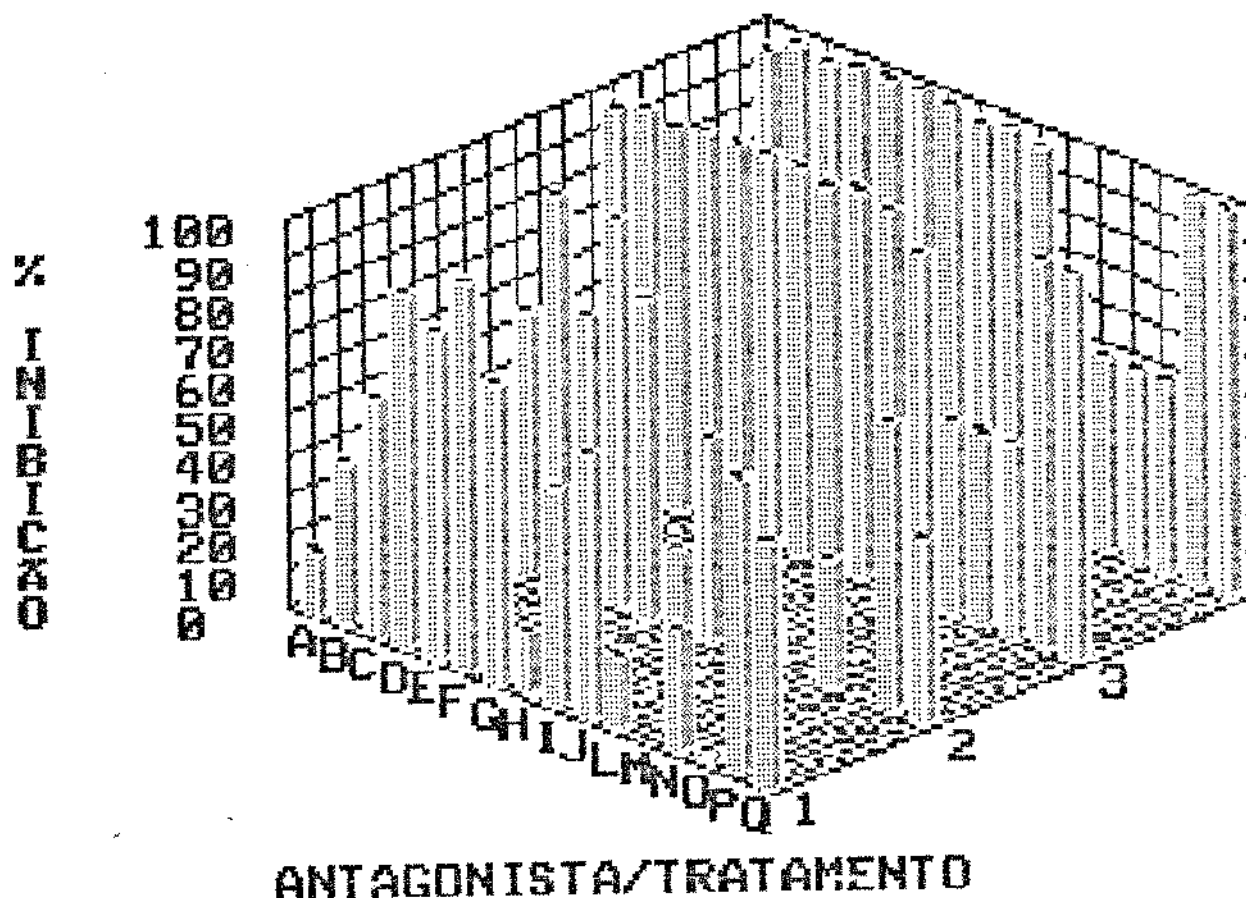


FIGURA 14 - AÇÃO DOS FILTRADOS DE CULTURAS ANTAGONISTAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *A. sulphureus* NRRL 4077; Antagonistas - (A) *A. candidus*, (B) *A. chevalieri*, (C) *A. heteromorphus*, (D) *A. niger* NRRL 6411, (E) *A. niger* ATCC 9642, (F) *A. niger*, (G) *A. versicolor* ATCC 11730, (H) *M. castaneae*, (I) *M. racemosus*, (J) *P. variotii*, (L) *P. funiculosum* ATCC 11797, (M) *R. arrhizus* NRRL 2582, (N) *R. microsporus*, (O) *T. harzianum*, (P) *T. viride*, (Q) *T. roseum* Tratamentos - (1) ação do filtrado com tratamento térmico sobre o crescimento, (2), ação do filtrado sem tratamento sobre o crescimento, (3) ação do filtrado com tratamento térmico sobre a produção de toxina, (4) ação do filtrado sem tratamento sobre a produção de toxina.

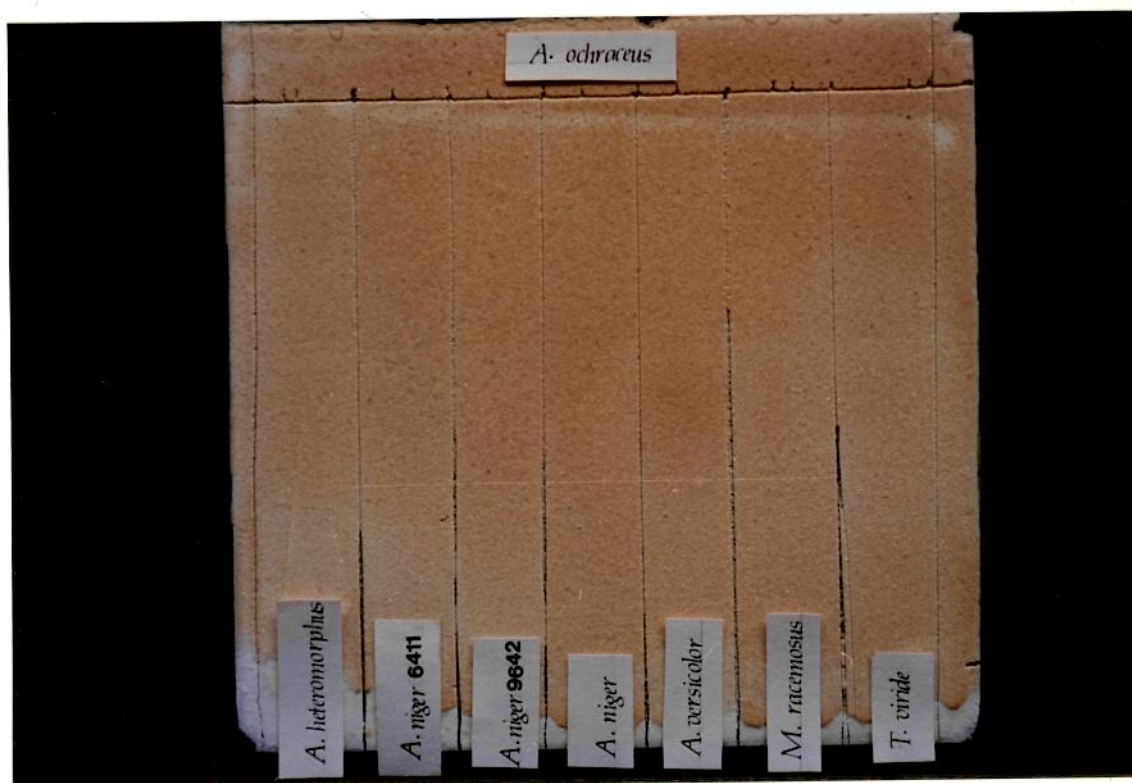


FIGURA 15 - BIOAUTOGRAFIA DE *Aspergillus ochraceus* SOBRE CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DOS FILTRADOS ANTAGONISTAS: Aspecto de *A. ochraceus* cultivado por 12 dias a temperatura ambiente e umidade relativa de 93%, sobre a CCD dos filtrados de cultura de *Aspergillus heteromorphus*, *A. niger* NRRL 6411, *A. niger* ATCC 9642, *A. niger*, *A. versicolor* ATCC 11730, *Mucor racemosus* e *Trichoderma viride* (da esquerda para a direita).

TABELA 20 - Desenvolvimento dos Fungos Ocratoxigênicos em Meio Líquido (YES) com pH Alcalino, em 12 dias de Incubação a 28° C.\*

MICRORGANISMO	INICIAL	pH*		PESO SECO**	OTA***	
		6 <sup>o</sup> d	12 <sup>o</sup> d		6 <sup>o</sup> d	12 <sup>o</sup> d
A. alliaceus NRRL 317	8,1	6,7	7,3	0,67	500	500
A. melleus NRRL 5170	8,1	7,6	8,3	0,54	50	50
A. ochraceus NRRL 3174	8,1	7,5	8,4	0,57	5	ND
A. ochraceus	8,1	7,7	8,5	0,46	ND	50
A. sclerotiorum NRRL 5170	8,1	6,7	7,0	0,78	500	50
A. sulphureus NRRL 4077	8,1	7,2	7,9	0,70	ND	250

- \* Os valores representam a média de experimentos em triplicata  
 \*\* g de micélio/50 ml de meio de cultura, em 12 dias de incubação a 28° C.  
 \*\*\* µg de OTA/50 ml de meio de cultura. ND = toxina não detectada pelo método utilizado

TABELA 21 - Desenvolvimento dos Fungos Ocratoxigênicos em Meio Líquido (YES) com pH Acido, em 12 dias de Incubação a 28° C.\*

MICROORGANISMO	pH INICIAL	pH		PESO SECO**	OTA***	
		6ºd	12ºd		6º d	12ºd
A. alliaceus NRRL 317	2,4	2,5	2,5	0,33	ND	ND
A. melleus NRRL 3519	2,4	2,5	2,5	-	ND	ND
A. ochraceus NRRL 3174	2,4	2,5	2,5	-	ND	ND
A. ochraceus	2,4	2,5	2,5	-	ND	ND
A. sclerotiorum NRRL 5170	2,4	2,5	2,5	-	ND	ND
A. sulphureus NRRL 4077	2,4	2,5	2,5	-	ND	ND

- \* Os valores representam a média de experimentos em triplicata  
 \*\* g de micélio/50 ml de meio de cultura, em 12 dias de incubação a 28° C.  
 \*\*\* µg de OTA/50 ml de meio de cultura. ND = toxina não detectada pelo método utilizado

## CRESCIMENTO DOS FUNGOS TOXIGÊNICOS

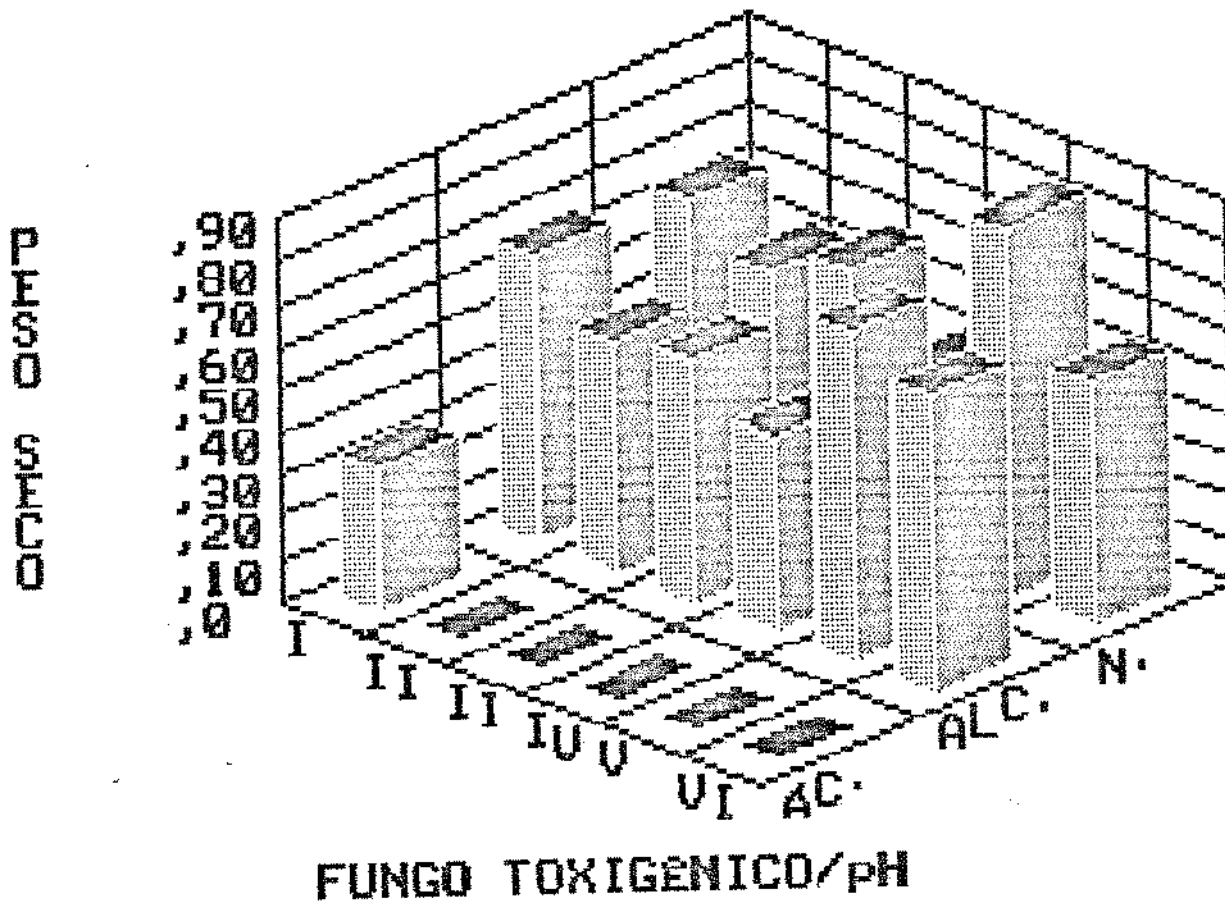


FIGURA 16 - DESENVOLVIMENTO DOS FUNGOS OCRATOXIGÊNICOS EM DIFERENTES pHs - (I) *A. alliaceus* NRRL 317, (II) *A. melleus* NRRL 3519, (III) *A. ochraceus* NRRL 3174, (IV) *A. ochraceus*, (V) *A. sclerotiorum* NRRL 5170, (VI) *A. sulphureus* NRRL 4077



# PRODUÇÃO DE TOXINA - 6<sup>o</sup> d

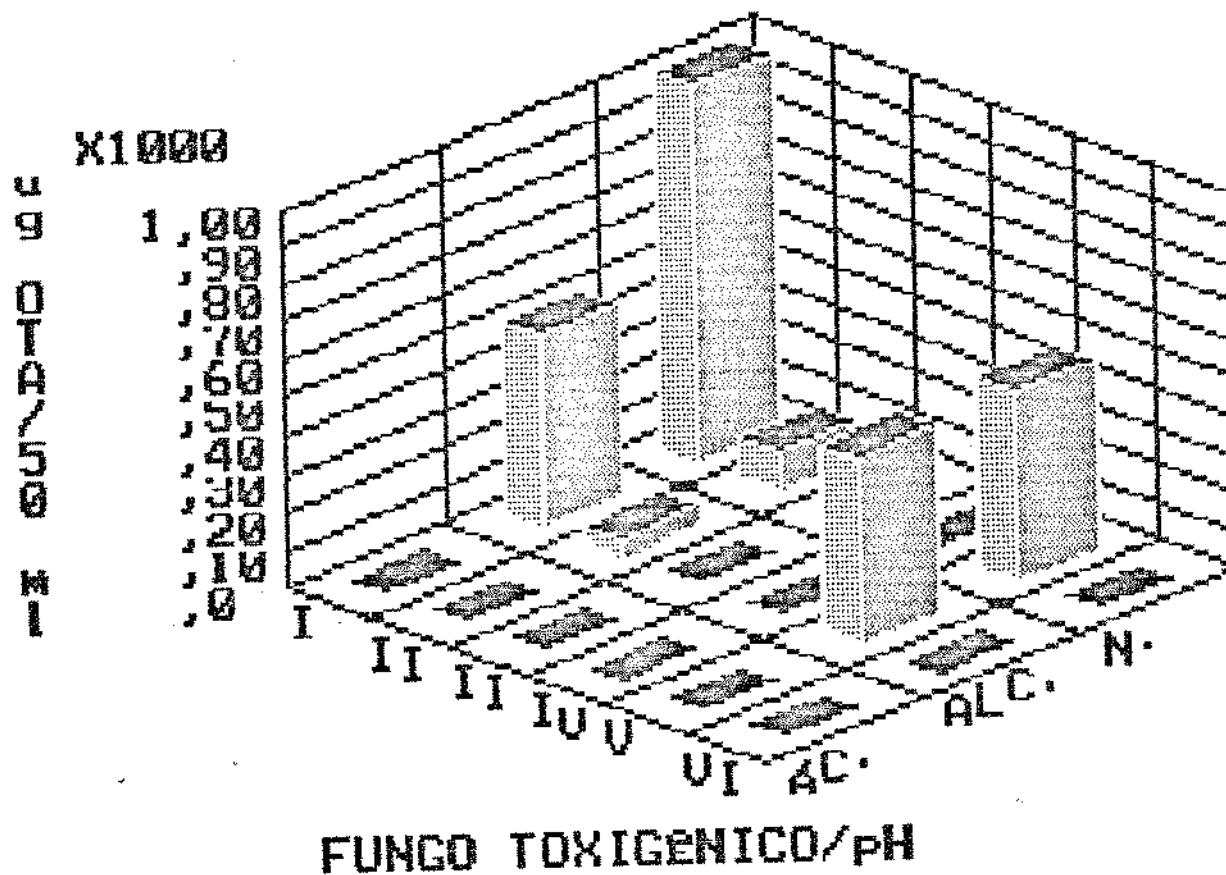


FIGURA 17 - DESENVOLVIMENTO DOS FUNGOS OCHRATOXIGENICOS EM DIFERENTES pHs - (I) *A. alliaceus* NRRL 317, (II) *A. melleus* NRRL 3519, (III) *A. ochraceus* NRRL 3174, (IV) *A. ochraceus*, (V) *A. sclerotiorum* NRRL 5170, (VI) *A. sulphureus* NRRL 4077



TABELA 22 - Desenvolvimento dos Fungos Ocratoxigênicos nos Filtrados de Cultura dos Fungos do Grupo *A. niger* com pH Corrigido para 6,7.\*

FILTRADO	MICROORGANISMO	PESO SECO**	OT***	
			6 <sup>o</sup> d	12 <sup>o</sup> d
<i>A. niger</i> NRRL 6411	<i>A. alliaceus</i> NRRL 317	0,15	ND	ND
	<i>A. melleus</i> NRRL 3519	0,15	ND	ND
	<i>A. ochraceus</i> NRRL 3174	0,16	ND	ND
	<i>A. ochraceus</i>	0,14	ND	ND
	<i>A. sclerotiorum</i> NRRL 5170	0,12	ND	ND
	<i>A. sulphureus</i> NRRL 4077	0,18	ND	ND
<i>A. niger</i> ATCC 9642	<i>A. alliaceus</i> NRRL 317	0,22	ND	ND
	<i>A. melleus</i> NRRL 3519	0,17	ND	ND
	<i>A. ochraceus</i> NRRL 3174	0,18	ND	ND
	<i>A. ochraceus</i>	0,15	ND	ND
	<i>A. sclerotiorum</i> NRRL 5170	0,17	ND	ND
	<i>A. sulphureus</i> NRRL 4077	0,15	ND	ND
<i>A. niger</i>	<i>A. alliaceus</i> NRRL 317	0,16	ND	ND
	<i>A. melleus</i> NRRL 3519	0,13	ND	ND
	<i>A. ochraceus</i> NRRL 3174	0,15	ND	ND
	<i>A. ochraceus</i>	0,14	ND	ND
	<i>A. sclerotiorum</i> NRRL 5170	0,13	ND	ND
	<i>A. sulphureus</i> NRRL 4077	0,14	ND	ND

- \* Os valores representam a média de experimentos em triplicata  
 \*\* g de micélio/50 ml de meio de cultura, em 12 dias de incubação a 28<sup>o</sup> C.  
 \*\*\* µg de OTA/50 ml de meio de cultura. ND = toxina não detectada pelo método utilizado

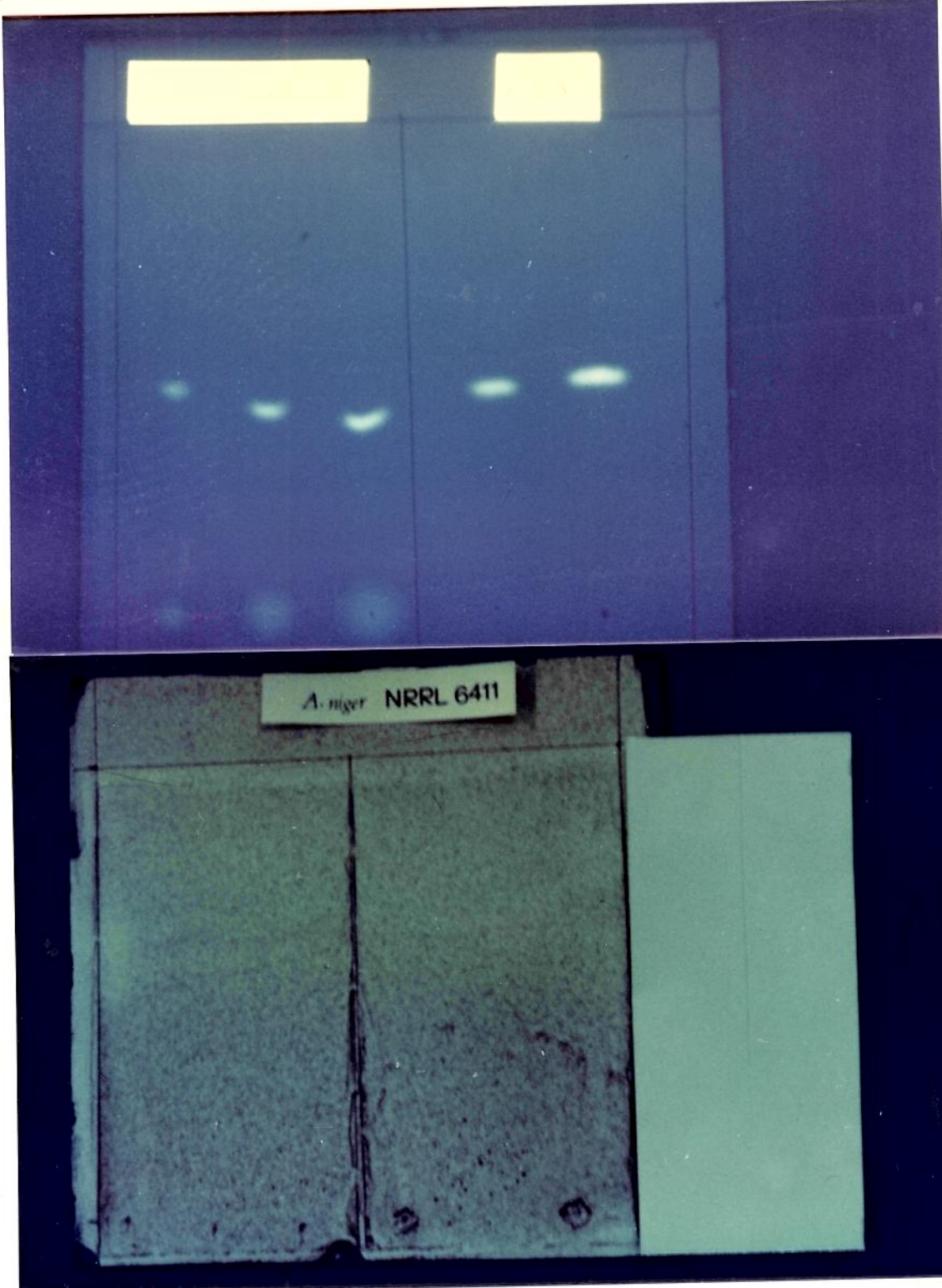


FIGURA 19 - BIOAUTOGRAFIA DE *Aspergillus niger* NRRL 6411 SOBRE CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DO FILTRADO DE *Aspergillus alliaceus* NRRL 317: Aspecto da CCD controle, sem inoculação, contendo 10, 25 e 100  $\mu$ l do filtrado de cultura de *A. alliaceus* NRRL 317 (metade esquerda da placa) e 50 e 100  $\mu$ l do padrão de OTA (metade direita da placa) (acima); aspecto de *A. niger* NRRL 6411 cultivado por 12 dias a temperatura ambiente e umidade relativa de 93%, sobre CCD do filtrado de cultura de *A. alliaceus* NRRL 317, com uma placa não inoculada, a direita, para comparação (abaixo). OBS: As fotos foram realizadas sob luz UV.

## DISCUSSÃO

Apesar de ter sido realizado um levantamento utilizando-se vários possíveis substratos, a presença de fungos do grupo *A. ochraceus* em alimentos revelou-se restrita, tendo sido isoladas apenas 15 cepas, presentes nas amostras de amêndoa, cevada, feijão e trigo. Dados de levantamentos realizados por outros pesquisadores brasileiros também demonstraram pouca incidência destes microrganismos. Bastos (10) realizando levantamento em amostras de 200 sementes/alimento, isolou 21 cepas do grupo *A. ochraceus*, sendo uma de guaraná, 3 de feijão preto e 17 de café, das quais 15 foram produtoras de ocratoxina A. Em amostras de amendoim, arroz com casca, feijão manteiga, grão de bico, milho, soja, sorgo e trigo, não se observou presença dos microrganismos. Mendes (90) observou que a contaminação pelos fungos em questão representa 7% da contaminação fúngica total em amostras de feijão, 3,6% em castanha do pará e 1,9% em amendoim. Esses dados, embora não façam parte de um levantamento em larga escala, parecem indicar que, no Brasil, a contaminação de alimentos pelos fungos do grupo *A. ochraceus* se dá em baixos níveis.

Em relação aos outros microrganismos encontrados neste levantamento, as espécies constatadas geralmente pertencem àquelas dominantes em alimentos armazenados (18, 88)

Para se ter uma idéia mais provável de como ocorrem as interações entre os diferentes microrganismos na colonização de sementes e grãos durante o armazenamento, os experimentos iniciais foram realizados em meio de cultura sólido. A escolha

de CAM para estes experimentos foi devido a suas características de meio diferencial, já que além das observações à respeito das interações entre as colônias, o meio permite também rápida detecção de qualquer alteração na intensidade ou coloração da fluorescência característica produzida pelos fungos ocratoxigênicos, indicando possível degradação da toxina, ou interferência na biossíntese da mesma.

A metodologia proposta por Wicklow (137) para o estudo de competição entre ascomycetos, foi bastante adequada, entretanto, a ampla faixa de taxas de crescimento verificada para os microrganismos utilizados neste estudo (de 2,08 a 15,25 mm/dia), motivou uma modificação no método, isto é, o emprego de uma distância alternativa de 30 mm entre os pares de fungos, juntamente com a distância de 50 mm proposta por Wicklow, afim de que, nos casos em que ambos fossem de crescimento lento, o encontro das duas colônias no centro da placa ocorresse dentro dos 15 dias de incubação, evitando ainda a desidratação do meio de cultura. Foi necessário a utilização de um sistema de classificação diferente do proposto por Wicklow, para que se definissem melhor os tipos de reações entre as colônias, aqui observadas.

Comparando-se o desenvolvimento *in vitro* dos microrganismos toxigênicos neste trabalho com resultados obtidos por outros pesquisadores em condições semelhantes, para a linhagem *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174, a mais comumente utilizada nos experimentos envolvendo ocratoxina A, obteve-se 1 µg OTA/ml de YES em 12 dias de incubação; Sansing et al. (116) obtiveram 188 µg OTA/ml de YES em 8 dias de incubação e Lillehoj

et al. (82), 27  $\mu$ g OTA/ml de YES em 8 dias de incubação. O desenvolvimento micelial, não mostrou diferença tão acentuada: 0,01 g de micélio/ml de YES obtidos neste estudo, contra 0,02 g de micélio/ml de YES obtidos por Sansing et al. Para as linhagens *Aspergillus sclerotiorum* NRRL 5170 e *Aspergillus sulphureus* NRRL 4077, Lillehoj et al. (82) obtiveram, respectivamente, traços e 21  $\mu$ g OTA/ml de YES, enquanto neste estudo foram obtidos 10  $\mu$ g OTA/ml de YES para as duas linhagens. Para se explicar tamanha variabilidade de resultados é necessário considerar três aspectos. As condições de experimentação nunca são exatamente as mesmas de um laboratório para outro, diferenças no desempenho dos aparelhos, nas marcas e lotes de fabricação dos reagentes, e a própria rotina de funcionamento de um laboratório, podem influir no resultado final. O segundo aspecto, é a limitação do método de quantificação por comparação visual, que depende muito da acuidade visual dos analistas para a detecção de sutis diferenças nas intensidades de fluorescência, e da precisão com que as quantidades de padrão e amostra são aplicadas à placa cromatográfica, já que se está trabalhando com quantidades extremamente pequenas. Finalmente, é conhecido o fato de que a transferência sucessiva de linhagens em meios sintéticos, muitas vezes altera suas características morfológicas e fisiológicas, diminuindo a capacidade de produzir metabólitos secundários (53).

Ainda em relação à produção de toxina, as manchas de fluorescência azul com Rfs entre 0,30 e 0,40 constatadas nas CCDs dos filtrados das culturas toxigênicas, referem-se,

provavelmente, a ocratoxina B, já que as linhagens utilizadas, exceto a cepa selvagem, são citadas como produtoras desta toxina (64), que no sistema de solvente empregado, apresenta Rf semelhante ao obtido, segundo vários autores (21,23). Da mesma forma, se compararmos com dados de literatura para o sistema de solvente utilizado (21,23), as manchas de fluorescência azul com Rfs entre 0,60 e 0,70 devem provavelmente indicar ocratoxina C.

Uma alta taxa de crescimento confere a um microrganismo indiscutível superioridade na colonização de um ambiente. Essa não é, entretanto, a única característica que favorece a competitividade. Uma produção eficiente de enzimas extracelulares, permite rápida utilização do substrato, possibilitando também a degradação de substâncias tóxicas existentes no ambiente. Também a produção de substâncias antagônicas à outros microrganismos garante a ocupação de um espaço.

Dessa forma, é de se esperar que a pequena velocidade de crescimento dos fungos do grupo *A. ochraceus* (3-4 mm/dia em média), reduza consideravelmente sua capacidade de competição. Christensen (17) e Sauer (118) atribuem à este fato a baixa invasividade de *A. ochraceus* observada frente a outros microrganismos. Os resultados aqui obtidos, indicam que essa pouca invasividade dos fungos do grupo *A. ochraceus*, se deve exclusivamente a sua lentidão, pois tanto nos experimentos em meio sólido, como em meio líquido, a competitividade destes fungos, uma vez iniciado seu desenvolvimento, foi bastante alta. Nas situações de confronto direto entre colônias, estes fungos, ou tiveram seu crescimento limitado somente ao encontrar a outra



colônia, ou foram capazes de crescer sobre ou por entre as hifas da outra colônia. Apenas dois competidores, *Aspergillus heteromorphus* e *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, tiveram capacidade de crescer sobre os fungos toxigênicos. Nos experimentos em meio líquido, pode-se creditar pelo menos parte da inibição verificada à limitação de nutrientes do meio, já que estes experimentos foram realizados utilizando-se como substrato para os fungos toxigênicos, filtrados anteriormente utilizados pelos outros fungos antagônicos. Entretanto, a importância desse fato como causa de inibição, fica reduzida ao se constatar que fungos como *R. arrhizus* NRRL 2582 e *Trichoderma harzianum*, possuidores de crescimento bastante vigoroso, chegando em alguns casos a reduzir o volume final do filtrado, provocaram estímulo no crescimento dos fungos toxigênicos.

A reação de cada uma das linhagens toxigênicas frente aos filtrados antagonistas, demonstrou que ocorre grande diversidade de comportamento dentro do grupo *A. ochraceus*, o que dificulta a análise das interações como um todo.

Dos microrganismos competidores estudados, apenas cinco espécies produziram filtrados com forte ação antagônica sobre os fungos toxigênicos: *Aspergillus heteromorphus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Mucor racemosus* e *Trichoderma viride*. *A. heteromorphus*, já no confronto direto entre as colônias, definiu-se como antagonista, por sua capacidade invasiva, embora seja um fungo de crescimento lento. Entre as colônias de *A. niger*, *A. versicolor* e *T. viride* não se verificaram reações de agressão, mas estes microrganismos tem maior taxa de crescimento, o que garante a ocupação do espaço

mais rapidamente. Já *M. racemosus*, em substrato sólido apresenta desvantagem competitiva, pois pode ser invadido pelos fungos toxigênicos. O filtrado de *A. heteromorphus* é levemente ácido (pH 5,0), mas aparentemente esse pH não pode ser responsabilizado pela inibição, pois o filtrado de *Penicillium funiculosum* ATCC 11797 com pH próximo a esse (5,4) foi considerado não inibidor. A acidez dos filtrados de *A. niger*, poderia ser responsável pela sua ação inibitória, já que se demonstrou a incapacidade dos fungos toxigênicos em se desenvolver em pHs muito baixos. Paster & Chei (101), demonstraram que o crescimento de *A. ochraceus* NRRL 3174 ocorre a partir de pH 4,0, e a produção de esclerócios se dá numa faixa de 4,0 a 9,0, embora o crescimento seja normal até pH 13. A neutralização do pH dos filtrados de *A. niger*, entretanto, não reverteu a inibição, indicando a ação de outros fatores além da acidez. *A. versicolor*, *M. racemosus* e *T. viride* produziram filtrados neutros.

Entre os metabólitos conhecidos produzidos por *A. niger*, além dos vários ácidos e enzimas (38), estão algumas substâncias com efeitos inibidores sobre outros microrganismos, como aspergilina, um antibiótico contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (110), nigragilina, com ação inseticida (129), orlandina, substância inibidora do crescimento de plantas (129), e os peptídeos tóxicos malformina A e C, dos quais, malformina C demonstrou atividade contra *Bacillus subtilis* (28). Foi também descrita a produção de um fator esporostático, identificado como ácido nonanóico (38), que poderia explicar a inibição de germinação dos esporos dos fungos toxigênicos aqui observada.

Apesar da linhagem utilizada ser catalogada apenas como fungo para testes de resistência (2), *A. versicolor* já foi citado como produtor de substâncias com efeito antimicrobiano, como o antibiótico versiol (129); versicolina, uma substância com estrutura semelhante ao ácido kójico, com efeito antifúngico, empregada em terapia contra *Trichophyton rubrum* (112); e decolorgriseofulvina, uma substância derivada da griseofulvina (129). A griseofulvina tem ação antifúngica, e atua a nível de inibição dos microtúbulos, interferindo nos processos de divisão celular (112). Embora não seja citado como produtor de metabólitos antibióticos, o filtrado de *M. racemosus* tem atividade antibacteriana (38). Entre os metabólitos com efeitos antagonistas produzidos por *T. viride*, estão o antibiótico peptídico suzukacilina, com propriedades antibacterianas e antifúngicas, contra *A. niger* (124); tricotoxina, com atividade contra bactérias gram-positivas (124); tricoviridina, com atividade antibacteriana e contra *Candida albicans* (124); viridina, com efeito antifúngico contra *Botrytis allii* (124); tricolorina, com efeito contra vários fungos patogênicos e leveduras, como *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, agindo sobre as etapas de alongação e terminação da síntese proteica (89,124); e, discute-se (34,124), gliotoxina, que foi por muito tempo utilizada como antibiótico em terapia médica, tendo largo espectro de ação (124). Assim, pode-se pensar que as cepas aqui utilizadas, produzem substâncias específicas com ação antagônica sobre os fungos do grupo *A. ochraceus*, embora a tentativa de identificá-las através dos experimentos de bioautografia, não tenha fornecido resultados conclusivos. Pode-

se estabelecer, porém, que a participação de substâncias termolábeis na inibição, como enzimas ou antibióticos de natureza proteica, é pouca ou nenhuma, já que, o tratamento térmico dos filtrados não alterou os resultados obtidos.

Os filtrados de *Aspergillus candidus*, *Aspergillus chevalieri*, *Monodictys castaneae*, *Paecilomyces variotii*, *Rhizopus microsporus* e *Trichothecium roseum*, provocaram inibição moderada no crescimento dos fungos toxigênicos em meio líquido, sendo que, a maioria mostrou-se não agressiva nos confrontos diretos entre as colônias, exceto *A. chevalieri* e *P. variotii*, que tiveram suas colônias invadidas. Apesar de pouco inibidores, alguns destes fungos tem sido citados como produtores de substâncias antifúngicas, como clorflavonina, produzida por *A. candidus*, ativa contra vários *Aspergillus*, *Botrytis cinerea* e *P. variotii* (112); antibióticos LL-S491 e gliotoxina, por *A. chevalieri* (28,129); variotina, produzido por *P. variotii*, de baixa toxicidade e ativo contra os dermatófitos *Trichophyton* spp e *Cryptococcus* spp (112); e tricotecina, por *T. roseum*, com ação contra *Botrytis allii*, *Penicillium digitatum*, *Fusarium graminearum*, *P. variotii*, *Mucor eretus* e *Saccharomyces carlbergensis*, podendo até mesmo inibir a própria conidiação (55).

A produção de toxina nos experimentos em meio líquido, exceto nos casos de não inibição ou estímulo de crescimento, foi sempre totalmente suprimida, embora nos experimentos de confronto direto entre colônias, isso não tenha ocorrido. Tais fatos tornam mais plausível propor a ação de mecanismos de regulação metabólica da síntese de ocratoxina, do que pensar na

ação direta de inibidores específicos sobre a via biossintética. O que, inclusive, se mostra de acordo com as observações de que a produção de metabólitos secundários só ocorre na idiofase, e com a definição proposta por Turner (128), para o papel deste tipo de metabolismo no desenvolvimento celular.

A diminuição na concentração de ocratoxina do 6º para o 12º dia, verificada em alguns casos durante o cultivo dos fungos toxigênicos nos filtrados de culturas antagonistas, bem como no cultivo de *A. melleus* NRRL 3519 e *A. sclerotiorum* NRRL 5170 no controle em YES, pode ter sido causada pela degradação da toxina pelo próprio micélio toxigênico, que devido a limitação de nutrientes no substrato, utilizaria a toxina como fonte de carbono, ou ainda, possivelmente, como um mecanismo para diminuir a toxicidade do meio de cultura. Tal mecanismo já foi demonstrado por Doyle & Marth para aflatoxina (40,41,42,43,44,45) e por Patterson & Damoglou para citrinina (104).

Ainda em relação à toxina, a alteração de fluorescência verificada nos confrontos direto entre colônias, pode significar possível degradação da toxina pelo microrganismo competidor ou pelo próprio fungo toxigênico, como já foi sugerido acima, formando produtos não fluorescentes, com fluorescência de menor intensidade ou de coloração alterada. Nos experimentos em meio líquido, utilizando o filtrado de cultura de *A. alliaceus* NRRL 317 para estudar a ação de microrganismos competidores na degradação de OTA, não se verificou o desenvolvimento de nenhum dos fungos estudados. Os experimentos de bioautografia, entretanto, demonstraram que *A. niger* NRRL 6411, *R. arrhizus*

NRRL 2582 e *T. viride* são capazes de degradar 1.0 µg de OTA, e não são inibidos por ela. As três espécies são conhecidas como fortes produtoras de enzimas liticas e oxidativas (38). Pitout (107) demonstrou a possibilidade de se degradar a OTA pela quebra da ligação amida entre a unidade isocumarina e a fenilalanina (Figura 1), formado OT  $\delta$ , com conseqüente perda de fluorescência. Wegst & Lingens (135) propõem uma via de detoxificação da OTA por *Phenyllobacterium immobile*, em que também o metabólito final é OT  $\delta$ . Uma vez que *T. viride* tanto nos experimentos em CAM, como na bioautografia, provocou diminuição ou desaparecimento da fluorescência azul característica da OTA, pode-se pensar que esta cepa utilize uma via semelhante para degradar a toxina. A espécie *R. arrhizus* é conhecida por realizar transformações em esteróides (38) através de hidroxilações, e também é esse o mecanismo pelo qual transforma a aflatoxina em derivados menos tóxicos (26,27). Isso sugere que o mecanismo pelo qual esta cepa degrada a OTA, deve se iniciar com esse tipo de reação.

O não desenvolvimento dos fungos antagonistas no filtrado de *A. alliaceus* NRRL 317, pode, talvez, ser explicado pela elevada concentração de toxina no meio, pela exaustão acentuada de nutrientes e elementos traços essenciais, ou pela combinação dos dois fatores. A atividade antimicrobiana da OTA é conhecida apenas como bacteriostática contra gram-positivas, mesmo assim, a inibição do crescimento de *Bacillus subtilis* e *Streptococcus fecalis* na presença da toxina, é dependente do pH e pode ser revertida pela adição de  $Mg^{+2}$ , AMPc e GMPc (22). Lillehoj et al. (81), baseados na observação de Knypl de que a molécula de

cumarina inibe a germinação e crescimento dos esporos de alguns fungos, demonstraram ação fungistática da aflatoxina B<sub>1</sub> contra *A. flavus*, *Aspergillus awamori*, *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium duclauxii*, mas não contra *A. niger*, *A. ochraceus* e *Aspergillus terreus*. Assim, é possível que a presença de unidade cumarina na molécula das ocratoxinas seja responsável pela ação fungistática observada.

Apesar das indicações de que a contaminação de alimentos por fungos do grupo *A. ochraceus* no Brasil ocorre em baixos níveis, a capacidade competitiva desses fungos deixou bastante clara, a necessidade de continuidade e aprofundamento dos estudos de ecologia dos microrganismos de armazenamento, para que se possa relizar um esquema de monitoração micológica durante todo o processo pós-colheita (armazenamento, transporte e comercialização), como o que propoem o Programa Nacional de Micotoxinas (109), o que juntamente com o controle das condições ambientais no pós-colheita, irão garantir com um mínimo de segurança, a não produção de ocratoxina nos alimentos, evitando riscos para a saúde da população e perdas econômicas.

## CONCLUSÕES

(1) O levantamento de fungos de armazenamento realizado em 34 amostras de vários tipos de alimentos disponíveis para consumo, revelou um predomínio de fungos dos gêneros *Aspergillus* grupos *A. flavus* e *A. niger*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Rhizopus*, e raramente a ocorrência de fungos do grupo *Aspergillus ochraceus* (presente em apenas sete amostras, em baixas contagens). Destes, apenas uma das cepas isoladas de *A. ochraceus* Wilhelm, mostrou-se toxigênica.

(2) No confronto direto com colônias de outros fungos de armazenamento, os fungos do grupo *Aspergillus ochraceus* só foram invadidos por *Aspergillus heteromorphus* e *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582.

(3) No confronto direto com colônias de outros fungos de armazenamento, os fungos toxigênicos mostraram invasividade sobre *Absidia repens* NRRL 1336, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus chevalieri*, *Aspergillus deflectus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor* ATCC 11730, *Cladosporium* sp e *Mucor griseo-cyanus* NRRL 3359, *Mucor racemosus*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium raistrickii* NRRL 2038 e *Trichoderma harzianum*.



(4) Os fungos do grupo *Aspergillus ochraceus* apresentaram crescimento lento, em relação aos outros fungos estudados, com taxas variando entre 3,07 a 4,33 mm/dia (exceto *A. alliaceus* com 7,12 mm/dia), sendo este o principal fator que reduz sua competitividade.

(5) No confronto direto com colônias de outros fungos de armazenamento, em nenhum caso a produção de toxina pelos fungos do grupo *A. ochraceus* foi totalmente inibida.

(6) No confronto direto com colônias de outros fungos de armazenamento, após o contato entre elas, a toxina produzida teve sua fluorescência característica alterada de várias maneiras por *Aspergillus candidus*, *Aspergillus chevalieri*, *Aspergillus heteromorphus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor* ATCC 11730, *Monodyctis catanaeae*, *Mucor racemosus*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium funiculosum* ATCC 11797, *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, *Rhizopus microsporus*, *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride*, indicando possível degradação da mesma por estes fungos.

(7) A produção de OTA pelos fungos do grupo *A. ochraceus* estudados foi totalmente inibida em pHs ácidos (2,4), mas não em pHs alcalinos (8,1).

(8) Os fungos do grupo *Aspergillus niger*, possuidores de filtrado de cultura bastante ácido, provocaram inibição total no crescimento dos fungos do grupo *A. ochraceus* e na produção de OTA. A inibição não foi causada apenas pela acidez do filtrado, uma vez que a neutralização do mesmo não reverteu a situação.

(9) *Aspergillus heteromorphus*, que mostrou invasividade sobre as colônias dos fungos toxigênicos, possui filtrado levemente ácido, e inibiu o crescimento dos fungos do grupo *A. ochraceus* em meio líquido, com taxas variando de 50 a 67%, tendo suprimido totalmente a produção de ocratoxina A.

(10) Os fungos *Aspergillus versicolor* ATCC 11730, *Mucor racemosus* e *Trichoderma viride*, com filtrados de cultura mais próximos da neutralidade, inibiram o crescimento dos fungos toxigênicos com taxas variando entre 65-87%, 33-54% e 71-77%, respectivamente, e a produção de toxina em 100%.

(11) *Trichothecium roseum*, com filtrado de cultura bastante alcalino, embora tenha inibido moderadamente o crescimento dos fungos do grupo *Aspergillus ochraceus* (33-51%), inibiu totalmente a produção de ocratoxina.

(12) Os fungos *Aspergillus candidus*, *Aspergillus chevalieri*, *Monodyctis castaneae* e *Paecilomyces variotii* provocaram redução acentuada, mas não total, da produção de ocratoxina A pelos fungos toxigênicos, embora o crescimento destes nem sempre tenha sido muito afetado.

(13) Os fungos *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 e *Trichoderma harzianum*, com pH alcalino, provocaram estímulo no crescimento dos fungos toxigênicos e não impediram a produção de ocratoxina A, embora esta tenha sido diminuída. Uma vez que esses fungos tem crescimento bastante vigoroso, esses dados vem minimizar o fator exaustão de nutrientes como responsável pela inibição.

(14) O tratamento térmico dos filtrados de cultura, não reverteu a ação inibitória dos fungos estudados. Concluiu-se então, pela não participação de substâncias termo-lábeis, como enzimas e antibióticos de natureza proteica, no processo inibitório.

(15) A cepa selvagem de *A. ochraceus* mostrou-se mais resistente ao antagonismo, tanto em relação ao crescimento como em relação a produção de toxina. *A. sclerotiorum* NRRL 5170 e *A. ochraceus* NRRL 3174, foram as linhagens mais afetadas em relação ao crescimento e a produção de toxina, respectivamente.

(16) O filtrado de *Aspergillus alliaceus* NRRL 317 não permitiu o desenvolvimento de nenhum dos fungos de armazenamento estudados.

(17) Embora os fungos *A. niger* NRRL 6411, *R. arrhizus* NRRL 2582 e *Trichoderma viride* não tenham se desenvolvido quando cultivados sobre o filtrado de cultura de *A. alliaceus* NRRL 317, mostraram ser capazes de degradar 1,0 µg de ocratoxina A, quando cultivados sobre cromatografia de camada delgada do padrão de OTA e do filtrado de cultura de *A. alliaceus* NRRL 317.

(18) Os filtrados de cultura de *A. heteromorphus*, *A. niger* NRRL 6411 e *T. viride* aplicados a sementes de feijão, não mostraram ação protetora contra o desenvolvimento de fungos durante o armazenamento.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) ALDERMANN, G. G.; C. O. EMEH & E. H. MARTH - Aflatoxin and rubratoxin produced by *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium rubrum* when grown independently, associatively or with *Penicillium italicum* or *Lactobacillus plantarum*. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 153: 305 - 311, 1973.
- (2) AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION - Catalogue of Strains I- Algae, Bacteria, Bacteriophages, Fungi and Mycoviruses, Plant Viruses and Antisera, Plasmides, Recombinant DNA Vectors, Protozoa. 15th Ed, ATCC, Maryland, 1982. 755 p.
- (3) "Armazenagem até em escolas". O Estado de São Paulo; São Paulo, 29 de março de 1987, Economia: 22.
- (4) ASCAH, J. C. & E. S. IDZIAK - Interaction between *Streptococcus lactis* and *Aspergillus flavus* on production of aflatoxin. Appl. Env. Microbiol., 49: 163-167, 1985.

- (5) ASHWORTH Jr., L. J.; H. W. SCHROEDER & B. C. LANGLEY -  
Aflatoxins: environmental factors governing occurrence  
in spanish peanuts. *Science*, 148: 1228 - 1229, 1965.
- (6) AZZOUZ, M. A. & L. B. BULLERMAN - Comparative antimycotic  
effects of selected herbs, spices, plant components and  
commercial antifungal agents. *J. Food Protec.*, 45: 1298-  
1301, 1982.
- (7) BARBOSA, M. L. F.; A.C.B. ROCHA; M.T.D. AMARAL e M. H.  
TANIWAKI- Micoflora de ração de aves: pesquisa de pro-  
dutores de aflatoxina e competição entre fungos isolados  
*Anais do Encontro Nacional de Micotoxinas: Problemas e  
Soluções: 27 - 30, 1980.*
- (8) BARR, J. G.- Effects of volatile bacterial metabolites on  
the growth, sporulation and mycotoxin production of  
fungi. *J. Sci. Food Agric.*, 27: 324 - 330, 1976.
- (9) BARNETT, H. L. & B. B. HUNTER - Illustrated genera of  
imperfect fungi. 3th Ed., Burgess Publ. Co., Minnesota,  
1972. 241 p.

- (10) BASTOS, S.T.G.- Método rápido para detecção de produção de ocratoxina e esterigmatocistina por *Aspergillus* spp em meios de agar. Tese de Mestrado. UNB- Brasília, 1979. 78p.
- (11) BENDELE, A.M.; S.B. NEAL; T.J. OBERLY; C.Z. THOMPSON; B.J BEWSEY; L.E. HILL; M.A. REXROAT; W.W. CARLTON & G.S. PROBST - Evaluation of ochratoxin A for mutagenicity in a battery of bacterial and mammalian cell assays. *Food Chem. Toxic.*, 23: 911 - 919, 1985.
- (12) BOLLER, R.A. & H.W. SCHROEDER - Influence of *Aspergillus chevalieri* on production of aflatoxin in rice by *Aspergillus parasiticus*. *Phytopath.* 63: 1507-1510, 1973.
- (13) BOLLER, R.A. & H.W. SCHROEDER - Influence of *Aspergillus candidus* on production of aflatoxin in rice by *Aspergillus parasiticus*. *Phytopath.*, 64: 121-123, 1974.
- (14) BUCHANAN, R.L.; G. TICE & D. MARINO - Caffeine inhibition of ochratoxin A production. *J. Food Sci.*, 47: 319-321, 1981.
- (15) BURNETT, C. & G. W. RAMBO - Aflatoxin Inhibition and detoxification by a culture filtrate of *Aspergillus niger*. *Phytopath.*, 72: 749, 1972.

- (16) CHELKOWSKI, J.; P. GOLINSKI; B. GODLEWSKA; W. RADOMYSKA; K. SZEBIDTKO & M. WIEWTOROWSKA - Mycotoxins in cereal grain. Part IV. Inactivation of ochratoxin A and other mycotoxins during ammoniation. *Die Nahrung*, 25: 631-637, 1981.
- (17) CHRISTENSEN, C.M.- Invasion of stored wheat by *Aspergillus ochraceus*. *Cereal Chem.*, 39: 100 - 106, 1962.
- (18) CHRISTENSEN, C.M. & H.H. KAUFMANN - Grain storage - The role of fungi en quality loss. University of Minnesota Press, Minneapolis, 1969. 153 p.
- (19) CHRISTENSEN, M.- The *Aspergillus ochraceus* group: two new species from western soils and a synoptic key. *Mycologia* 74: 210 - 225, 1982.
- (20) CHU, F.S.; I. NOH & C.C. CHANG - Structural requirements for ochratoxin intoxication. *Life Sci.*, 11: 503-508, 1972.
- (21) CHU, F.S. - Studies on Ochratoxins. *Critical Rev. Toxicol.* 2: 499 - 524, 1974.
- (22) CHU, F. S. - Mode of action of mycotoxins and related compounds. *Adv. Appl. Bacteriol.*, 22: 83-143, 1977.



- (23) CIEGLER, A.; E.B. LILLEHOJ; R.E. PETERSON & H.H. HALL -  
Microbial detoxification of aflatoxin. Appl. Microbiol.  
14: 934 - 939, 1966.
- (24) CIEGLER, A. - Bioproduction of ochratoxin A and  
penicillic acid by members of *Aspergillus ochraceus*  
group. Can. J. Microbiol., 18: 631 - 636, 1972.
- (25) CIEGLER, A.; D.I. FENNELL; G.A. SANSING; R.W. DETROY &  
G. A. BENNETT - Mycotoxin - producing strains of  
*Penicillium viridicatum*: classification into subgroups.  
Appl. Microbiol., 26: 271 - 278, 1973.
- (26) COLE, R. J. & J.W. KIRKSEY - Aflatoxin G<sub>1</sub> metabolism by  
*Rhizopus* species. J. Agric. Food Chem., 19: 222-223,  
1971.
- (27) COLE, R.J.; J.W. KIRKSEY & B.R. BLANKENSHIP - Conversion  
of aflatoxin B<sub>1</sub> to isomeric compounds by *Rhizopus* spp.  
J. Agric. Food Chem., 20: 1100 - 1102, 1972.
- (28) COLE, R.I. & R.H. COX (Ed) - Handbook of toxic fungal  
metabolites. Academic Press, New York, 1981. 973 p.

- (29) COLLINS, R. P. & A. F. HALIM - Characterization of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride* (Pers). *J. Agric. Food Chem.*, 20: 437 - 438, 1972.
- (30) COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY - Aflatoxin and other mycotoxins: an agricultural perspective. CAST Rep. N<sup>o</sup> 80, Ames, Iowa, 1979. 56p.
- (31) DAVIS, N.D.; J.W. SEARCY & U.L. DIENER - Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in a semisynthetic medium. *Appl. Microbiol.*, 17: 742 - 744, 1969.
- (32) DAVIS, R.M. & J.L. RICHARD - Rubratoxin and related substances, in V. Betina (Ed) - *Mycotoxins, production, isolation, separation and purification*. Elsevier Sci. Publ. B.V., Amsterdam, 1984. 528 p.
- (33) DEACON, J.W.- *Introduction to modern mycology*. Blackwell Sci. Publ., London. 1980. 197 p.
- (34) DENNIS, C. & J. WEBSTER - Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* - I - Production of non-volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 57: 25-39, 1971.

- (35) DEVI, G.R. & H. POLASA - Interference in toxin production among toxigenic *Aspergilli* species. *J. Stored Prod. Res.* 23: 149 - 150, 1987.
- (36) DETROY, R. W. & C. W. HESSELTINE - Transformation of aflatoxin B<sub>1</sub> by steroid-hydroxylating fungi. *Can. J. Microbiol.*, 15: 495 - 500, 1969.
- (37) DHINGRA, O. D. & J. B. SINCLAIR - Basic plant pathology methods. CRC Press, Florida, 1985. 355 p.
- (38) DOMSCH, R.H.; W. GAMS & TRAUHE-HEIDI ANDERSON - Compendium of soil fungi. Academic Press, London, vol I, 1980. 859 p.
- (39) DOSTER, R.C.; R.O. SINNHUBER; J.H. WALES & D.J. LEE - Acute toxicity and carcinogenicity of ochratoxin in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Fed. Proc.*, 30: 578, 1971.
- (40) DOYLE, M.P. & E.M. MARTH - Aflatoxin is degraded by fragmented and intact mycelia of *Aspergillus parasiticus* grown 5 to 18 days with and without agitation. *J. Food Protec.*, 41: 549 - 555, 1978.

- (41) DOYLE, M.P. & E.M. MARTH - Aflatoxin is degraded by micelia from toxigenic and nontoxigenic strains of *Aspergilli* grown on different substrates. *Mycopath.*, 63: 145-153, 1978.
- (42) DOYLE, M.P. & E.M. MARTH - Aflatoxin at several initial concentration is degraded by different amounts of mycelium of *Aspergillus parasiticus*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 166: 359 - 362, 1978.
- (43) DOYLE, M.P. & E.M. MARTH - Aflatoxin is degraded by heated and unheated mycelia, filtrates of homogenized mycelia and filtrates of broth cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Mycopath.*, 64: 59 - 62, 1978.
- (44) DOYLE, M.P. & E.M. MARTH - Aflatoxin is degraded at different temperatures and pH values by mycelia of *Aspergillus parasiticus*. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 6: 95 - 100, 1978.
- (45) DOYLE, M.P. & E.H. MARTH - Peroxidase activity in mycelia of *Aspergillus parasiticus* that degrade aflatoxin. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 7: 211-217, 1979.

- (46) DOYLE, M.P. ; R.S. APPLEBAUM; R.E. BRACKETT & E. M. MARTH-  
Physical, chemical and biological degradation of  
mycotoxins in food and agricultural commodities. J.  
Food Protec., 45: 964 - 971, 1982.
- (47) DURACOVIC, S.; T. BERITIC & J. VELIKONJA- Biosynthesis and  
biodegradation of aflatoxin B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub> contaminated with  
common field and storage fungi. Mikrobiologija 21: 23-  
35, 1984. (Chem. Abstr., 102: 562, 1985; Abstr.)
- (48) DURLEY, R.C.; J. MCMILLAN & T.U. SIMPSON- Fungal products.  
Part XIII. Xanthomegnin, viomellein, rubrosulphin and  
viopurpurin, pigments from *Aspergillus sulphureus* and  
*Aspergillus melleus*. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1,  
1975: 163 - 169.
- (49) EHRLICH, K.; A. CIEGLER; M. KLICH & L. LEE - Fungal  
competition and mycotoxins production on corn.  
Experientia, 41: 691 - 693, 1985.
- (50) EHRLICH, K. - Effects on aflatoxin production of  
competition between wild - type and mutant strains of  
*Aspergillus parasiticus*. Mycopath., 97: 93 - 96, 1987.

- (51) EL-GENDY, S.M. & E.M. MARTH - Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in the presence of *Lactobacillus casei*. *J. Food Protec.*, 44: 211-212, 1981.
- (52) ENGEL, G. & M. TEUBER - Patulin and other small lactones, in V. Betina (Ed) - *Mycotoxins, production, isolation, separation and purification*. Elsevier Sci. Publ. B.V., Amsterdam, 1984. 528 p.
- (53) FENNELL, D. I. - Conservation of fungous cultures. *Bot. Rev.*, 26: 79 - 141, 1960.
- (54) FERREIRA, N. P. & M. J. PITOUT - The biogenesis of ochratoxin. *J. S. Afr. Chem. Inst.*, 22: S1 - S8, 1969.
- (55) FREEMAN, G.G. & R.I. MORRISON - Trichothecin: an antifungal metabolic product of *Trichothecium roseum* Link. *Nature*, 162: 30, 1948.
- (56) FRISVAD, J. C. & O. FILTENBORG - Classification of terverticillate *Penicillia* based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *Appl. Env. Microbiol.*, 46: 1301 - 1310, 1983.

- (57) FUCHS, R.; K. HULT; M. PERAICA; B. RADIC & R. PLESTINA -  
Conversion of ochratoxin C into ochratoxin A in vivo.  
Appl. Env. Microbiol., 48: 41 - 42, 1984.
- (58) GALTIER, P. & M. ALVINERIE - In vitro transformation of  
ochratoxin A by animal microbial floras. Ann. Rech.  
Véter., 7: 91 - 98, 1976.
- (59) GORST-ALLMAM, C.P. & P.S. STEYN- Screening methods for the  
detection of thirteen common mycotoxins. J. Chromatogr.  
175: 325 - 331, 1979.
- (60) HALL, D. W. - Handling and storage of food grains in  
tropical and subtropical areas. Food and Agriculture  
Organization of the United Nations, Rome, 1970. 362 p.
- (61) HAMILTON; P.B.; W.E. HUFF; J.R. HARRIS & R.D. WYATT -  
Natural occurrence of ochratoxin in poultry. Poult.  
Sci., 61: 1832 - 1841, 1982.
- (62) HARRIGAN, W. F. & M. E. Mc CANCE - Laboratory methods in  
microbiology. Academic Press, London, 1966. 362 p.

- (63) HAYES, A. W. & R.D. HOOD - Mycotoxin induced developmental abnormalities in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 23: 37, 1973.
- (64) HESSELTINE, C.W.; E.E, VANDERGRAFT; D.I. FENNELL; M.L. SMITH & O. L. SHOTWELL - *Aspergilli* as ochratoxin producers. *Mycologia*, 64: 539 - 550, 1972.
- (65) HITOKOTO, H.; S. MOROZUMI; T. WAUBE; S. SAKAI & H. KURATA - Fungal contamination and mycotoxin detection of powdered herbal drugs. *Appl. Env. Microbiol.*, 36: 252-256, 1978.
- (66) HITOKOTO, H. ; S. MOROZUMI; T. WAUKE; S. SAKAI & I. UENO Inhibitory effects of condiments and herbal drugs on the growth and toxin production of toxigenic fungi. *Mycopath.*, 66: 161 - 167, 1978.
- (67) HITOKOTO, H.; S. MOROZUMI; T. WAUKE; S. SAKAI & H. KURATA - Inhibitory effects of spice on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Appl. Env. Microbiol.* 39: 818 - 822, 1980.
- (68) HOMANS, A.L. & A. FUCHS - Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J. Chromatogr.*, 51: 327 - 329, 1970.



- (69) HORN, B.W. & D.T. WICKLOW - Factors influencing the inhibition of aflatoxin production in corn by *Aspergillus niger*. *Can. J. Microbiol.*, 29: 1087 - 1091, 1983.
- (70) HUFF, W.E. & P.B. HAMILTON - Mycotoxins - their biosynthesis in fungi: ochratoxins - metabolites of combined pathways. *J. Food Protec.*, 42: 815 - 820, 1979.
- (71) HYPPEL, A - Antagonistic effects of some soil fungi on *Fomes annosus* in laboratory experiments. *Studia Forestalia Suecica*, 64: 1 - 18, 1968.
- (72) JARVIS, B. - Factors affecting the production of mycotoxins. *J. Appl. Bacteriol.*, 34: 199 - 213, 1971.
- (73) KAMIMURA, H. - Conversion of zearalenone to zearalenone glycoside by *Rhizopus* sp. *Appl. Env. Microbiol.*, 52: 515 - 519, 1986.
- (74) KANISAWA, M. & S. SUZUKI - Induction of renal and hepatic tumors in mice by ochratoxin A, a mycotoxin. *Gann*, 69: 599 - 600, 1978.

- (75) KIESSLING, K.H.; H. PETTERSON; K. SANDROLM & M. OLSEN -  
Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone and  
three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen  
protozoa and rumen bacteria. Appl. Env. Microbiol. 47:  
1070 - 1073, 1984.
- (76) KROGH, P. - Causal association of mycotoxic nephropathy.  
Acta Pathol. et Microbiol. Scand. sec A, suppl. 269,  
1978. 28 p.
- (77) KUCZUK, M. H.; P.M. BENSON; H. HEATH & A.W. HAYES -  
Evaluation of the mutagenic potential of mycotoxins  
using *Salmonella thyphimurium* and *Saccharomyces*  
*cerevisiae*. Mutation Res., 53: 11, 1978.
- (78) LAFONT, P. & J. LAFONT- Metabolisme de l'aflatoxine B<sub>1</sub> par  
*Aspergillus candidus* Link. Ann. Microbiol. (Inst. Past.)  
125 B: 451 - 457, 1974.
- (79) LAI, M.; G. SEMENIUK & C.W. HESSELTINE - Conditions for  
production of ochratoxin A by *Aspergillus* species in a  
synthetic medium. Appl. Microbiol., 19: 542-544, 1970.

- (80) LANCASTER, M.C.; F.P. JENKINS & J.M. PHILP - Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature*, 192: 1095 - 1096, 1961.
- (81) LILLEHOJ, E.B.; A. CIEGLER & H.H. HALL - Fungistatic action of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Experientia*, 23: 187-190, 1967.
- (82) LILLEHOJ, E. B.; O. AALUND & B. HALD - Bioproduction of [<sup>14</sup>C] ochratoxin A in submerged culture. *Appl. Env. Microbiol.*, 36: 720 - 723, 1978.
- (83) LILLEHOJ, E. B.- Evolutionary basis and ecological role of toxic microbial secondary metabolites. *J. Theor. Biol.* 97: 325 - 332, 1982.
- (84) MADSEN, A.; B. HALD & H. P. MORTENSEN - Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs. Part 3. Detoxification by ammoniation, heating + NaOH or autoclaving. *Acta Agric. Scand.*, 33: 171 - 175, 1983.
- (85) MANDELS, G. R. - Kinetics of fungal growth. in G.C. Ainsworth & A.S. Sussman (Ed) - *The fungi - an advanced treatise*. Academic Press, New York, vol I, 1965. 748 p.

- (86) MANN, R. & H.J. REHM - Degradation products from aflatoxin B<sub>1</sub> by *Corynebacterium rubrum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* and *Mucor ambiguus*. *European J. Appl. Microbiol.*, 2: 297 - 306, 1976.
- (87) MANN, R. & H.J. REHM - Abbau von aflatoxin B<sub>1</sub> durch verschiedene mikroorganismen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 163: 39 - 43, 1977.
- (88) MARTIN, P. M. & G. A. GILMAN - A consideration of the mycotoxins hypothesis with special reference to the mycoflora of maize, sorghum, wheat and groundnuts. Rep. Tropical Products Institute, G 105, London, 1976, 112 p.
- (89) Mc LAUGHLIN, C.S.; M.H. VAUGHAN; I.M. CAMPBELL; C.M. WEI; M.E. STATFFORD & B.S. HANSEN - Inhibition of protein synthesis by trichothecenes. in J. V. Rodricks, C. W. Hesseltine & M.A. Mehlman (Ed) - *Mycotoxins in human and animal health*. Pathotox Publishers Inc., Illinois. 1977. 807p.
- (90) MENDES, M.A.S. - Influência de fungos obtidos de produtos alimentícios na produção de aflatoxinas pelo grupo-espécie *Aspergillus flavus*. Tese de Mestrado. UNB- Brasília, 1984. 76 p.

- (91) MICETICH, R. G. & J. C. MAC DONALD - Metabolites of *Aspergillus sclerotiorum*. J. Chem. Soc., 1964: 1507-1510.
- (92) MISLIVEC, P. B.; M. W. TRUCKSESS & L. STOLOFF - Effect of other toxigenic mold species on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in sterile broth shake culture. J. Food Protec., 51: 449 - 451, 1988.
- (93) "Ministro sugere uso de igrejas e clubes para abrigar a safra." Folha de São Paulo; São Paulo, 15 de abril de 1987, Economia: A-34.
- (94) MOORE, J.H.; N.D. DAVIS & U.L. DIENER - Mellein and 4-hydroxymellein production by *Aspergillus ochraceus* Wilhelm. Appl. Microbiol., 23: 1067 - 1072, 1972.
- (95) MOREIRA, I. P. & S. P. SALZBERG - Modificação do meio de agar-coco adicionado de antibióticos (CAM-Ab) para a triagem de fungos toxigênicos em cereais. Resumos do II Encontro Nacional de Micologia: 68, 1985.
- (96) NATORI, S.; S.SAKAKI; H. KURATA; S.I. UDAGAWA; M. ICHINOE; M. SATO & M. UMEDA - Chemical and cytotoxicity survey on the production of ochratoxins and penicillic acid by *Aspergillus ochraceus* Wilhelm. Chem. Pharm. Bull., 18: 2259 - 2268, 1970.

- (97) NORTHOLT, M.D. & L.B. BULLERMAN - Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions. *J. Food Protec.*, 45: 519-526, 1982.
- (98) OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE A.O.A.C.- W. Horowitz (Ed.), 13th Ed., A.O.A.C., Washington, DC, 1980. 1018 p.
- (99) OLIVEIRA, H.N. - Isolamento de microrganismos resistentes à aflatoxina. Tese de Mestrado. UNICAMP - São Paulo, 1971. 66 p.
- (100) "Paraná tem deficit de armazéns de 2,7 milhões de toneladas". Folha de São Paulo; São Paulo, 19 de abril de 1977  
Economia: A-30.
- (101) PASTER, N. & I.CHEI - Effects of environmental factors on growth and sclerotium formation in *Aspergillus ochraceus*  
*Can. J. Bot.*, 58: 1844 - 1850, 1980.
- (102) PASTER, N. & N. LISKER - Accumulation of ochratoxin A in sclerotia of *Aspergillus ochraceus*. *Can. J. Bot.*, 63: 661 - 662, 1985.

- (103) PASTER, N; R. B. GOLAN & R. PADOVA - Effect of gamma radiation on ochratoxin production by the fungus *A. ochraceus*. *J. Sci. Food Agric.*, 36: 445 - 449, 1985.
- (104) PATTERSON, M. & D.P. DAMOGLU - Conversion of the mycotoxin citrinin into dihydrocitrinone and ochratoxin A by *Penicillium viridicatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27: 574 - 578, 1987.
- (105) PEPELJNJAK, S. & Z. CVETNIC - The mycotoxicological chain and contamination of food by ochratoxin A in the nephropathic and non-nephropathic areas in Yugoslavia. *Mycopath.*, 90: 147 - 153, 1985.
- (106) PITOUT, M.J. - The effect of ochratoxin A on glycogen storage in the rat liver. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, 13: 299 - 306, 1968.
- (107) PITOUT, M.J. - The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes. *Biochemical Pharmacol.*, 18: 485-491, 1969.
- (108) PLISZCZYNSKA, J.P. & T. JUSZKIEWICS - Tissue deposition and passage into eggs of ochratoxin A in Japanese Quails. *Bull. Vet. Inst. Pulaway*, 27: 79-82, 1984.

- (109) PROGRAMA NACIONAL DE MICOTOXINAS - SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA - Propostas de medidas corretivas e alteração da legislação de micotoxinas, 1986. (mimeo.)
- (110) RAPER, K.B. & D. I. FENNELL - The genus *Aspergillus*. Robert E. Krieger Publ. Co., Malabar, Florida, 1965. 686 p.
- (111) RAY, L. L. & L. B. BULLERMAN - Preventing growth of potentially toxic molds using antifungal agents. *J. Food Protec.*, 45: 953 - 963, 1982.
- (112) RYLEY, J.F.; R.G. WILSON; M.B. GRAVESTOCK & J. P. POYSER - Experimental approaches to antifungal chemotherapy. *Adv. in Pharmacol. and Chemotherapy*, 18: 49 - 176, 1981.
- (113) ROBBERS, J. E.; S. HONG; J. TUIE & W. W. CARLTON - Production of xanthomegnin and viomellein by species of *Aspergillus* correlated with mycotoxicoses produced in mice. *Appl. Env. Microbiol.*, 36: 819 - 823, 1978.
- (114) "Safra recorde faz do país imenso e caótico armazém". O Estado de São Paulo; São Paulo, 27 de maio de 1987. Economia: A-23.



- (115) SAMPAIO, J. - Falta de armazéns e juros altos desesperam agricultores. Folha de São Paulo; São Paulo, 19 de abril de 1987. Economia: A-30.
- (116) SANSING, G.A.; E.B. LILLEHOJ & R.W. DETROY - Sinergistic toxic effect of citrinin, ochratoxin A and penicillic acid in mice. *Toxicon*, 14: 213 - 220, 1976.
- (117) SARGEANT, K; A. SHERIDAN; J. O'KELLY & R.B.A. CARNAGHAM - Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature*, 192: 1096 - 1097, 1961.
- (118) SAUER, D.B. - Inhibition of damaging storage fungi by *Aspergillus glaucus* in grain. *Phytopath.* 75: 1378, 1985.
- (119) SCOTT, P.M. - *Penicillium* mycotoxins - Ochratoxin A. in T. D. Willie & L. G. Morehouse (Ed) - *Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicosis*. Marcel Dekker Inc., New York, vol I, 1977. 583 p.
- (120) STEYN, P.S. & C.W. HOLZAPFEL - The isolation of the methyl and ethyl esters of ochratoxins A and B, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *J. S. Afr. Chem. Inst.*, 20: 186 - 191, 1967.

- (121) STEYN, P. S. - Ochratoxin A and related dihydroisocoumarins. in V. Betina (Ed) - Mycotoxins, production, isolation, separation and purification. Elsevier Sci. Publ. B.V., Amsterdam, 1984. 528 p.
- (122) STOREN, O.; H. HOLM & F. C. STÖRMER - Metabolism of ochratoxin A by rats. Appl. Env. Microbiol., 44: 785-789, 1982.
- (123) STÖRMER, F. C.; P. KOLSAKER; H. HOLM; S. ROGSTAD & F. ELLING - Metabolism of ochratoxin B and its possible effects upon the metabolism and toxicity of ochratoxin A in rats. Appl. Env. Microbiol., 49: 1108 - 1112, 1985
- (124) TAYLOR, A. - Some aspects of the chemistry and biology of the genus *Hypocrea* and its anamorphs, *Trichoderma* and *Gliocladium*. Proc. N. S. Inst. Sci. 36: 27 - 58, 1986.
- (125) TONG, C.H. & F.A. DRAUGHON - Inhibition by antimicrobial food additives of ochratoxin A production by *Aspergillus sulphureus* and *Penicillium viridicatum*. Appl. Env. Microbiol., 49: 1407 - 1411, 1985.
- (126) TRENK, H. L.; M. E. BUTZ & F. S. CHU - Production of ochratoxins in different cereal products by *Aspergillus ochraceus*. Appl. Microbiol., 21: 1032 - 1035, 1971.

- (127) TRUCKSESS, M.W.; L. STOLOFF & P. B. MISLIVEC - Effect of temperature, water activity and other toxigenic mold species on growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production on corn, pinto beans and soybeans. *J. Food Protec.*, 51: 361 - 363, 1988.
- (128) TURNER, W.B. - Fungal metabolites. Academic Press, London. 1971, 446 p.
- (129) TURNER, W. B. & D. C. ALDRIDGE - Fungal metabolites II. Academic Press, London, 1983. 631 p.
- (130) TUTHILL, D.E. & M. CHRISTENSEN - *Aspergillus sepultus*, a new species in the *Aspergillus ochraceus* group. *Mycologia*, 78: 475 - 477, 1986.
- (131) van der MERWE, K.J.; P.S. STEYN; L. FOURIE; De B. SCOTT & J.J. THERON- Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, 205: 1112-1113, 1965.
- (132) van der MERWE, K.J.; P.S. STEYN & L. FOURIE - Mycotoxins- Part II- The constitution of ochratoxin A, B and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *J. Chem. Soc.* 1965: 7083 - 7088.

- (133) VLEGGAR, R. & P. S. STEYN - The biosynthesis of some miscellaneous mycotoxins - Ochratoxin and related dihydroisocoumarins. in P. S. Steyn (Ed) - The biosynthesis of mycotoxins - a study in secondary metabolism. Academic Press, New York, 1980. 432 p.
- (134) WECKBACH, L.S. & E.H. MARTH - Aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a competitive environment. *Mycopath.*, 62: 39 - 45, 1977.
- (135) WEGST, W. & F. LINGENS - Bacterial degradation of ochratoxin A. *FEMS Microbiol. Lett.* 17: 341 - 344, 1983.
- (136) WESTLAKE, K.; R.I. MACKIE & M.F. DUTTON - Effects of several mycotoxins on specific growth rate of *Butyrivibrio fibrisolvens* and toxin degradation in vitro. *Appl. Env. Microbiol.*, 53: 613 - 614, 1987.
- (137) WICKLOW, D. T. - Competitive hierarchy in post-fire ascomycetes. *Mycologia*, 71: 47 - 54, 1979.
- (138) WICKLOW, D. T.; C.W. HESSELTINE; O.L. SHOTWELL & G.L. ADAMS - Interference competition and aflatoxin levels in corn. *Phytopath.*, 70: 761 - 764, 1980.

- (139) WICKLOW, D. T.; B. W. HORN & O. L. SHOTWELL - Aflatoxin formation in preharvest maize ears coinoculated with *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *Mycologia*, 79: 679 - 682, 1987.
- (140) WICKLOW, D.T.; B.W. HORN; O.L. SHOTWELL; C.W. HESSELTINE & R. W. CALDWELL - Fungal interference with *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of maize growth in a controlled environment. *Phytopath.*, 78: 68-74, 1988.
- (141) WILSON, B. J.- Miscellaneous *Aspergillus* toxins. in A. Ciegler, S. Kadis & S.T. Ajl (Ed) - *Microbial Toxins*, Academic Press, New York, vol VI, 1971. 563 p.
- (142) WU, M.T. & J.C. AYRES- Effects of dichlorvos on ochratoxin production. *J. Agric. Food Chem.*, 22: 536 - 537, 1974.
- (143) YAMAZAKI, M.; Y. MAEBAYASHI & K. MIYAKI - The isolation of secalonic acid A from *Aspergillus ochraceus* cultured on rice. *Chem. Pharm. Bull.*, 19: 199 - 201, 1971.