



LUCAS COSTA GUIMARÃES

**MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE FUNGOS
POTENCIALMENTE TOXIGÊNICOS**

LAVRAS – MG

2011

LUCAS COSTA GUIMARÃES

**MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE FUNGOS POTENCIALMENTE
TOXIGÊNICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza

Coorientador

Dr. Luis Roberto Batista

Dra. Deila Magna dos Santos Botelho

LAVRAS – MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Guimarães, Lucas Costa.

Métodos de preservação de fungos potencialmente toxicogênicos
/ Lucas Costa Guimarães. – Lavras: UFLA, 2011.
55 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.
Orientador: Sara Maria Chalfoun de Souza.
Bibliografia.

1. Micotoxinas. 2. Micoteca. 3. Aspergillus. 4. Penicillium. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.07

LUCAS COSTA GUIMARÃES

**MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE FUNGOS POTENCIALMENTE
TOXIGÊNICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 11 de AGOSTO de 2011

Dr. Luis Roberto Batista

UFLA

Dra. Deila Magna dos Santos Botelho

EPAMIG/URESM

Dr. Marcelo Cláudio Pereira

EPAMIG/URESM

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza

Orientadora

LAVRAS – MG

2011

AGRADECIMENTOS

À Deus que me trouxe até aqui sempre debaixo de sua proteção.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, por permitirem a realização deste trabalho.

À Dra. Sara Maria Chalfoun, pela orientação, confiança, pelas agradáveis conversas e valiosos conselhos.

Aos coorientadores Luis Roberto Batista e Dra. Deila Magna dos Santos Botelho pelas valiosas sugestões.

Ao Dr. Marcelo Pereira pelo apoio e sugestões.

À Doutoranda Ana Paula Fernandes pelo apoio, amizade e sugestões prestadas durante todo tempo.

À EPAMIG/URESM e seus funcionários.

À Capes, pela concessão de bolsa de estudos.

Aos amigos da EPAMIG/URESM e da UFLA: Vicentina da Silva, Aline Ramalho, Fernanda Gandra, Thais Oliveira, Evandro Galvão e Amanda Ávila pelo carinho, ensinamentos e ajuda durante toda a execução do experimento.

Aos meus amigos da República BOI: Dalton, Gustavo, Fabrício e André pela amizade e companheirismo.

Agradeço aos meus pais Ruth e José Renato pelo apoio e exemplo de vida, meu avô Miguel pelo carinho e abrigo, minha prima Josiane pela ajuda constante em meus trabalhos, meus tios e primos por todo apoio e carinho durante essa caminhada.

À meu irmão Joab que mesmo sob todas as dificuldades ajuda a transformar os meus objetivos em conquistas.

Muito obrigado!

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo
para a vitória é o desejo de vencer.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

Os micro-organismos são fontes de muitos compostos de alto valor que são úteis a todos os seres vivos assim como para os seres humanos, plantas e animais. O isolamento e melhoramento de um micro-organismo são processos longos e caros, por isso é essencial preservar a característica obtida para não ser preciso passar por esses procedimentos mais uma vez. Os fungos são organismos eucariontes, aclorofilados, heterotróficos, geralmente filamentosos, obtêm seu alimento por absorção, podem ser macro ou microscópicos, propagam-se por meio de esporos e armazenam glicogênio como fonte de reserva. Os fungos ao contaminarem os alimentos podem produzir substâncias tóxicas tais como micotoxinas. A grande diversidade genética do Reino Fungi torna relevante a conservação de culturas fúngicas (micotecas) desde há muitos anos. Várias coleções de culturas de referência internacional são mantidas em diversos países. As metodologias mais adequadas para a preservação dos micro-organismos por períodos prolongados baseiam-se na redução do metabolismo até um nível de dormência artificial. Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar três métodos de preservação de fungos (Castellani, repique contínuo e liofilização) potencialmente toxigênicos isolados a partir de alimentos, e identificar o melhor entre eles. As amostras foram obtidas no mercado varejista de lavras, fazendo parte da mesma alimentos não processados com sinais de deterioração (pêra, pêsego, castanha do pará e amendoim) e alimentos processados ainda dentro do prazo de validade (milho enlatado, linhaça, uva passas e amendoim). Os fungos obtidos foram isolados e identificados onde selecionou-se, apenas os fungos com potencial toxigênico obtendo um total de 12 fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Os isolados foram submetidos a três métodos de preservação (Castellani, repique contínuo e liofilização) avaliados a cada dois meses durante quatro tempos (8 meses) obtendo 100% de viabilidade durante os quatro tempos nos três métodos de preservação, porém obtendo uma variação em relação a preservação da produção de toxina e os métodos utilizados.

Palavras-chave: Micotoxinas. Fungos toxigênicos. Métodos de preservação.

ABSTRACT

Microorganisms are a source of many high-value compounds which are useful to every living being, such as humans, plants and animals. Since the process of isolating and improving a microorganism can be lengthy and expensive, preserving the obtained characteristic is of paramount importance, so the process does not need to be repeated. Fungi are eukaryotic, achlorophyllous, heterotrophic organisms, usually filamentous, absorb their food, can be either macro or microscopic, propagate themselves by means of spores and store glycogen as a source of storage. Fungi, while infesting food, may produce toxic substances such as mycotoxins. The great genetic diversity of the Kingdom Fungi renders relevant the preservation of fungal cultures for many years. Several international reference mycological culture collections are maintained in many countries. The methodologies that are most fit for preserving microorganisms for extended periods are based on lowering the metabolism until it reaches a stage of artificial numbness. The goal of this study was to analyze three methods for potentially toxigenic fungal conservation (Castellani's, continuous passages and lyophilization) and to identify the best among them. Samples – unprocessed foods which presented signs of deterioration (pear, peach, Brazil nut and peanut) and processed foods still within expiration date (canned corn, linseed, raisin and peanut) – were obtained from the Lavras retail market. The fungi obtained from the samples were isolated and identified, and only the ones with toxigenic potential were selected, resulting a total of 12 fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. The isolated ones were submitted to three methods for fungal conservation (Castellani, continuous passages and lyophilization) and evaluated every two months during eight months, which presented a 100% viability in all three methods. The conservation of the toxin production, however, varied by method.

Keywords: Mycotoxins. Toxigenic fungi. Methods for fungal conservation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Liofilizador marca Liotop, modelo L101	32
Figura 2	Discos de micélio liofilizados das amostras fúngicas	33
Figura 3	Frascos com água destilada estéril e fragmento dos fungos preservados pelo método de Castellani	34
Figura 4	Fungos preservados por repique contínuo em placas de Petri	35
Quadro 1	Fungos obtidos e origem	29
Quadro 2	Fungos e micotoxinas potencialmente produzidas.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Legislação para micotoxinas em alimentos e rações na América Latina [adaptado de FAO(2003) e do site www.micotoxinas.com.br]	26
Tabela 2	Representa a viabilidade dos isolados fúngicos potencialmente toxigênicos no tempo 0	36
Tabela 3	Análise da viabilidade dos isolados fúngicos	37
Tabela 4	Produção de OTA por <i>A. carbonarius</i> submetidos a diferentes métodos de preservação	40
Tabela 5	Produção de OTA por <i>A. ochraceus</i> submetidos a diferentes métodos de preservação	40
Tabela 6	Produção de aflatoxina por <i>A. flavus</i> submetidos a diferentes métodos de preservação	41
Tabela 7	Produção de aflatoxina <i>A. parasiticus</i> submetidos a diferentes métodos de preservação	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Preservação de fungos	13
2.2	Métodos de preservação	14
2.2.1	Liofilização	14
2.2.2	Água destilada estéril	16
2.2.3	Repique contínuo	18
2.3	Micro-organismos deterioradores de alimentos	19
2.4	Fungos	20
2.5	Micotoxinas	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	Obtenção das amostras de alimentos	29
3.2	Análise microbiológica	30
3.3	Caracterização	30
3.4	Determinação do potencial toxigênico dos microrganismos isolados	31
3.5	Métodos de preservação	32
3.5.1	Liofilização	32
3.5.2	Água destilada estéril	33
3.5.3	Repique contínuo	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	Teste de viabilidade dos isolados fúngicos	36
4.2	Teste de potencial toxigênico dos isolados fúngicos	39
5	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

Os micro-organismos são fontes de muitos compostos de alto valor que são úteis a todos os seres vivos. Alguns dos produtos mais importantes que microorganismos fazem parte da produção são as vitaminas, antibióticos, álcool, enzimas, biossurfactantes, medicamentos etc (CAMEOTRA, 2007).

A comunidade internacional considera o século XXI a era da Biotecnologia, onde, fungos miceliais são considerados grandes produtores de biotecnologia. Nas últimas décadas, estes organismos têm sido empregados para a obtenção de uma série de substâncias biologicamente ativas que são usadas na agricultura, indústria alimentar e especialmente na medicina (FEOFILOVA et al., 2009).

O isolamento e melhoramento de um micro-organismo são processos longos e caros, por isso é essencial preservar a característica obtida para não ser preciso passar por esses procedimentos mais uma vez. A escolha de uma técnica de preservação para determinado microrganismo depende das características do método, dos custos de manutenção, da importância do acervo, da disponibilidade de equipamentos, entre outros fatores.

A preservação de culturas fúngicas é elemento essencial da sistemática e estudos de biodiversidade, pois os fungos são um grupo de grande diversidade e por isso vários métodos de cultivo e preservação são necessários para garantir a viabilidade e integridade morfológica, fisiológica e genética das culturas ao longo do tempo. O custo e conveniência de cada método, no entanto, também deve ser considerados (NAKASONE; PETERSON; JONG, 2004).

De acordo com Romeiro (1996), saber como preservar culturas é dispor de técnicas simples e eficientes para tanto, se reveste da mais conspícua importância em qualquer laboratório onde se desenvolvem atividades de pesquisa.

A importância da preservação de culturas advém da necessidade de se poder dispor do organismo ou espécime a qualquer momento, quer para fins experimentais, quer para trabalhos de rotina ou para atendimento a solicitações de outros pesquisadores, para fins didáticos, para estudos comparativos, etc (SKERMAN, 1973).

Visando se obter o melhor método de preservação de microrganismos, o presente trabalho propõe-se a aplicar três métodos de preservação de fungos potencialmente toxigênicos isolados a partir de alimentos e identificar o melhor entre eles.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Preservação de fungos

As coleções de culturas de micro-organismos têm uma particular importância na conservação *ex situ* da diversidade microbiana (SLY, 1998). O material biológico preservado por métodos adequados em coleções de cultura tem um amplo espectro de aplicações nas áreas de saúde, agropecuária, indústria e meio ambiente (CANHOS; VAZOLLER; SOUZA, 2006).

A preservação e a manutenção das culturas devem ser realizados de forma a garantir a sobrevivência do microrganismo, bem como a conservação das propriedades morfológicas, fisiológicas, características genéticas e a pureza dos isolados durante períodos prolongados (ABREU; TUTUNJI, 2004; CANHOS et al., 2007).

As metodologias mais adequadas para a preservação dos micro-organismos por períodos prolongados baseiam-se na redução do metabolismo até um nível de dormência artificial; no entanto, a escolha do método deve levar em consideração a estabilidade genética, a manutenção dos caracteres morfológicos, metabólicos, antigênicos, de patogenicidade e virulência, além da viabilidade das culturas (LIMA et al., 2004; SMITH, 2003).

Os métodos usualmente empregados para a manutenção de micro-organismos são o uso de óleo mineral, água destilada esterilizada, baixas temperaturas (congelamento à -80°C e nitrogênio líquido) e liofilização (CANHOS, 2003; FIGUEIREDO, 2001; NAKASONE; PETERSON; JONG, 2004).

A grande diversidade genética do Reino Fungi torna relevante a conservação de culturas fúngicas (micotecas) desde há muitos anos. Várias coleções de culturas de referência internacional são mantidas em diversos países,

entre as quais se destacam o *International Mycological Institute* (IMI) na Inglaterra; a coleção de leveduras, fungos filamentosos e dimórficos da *American Type Culture Collection* (ATCC) nos EUA; o *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS) na Holanda; a *Mycothèque de L'Université Catholique de Luvaïm* (MUCL) na Bélgica, entre outras (URUBURU, 2003). No Brasil, existem algumas coleções em institutos de pesquisa e em algumas universidades, sendo que provavelmente uma das mais expressivas em fungos de interesse médico, seja a do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), com mais de 2.300 espécies de fungos caracterizadas (<http://www.inpa.gov.br>). Além desta, a coleção de culturas de fungos filamentosos do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) no Rio de Janeiro, representa uma das mais antigas coleções do país; criada em 1922, com o objetivo de preservar isolados de interesse médico, esta coleção também representa uma importante fonte de recursos biológicos que contribuem para o desenvolvimento da pesquisa científica (CAVALCANTI, 2010).

2.2 Métodos de preservação

2.2.1 Liofilização

O processo de liofilização, também chamado de *freeze drying* em inglês, foi patenteado em 1906 pelos cientistas franceses D'Arsonval e Bouda.

O desenvolvimento desta técnica foi uma consequência do aperfeiçoamento dos métodos de desidratação que foram, durante muitos anos, empregados para a preservação de uma ampla variedade de microrganismos, principalmente bactérias e fungos.

A liofilização é considerada hoje como um dos melhores processos para preservar a viabilidade de microrganismos e particularmente de bactérias e

fungos. Para um grande número de fungos a viabilidade pode ser mantida por muitos anos ultrapassando períodos de 17 a 20. O método consiste na desidratação das células ou esporos por congelamento e a vácuo, com posterior armazenamento também sob vácuo e em condições de refrigeração. Usualmente os esporos ou células são suspensos em um colóide que pode ser leite desnatado (10 – 20%); hemossoro bovino; solução a 1% de lactose, glicose ou sacarose. Podem ser usadas também misturas de vários desses componentes como 10% de leite desnatado acrescido de 10% de inositol (FIGUEIREDO, 2001).

Quando o método de secagem por congelamento ou liofilização é mencionado em relação à preservação de microrganismos, é quase sempre no que diz respeito ao armazenamento de longo prazo das suspensões de células que contêm mais de 10^8 células ml^{-1} (COSTA et al., 2000; MIYAMOTO-SHINOHARA et al., 2000).

A razão para a preservação da alta concentração de células é a premissa de que a maioria das células morre durante o armazenamento em longo prazo, mas um número suficiente para permitir sobreviver a continuação da linhagem. Bozoglu, Özilgen e Blakir (1987) sugerem que a sobrevivência de 0,1% da população da célula original é um número “suficiente” dos sobreviventes de liofilização para permitir a continuação.

O processo de liofilização, não é apropriado para todos os fungos. Na verdade, a técnica é usada principalmente com espécies que formam propágulos relativamente pequenos. (NAKASONE; PETERSON; JONG, 2004). No entanto, Croan (2000) demonstrou que os isolados miceliais dos basidiomicetos podem ser liofilizados efetivamente na presença de trealose.

Este procedimento é o método de preservação de escolha para fungos que produzem um grande número de esporos de 10 μm ou menos de diâmetro. Esporos maiores tendem a colapso durante o processo de liofilização e danos estruturais causados não são reversíveis pela hidratação. Um significativo

número de esporos de tamanho apropriado são também fisicamente danificados e mortos durante o processo de congelamento pela formação de cristais de gelo. Assim, cada ampola inicialmente deve conter muitos esporos viáveis (NAKASONE; PETERSON; JONG, 2004).

Na maioria dos casos as propriedades iniciais e número de microrganismos são em grande parte preservadas por meio do método de liofilização. Há também dados sobre algumas das desvantagens desta técnica por causa da aparência de irreversibilidade parcial ou fisiológica, físico-química, bioquímica ou mecânica, danos; perturbações no nível subcelular ou molecular.

Assim, apesar a muitas investigações científicas em e laboratórios de liofilização em todo o mundo, este método não pode ser aceito como universal (DONEV, 2001).

2.2.2 Água destilada estéril

Inicialmente descrita por Castellani (1939), a técnica da água destilada estéril é simples, econômica, capaz de assegurar a viabilidade, estabilidade, pureza e patogenicidade de um grande número de organismos fúngicos (CASTELLANI, 1967).

Consiste na inoculação de pequenos frascos de vidro, contendo água destilada esterilizada, com pequena porção do meio de cultura (aproximadamente 5 mm x 10mm), contendo o fungo que se deseja preservar.

Esse é um processo que vem sendo intensivo e extensivamente utilizado pelo Laboratório de Micologia Fitopatológica do Centro de Sanidade vegetal do Instituto Biológico de São Paulo com excelentes resultados desde 1966. A metodologia desenvolvida no Laboratório de Micologia Fitopatológica consiste no seguinte:

- a) frascos do tipo empregados para antibióticos, com capacidade para 6 ml são preenchidos com 4 ml de água destilada, tampados com algodão e autoclavados a 121° sob 1 atm por 30 minutos;
- b) repicagem dos fungos para os frascos com água em câmara asséptica retirando os tampões de algodão e transferindo-se pedaços de meio de cultura contendo micélio dos fungos a serem preservados (FIGUEIREDO, 2001).

Armazenamento de fungos em água destilada estéril pode ser menos exigente em termos tecnológicos das técnicas de preservação, porém, este método é útil para muitos fungos, mas pode ser especialmente usado por todos aqueles que necessitam de preservar os fungos que não podem ser liofilizados, como os Oomycetos, por exemplo, (CLARK; DICK, 1974). Este método tem sido utilizado com sucesso em uma grande variedade de fungos, incluindo patógenos humanos ou de plantas. (CASTELLANI, 1967; FIGUEIREDO; PIMENTEL, 1975).

A viabilidade de alguns fungos tem sido documentada por até 20 anos com este método (CAPRILES; MATA; MIDDELVEEN, 1989), embora muitos fungos percam viabilidade muito mais cedo. Nenhuma literatura descreve especificamente o uso desta técnica para entomopatógenos, mas pode ser usado com o Entomophthorales (HUMBER, 1990). Esta técnica de armazenamento é provavelmente, adequada para quase todos os patógenos de invertebrados.

Os problemas mais graves desta técnica são facilmente evitados. Inóculo demais para o volume de água pode comprometer a capacidade do fungo para suportar armazenamento em longo prazo, o que pode ser evitado pelo uso de um volume de água pelo menos 40 vezes maior do que os blocos de inóculo. Evaporação da água de tubos mal lacrados durante o armazenamento pode ser superada pela adição de água estéril periodicamente (HUMBER, 1990).

As vantagens apresentadas pelo método são as seguintes:

- a) manter-se a viabilidade das culturas por longos períodos de tempo sem a necessidade de repicagens;
- b) evitar-se o problema de infecção por ácaros;
- c) baixo custo do processo, uma vez que substituiu meios de cultura dispendiosos por água destilada e não necessita de equipamentos sofisticados;
- d) são conservadas as características morfológicas e fisiológicas dos fungos cultivados;
- e) podem ser empregados para preservação de um grande número de gêneros e espécies de fungos, em suas formas anamórficas ou teleomórficas. (mono ou dicarióticas) (FIGUEIREDO, 2001).

2.2.3 Repique contínuo

O repique contínuo, também chamado de sub-cultura ou repicagem periódica, é uma das técnicas de conservação mais antigas, mas ainda bastante utilizada.

A maioria das culturas de fungos pode ser mantida por repique contínuo. O método é simples, barato e amplamente utilizado. Embora o consumo de tempo e de trabalho, o repique contínuo é uma boa opção para pequenas coleções de culturas em constante utilização por períodos curtos (menos de 1 ano). O método também tem várias desvantagens, as culturas devem ser verificadas com frequência por motivos de contaminação por ácaros ou outros microrganismos e para evitar a secagem do meio. Além disso, a morfologia e fisiologia de um fungo cultivado podem mudar ao longo do tempo. Em particular, a capacidade de esporular ou para infectar um hospedeiro pode ser perdida após transferências repetidas.

Devido a essas desvantagens, a técnica é geralmente inadequada para longo prazo (mais de 1 ano) de preservação das culturas. No repique contínuo o inóculo é transferido de uma cultura de fungo para tubos de ensaio (com tampa de rosca ou conectado com algodão ou espuma) ou placas de Petri (envolvido com Parafilm para reduzir a secagem) contendo um meio de escolha. Alternância de meios ricos em nutrientes e meios com baixo teor de nutrientes no meio de cultura, a cada transferência ajuda a manter culturas saudáveis. Alguns fungos, tais como endofíticos e entomopatogênicos, têm exigências específicas de meios de cultura. (NAKASONE; PETERSON; JONG, 2004).

Embora esse método clássico de repicagens periódicas e constantes em meios naturais ou artificiais, sólidos ou líquidos seja imensamente trabalhoso e exigente no que se refere a material humano especializado, não pode ser deixado a margem. Por essa técnica milhares de organismos têm sido mantidos viáveis por dezenas de anos em todo o mundo e consiste no único método recomendado para manutenção de certos grupos de fungos cuja natureza não permite a aplicação de outras técnicas (FIGUEIREDO, 2001).

2.3 Microrganismos deterioradores de alimentos

Como definição, pode-se dizer que a deterioração é quando o alimento se torna impróprio ao consumo humano, a deterioração não significa decomposição ou putrefação, necessariamente, podendo ser causada, também, por alterações microbiológicas, invasão de insetos, reações enzimáticas e oxidativas intrínsecas do alimento (SILVA, 1999).

Segundo Brackett (1997) as alterações microbiológicas podem ser classificadas como pré-colheita ou de campo e alterações pós-colheita. Todavia estas classificações podem levar a equívocos, visto que algumas alterações podem iniciar no período de pré-colheita, mas serem agravadas na pós-colheita.

Por isto, outra forma de classificar as alterações microbiológicas seria mediante os sintomas apresentados (podridão úmida, podridão branda aquosa e podridão negra). Entretanto, mais uma vez a classificação deixa dúvida, pois o mesmo microrganismo pode produzir diversas alterações e diferentes microrganismos podem provocar as mesmas lesões. Assim, a melhor forma de classificar as alterações microbiológicas é a descrição do tipo de alteração pelo sintoma, complementada com o nome do microrganismo envolvido.

Os microrganismos empregam diversos mecanismos para suplantar as defesas naturais das plantas. (PORTE; MAIA, 2001). Um dos principais é a produção de enzimas pectinolíticas, como a pectinametilesterase e a poligalacturonase, e em segundo plano, hemicelulases, celulasas e proteinases. Estas enzimas causam a liquefação dos tecidos, sendo que os microrganismos mais comuns que produzem estas enzimas são a *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas marginalis*, *Botrytis sp.* *Alternaria sp.* *Fusarium sp.* e *Colletotrichum sp.* (BRACKETT, 1997). Não apenas o *P. marginalis*, mas o gênero *Pseudomonas sp.* são produtores de pectinases (NGUYEN-THE; CARLIN, 1994), o que significa que frutas e hortaliças são alvos destas enzimas deterioradoras microbianas.

2.4 Fungos

Os fungos são organismos eucariontes, aclorofilados, heterotróficos, geralmente filamentosos, obtêm seu alimento por absorção, podem ser macro ou microscópicos, propagam-se por meio de esporos e armazenam glicogênio como fonte de reserva. São organismos largamente distribuídos na natureza como no ar, na água, no solo e podem crescer nos mais diversos substratos. (GUERREIRO; SILVEIRA, 2003; PELCZAR; CHANG; KRIEG, 1996; PUTZKE; PUTZKE, 1998; TANIWAKI; SILVA, 2001).

Desde os tempos antigos, os seres humanos têm usado os fungos (bolores, leveduras) na produção de alimentos, incluindo queijos, pão, salame, cerveja e vinho. Doenças misteriosas em combinação com o consumo alimentar, levaram a primeira legislação, esforços e inspeções de qualidade dos produtos alimentares. As mais antigas das legislações de alimentos conhecidas foram promulgadas pelos babilônios (1.700 aC, o código de Hamurabi) e Hititas (~1500 aC). Ambas as legislações já estavam lidando com os dois objetivos importantes de nossas leis da alimentação moderna: a proteção da saúde e prevenção de fraudes (ASAO et al., 1963).

Os fungos são os principais contaminantes dos alimentos no mundo. De acordo com Sibanda, Marovatsanga e Petstka (1997) e Boysen, Jacobsson e Schnurer (2000) a infestação de alimentos por fungos pode resultar na deterioração da qualidade notável rápida. Como uma consequência dessa perda de qualidade, a rentabilidade e eficácia de utilização dos alimentos são consideravelmente reduzidos.

Os esporos dos fungos são abundantes e amplamente encontrados na natureza, germinam rapidamente no solo, em plantas, em alimentos, em papel e até em vidros. Os alimentos armazenados representam excelente campo para a proliferação dos fungos, principalmente quando os princípios básicos de secagem adequada e armazenamento correto são desconhecidos ou desprezados. (FONSECA, 2006).

Fungos podem promover prejuízos significativos aos alimentos. Quando presentes em sementes ocasionam perda do poder germinativo. No arroz e na manteiga de cacau afetam a qualidade, promovendo descoloração, e no café produzem aromas desagradáveis. Podem ainda, alterar as condições físicas dos produtos, reduzir o valor nutritivo, alterar o aspecto externo, produzir micotoxinas e favorecer a ação de outros agentes de deterioração, como leveduras, bactérias e insetos. (FONSECA, 2006).

2.5 Micotoxinas

Os fungos ao contaminarem os alimentos podem produzir substâncias tóxicas tais como micotoxinas. Os alimentos estão sujeitos à contaminação por substâncias altamente tóxicas, cuja ingestão é capaz de causar sérios transtornos no organismo do homem e dos animais. Entre as diversas substâncias capazes de provocar danos à saúde estão as micotoxinas, que são produzidas em condições favoráveis e representam relevante perigo ao ser humano (SABINO, 1996).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por microfungos que são capazes de causar doenças e morte em humanos e outros animais. Por causa de sua atividade farmacológica, algumas micotoxinas ou derivados de micotoxinas encontraram o uso de antibióticos, promotores de crescimento, e outros tipos de drogas, outros ainda têm sido implicados como agentes de guerra química. As micotoxinas são produzidas durante o metabolismo secundário de fungos filamentosos e podem estar presentes em alimentos podendo ameaçar a inocuidade dos mesmos. Mais de 200 substâncias já foram identificadas como micotoxinas, sendo as aflatoxinas, os tricotecenos, as fumonisinas, a zearalenona, a ocratoxina A, os alcalóides do *ergot* e a patulina as mais estudadas (BENNETT; KLICH, 2003).

Metabólitos secundários são definidos de maneiras diferentes por diferentes autores. Em geral, eles são compostos de baixo peso molecular compostos sintetizados por fungos filamentosos e são capazes de causar doença e morte em plantas, animais e os seres humanos. (BENNETT; KLICH, 2003).

Os fungos são organismos aeróbios, que dependem do oxigênio para sobrevivência e, portanto, eles têm que lidar com as conseqüências de sua presença, ou seja, a formação de espécies reativas de oxigênio. Esses compostos reativos são formados durante processos metabólicos, tais como a respiração da glicose e ácidos graxos, pela atividade de oxidases NADPH e outros oxigenases.

No entanto, sua produção também pode resultar de estresse ambiental (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007), as condições em que a célula pode produzir espécies reativas de oxigênio tais como superóxido, radicais de hidroxila, peróxido de hidrogênio, ou oxylipins¹ a partir de ácidos graxos insaturados (DOWLING; SIMMONS, 2009).

Alguns metabólitos secundários são sintetizados por fungos durante as transições morfológicas e metabólicas, precisamente quando um acúmulo de espécies de oxigênio ocorre. Foi relatado com *Neurospora crassa* (AGUIRRE et al., 2005; LLEDIAS; RANGEL; HANSBERG, 1999) e *Aspergillus parasiticus* (REVERBERI et al., 2008), que uma explosão de espécies de oxigênio é produzida na transição de conídios para o crescimento de hifas durante a germinação de conídios, e de crescimento micelial para conidiogênese. Esses eventos estão associados com o início da biossíntese de toxinas em *A. parasiticus* (FANELLI et al., 2004).

As micotoxinas são responsáveis por causar micotoxicoses que são ocasionadas pela ingestão de alimentos ou rações contaminados com micotoxinas ou pela inalação destas em forma de partículas suspensas, principalmente em locais onde os alimentos contaminados são tratados ou manipulados. A severidade das micotoxicoses depende da toxicidade da micotoxina, da extensão da exposição, do estado nutricional do indivíduo e dos efeitos sinérgicos com outros agentes químicos ou biológicos (PERAICA et al., 1999).

Algumas micotoxinas podem causar doenças auto-imunes, têm propriedades alergênicas, e algumas delas são teratogênicas, carcinogênicas e

¹ Oxylipins constituem uma família de oxigenado produtos naturais que são formados a partir de ácidos graxos por vias envolvendo pelo menos um passo do di-oxigênio-dependente de oxidação.

mutagênicas, etc. (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGYAS, 2003).

Informações sobre fungos associados principalmente com grãos de cereais e sementes oleaginosas são importantes para avaliar o potencial risco de contaminação por micotoxinas. Uma série de espécies de fungos associados a estes produtos pertencentes principalmente aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, foram notificados como produtores de micotoxinas que causam micotoxicoses em animais domésticos e no homem, em um estudo realizado por Pacin et al. (2003) com arroz, soja e milho recém-colhidos provenientes de explorações agrícolas de fazendas das regiões costeiras e de montanha, no Equador.

Dentre as micotoxinas mais encontradas e de grande potencial toxigênico destacam-se as ocratoxinas e a aflatoxinas. A ocratoxina A (OTA) é produzida pelos fungos *Penicillium verrucosum* Dierckx e *P. nordicum* Dragoni e Cantoni (LARSEN; SVENDESEN; SMEDSGAARD, 2001) e um número variado de espécies do gênero *Aspergillus*, como o *Aspergillus ochraceus* G. Wilh., *A. ostianus* Wehmer, *A. auricomus* (Grég) Saito, *A. sulphureus* Desm., *A. carbonarius* (Bainier) Thom, *A. niger* Tiegh. e *A. sclerotiorum* G.A, Huber. (ABARCA et al., 2000; BATISTA et al., 2003; CHALFOUN; BATISTA, 2006 FRISVAD et al., 2004; SAMSON et al., 2004).

A OTA é um perigo freqüente para os seguintes produtos: cevada, trigo, cerveja, vinho, carnes, cacau, alimentos infantis, ração animal, milho, aveia, centeio, figo, sangue e rins de suínos e outros tecidos de origem animal. (WILSON; MUBATANHEMA; JURJEVIC, 2002). De acordo com o JECFA Joint WHO/FAO Committee on Food Additives, o nível de ingestão tolerável de OTA tem sido estimado em 100 ng por Kg peso corpóreo por semana. Entretanto, o Comitê Científico sobre Alimentos da União Européia (EC), recomenda que o nível de OTA seja reduzido o máximo possível, próximo de 5

ng (Kg peso corpóreo) por dia. O limite máximo de OTA para cereais (5,0 µg/Kg) e seus subprodutos (3,0 µg/Kg) tem sido estabelecido pela Comissão de Regulamentação da União Européia EC n. 472 (COMMISSION..., 2002). Na América Latina, 19 países dispõem de legislação para micotoxinas, representando quase 91% da população continental. A legislação para aflatoxinas encontra-se harmonizada no Mercosul, englobando a Argentina, o Brasil, o Paraguai e o Uruguai. O Uruguai possui a mais detalhada legislação da América Latina, com limites para os alcalóides ergóticos em rações, o que é inédito em qualquer legislação no mundo. No continente sul-americano, a legislação cobre, especialmente, as seguintes micotoxinas, em alimentos e em algumas rações: aflatoxina B1, aflatoxinas B1/G1, aflatoxinas totais (B1+B2+G1+G2), fumonisina B1, desoxinivalenol, ocratoxina A, patulina e a zearalenona. (Tabela 1) (FREIRE et al., 2007).

Freire e outros autores apresentam a seguinte Tabela com a legislação para micotoxinas em alimentos e rações na América Latina (FREIRE et al., 2007):

Continentes	Micotoxinas	Substrato/limite
América Latina	Alcalóides ergóticos(2)	Alimentos: B1+B2+G1+G2: 20 ppb Amendoim com ou sem casca, cru ou tostado, pasta e manteiga
	Afl. B1(3)	de amendoim: B1+B2+G1+G2: 2 ppb
	Afl. B1+G1(1)	Milho em grão, farelo de milho, farinha e sêmolos:
	Afl. M1(1)	
	Afl. B1+B2+G1+G2(3)	B1+B2+G1+G2: 20 ppb
	Desoxinivalenol(3)	Leite fluido : M1: 0,5 ppb
	Fumonissina B1(1)	Leite em pó: M1: 5 ppb
	Ocratoxina A(1)	Alimentos infantis: B1:0 ppb
	Patulina(1)	Leite fluido e em pó: M1: 0,05 ppb
	Zearalenona(3)	Produtos lácteos: M1: 0,5 ppb Alimentos e especiarias: B1+B2+G1+G2: 20 ppb Produtos de soja, amendoim, frutas secas: B1+B2+G1+G2: 30 ppb Cacau em grão: B1+B2+G1+G2: 10 ppb Alimentos infantis industrializados: B1+B2+G1+G2: 3 ppb Milho e cevada: Zearalenona: 200 ppb Sucos de frutas: Patulina: 50 ppb Arroz, café, cevada e milho: Ocratoxina A: 50 ppb Rações: B1: 20ppb; B1+B2+G1+G2: 50 ppb Farinha de arroz: B1+B2+G1+G2: 5 ppb

Tabela 1 Legislação para micotoxinas em alimentos e rações na América Latina [adaptado de FAO(2003) e do site www.micotoxinas.com.br]

Com base em estudos realizados em animais, a OTA é facilmente absorvida pelo trato gastrointestinal, principalmente no duodeno e jejuno. (GALTIER, 1978). Quando absorvido, ele tem uma forte ligação, afinidade por proteínas plasmáticas. Nos seres humanos, ocratoxina A interage principalmente com o rim, mas, quando presente em altas doses, ela interage com outros órgãos do fígado, baço e/ou o sistema imunológico. (STORMER; LEA, 1995).

A toxicidade da ocratoxina A envolve vários mecanismos: (MARQUARDT; FROHLICH, 1992) como a inibição da síntese proteica através da competição com a reação de aminoacilação da fenilalanina catalisada pela Phe-tRNA sintetase, resultando na prevenção de proteína, bem como a síntese de DNA e RNA, e também a interrupção da homeostase do cálcio hepático microsomal, ao alterar as membrana do retículo endoplasmático através de peroxidação lipídica. Ocratoxina A produz nefrotoxicidade, dano hepático leve, imunossupressão enterititis, teratogênese e carcinogênese (tumores nos rins) (SMITH; MOSS, 1985).

Aflatoxinas são metabólitos secundários do *Aspergillus flavus*, responsáveis por intoxicações e têm se mostrado cancerígenas a diversas espécies de animais (WOGAN, 1966; BUTLER, 1974). Devido a essa característica, o estudo das aflatoxinas tem sido alvo de atenção nunca devotada a nenhum outro problema relacionado a fungos (CHRISTENSEN, 1975). Vários gêneros e espécies de fungos já foram relatados como produtores de aflatoxinas, porém, atualmente, pode-se dizer que os grandes produtores pertencem às espécies *A. flavus* e *Aspergillus parasiticus*, ambas pertencentes ao grupo-espécie *A. flavus* (RAPER; FENNEL, 1965). O gênero *Aspergillus* pertence ao grupo dos Hyphomycetos que se caracteriza pela formação de conidióforos, ou seja, hifas especializadas e produtoras de conídios com formas e arquitetura variáveis. (PITT; HOCKING, 1997).

A presença de micotoxinas em alimentos é um sério problema para saúde pública e para a qualidade dos alimentos. Por muitos anos, os fungos foram conhecidos pela sua capacidade de produzir metabólitos tóxicos, porém os seus efeitos foram largamente ignorados, tornando as micotoxicoses negligenciadas. Esta situação foi alterada drasticamente após 1960, com a doença X dos perus, quando a atenção mundial se concentrou sobre as micotoxinas. A rapidez na identificação e caracterização das aflatoxinas e a

demonstração da aflatoxina B₁ como um carcinógeno extremamente potente ao ser humano e animal, impulsionaram esta mudança. (GOLDBLATT, 1969).

O maior problema decorre da ação crônica das aflatoxinas no homem, pois além da alteração do crescimento em jovens e crianças, ocasionam distúrbios neurológicos, imunológicos e o aparecimento de câncer hepático (HUSSEIN; BRASEL, 2001). O risco da população se deve aos seus efeitos carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos e hepatotóxicos. (INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 1979).

Dados epidemiológicos demonstram uma associação das aflatoxinas com a síndrome de Reye e o Kwashiorkor (OLIVEIRA; GERMANO, 1997). A aflatoxina B₁ é considerada um potente carcinógeno pertencente ao grupo 1 segundo classificação da *International Agency for Research on Cancer – IARC*. (PAPP et al., 2002).

A exposição humana as micotoxinas pelo consumo de alimentos contaminados é uma questão de saúde pública em todo mundo, além de acarretarem milhões de dólares em prejuízos anualmente, gastos com a saúde humana, animal e produtos agrícolas (FONSECA, 1976; HUSSEIN; BRASEL, 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras de alimentos

As amostras foram obtidas no mercado varejista da cidade de Lavras-MG, fazendo parte da mesma, alimentos não processados com sinais de deterioração (pêra, batata, uva, castanha-do-Pará, amendoim, trigo) e alimentos processados ainda dentro do prazo de validade (milho enlatado, linhaça, uva passas e amendoim) conforme observado no Quadro 1. As amostras obtidas foram transportadas até o Laboratório da EPAMIG/URES M na Universidade Federal de Lavras onde foram realizadas as análises microbiológicas.

Quadro 1 Fungos obtidos e origem

FUNGOS	ORIGEM
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Café
<i>Aspergillus niger</i>	Uva
<i>Aspergillus niger Agregados</i>	Café
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Batata
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Castanha-do-Brasil
<i>Aspergillus versicolor</i>	Café
<i>Aspergillus flavus</i>	Castanha-do-Brasil
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Café
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Amendoim
<i>Penicillium citrinum</i>	Trigo
<i>Penicillium commune</i>	Micoteca EPAMIG/CTSM
<i>Penicillium expansum</i>	Café

3.2 Análise microbiológica

As análises das amostras foram feitas por meio de plaqueamento direto, que consistiu em retirada de fragmentos da área lesionada dos alimentos ou a amostra de forma integral, transferindo-os asépticamente para placas de Petri com meio BDA (Batata Dextrose Agar). Uma vez realizado os plaqueamentos, as placas foram mantidas em BOD com temperatura de 25° C e fotoperíodo de 12 horas, por 5 dias. Após esse período os microrganismos foram purificados, caracterizados, identificados e armazenados.

3.3 Caracterização

A caracterização foi realizada através de características macroscópicas e microscópicas, sendo que entre as características macroscópicas avaliadas encontram-se coloração e diâmetro das colônias, presença ou ausência e coloração de escleródios, coloração do reverso da colônia em diferentes meios, dentre outros.

Entre as características microscópicas estudadas encontram-se comprimento dos conidióforos, forma e tamanho dos conídios, textura dos conídios e conidióforos.

A identificação das espécies dos gêneros *Aspergillus* foi de acordo com Klich (2002) e Christensen (1982); do gênero *Penicillium* de acordo com Pitt (1988), Pitt e Hocking (1997), e Samson e outros (2004), onde selecionou-se apenas os fungos com potencial toxigênico (Quadro 2).

Quadro 2 Fungos e micotoxinas potencialmente produzidas

FUNGOS	PRINCIPAIS MICOTOXINAS
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Ocratoxina A
<i>Aspergillus niger</i>	Ocratoxina A
<i>Aspergillus niger</i> Agregados	Ocratoxina A
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ocratoxina A
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxina B1, B2, G1, G2
<i>Aspergillus versicolor</i>	Esterigmatocistina
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxina B1, B2
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Auranthine, ácido penicílico
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Roquefortina C
<i>Penicillium citrinum</i>	Citrinina
<i>Penicillium commune</i>	Ácido cyclopaldic
<i>Penicillium expansum</i>	Patulina

Fonte: Illustrated Manual on Identification of Some Seed-borne Aspergilli, Fusaria, Pencillia and Their Mycotoxins

3.4 Determinação do potencial toxigênico dos microrganismos isolados

De acordo com os gêneros e espécies de microrganismos identificados foi verificado o potencial toxigênico daqueles que já se encontram relatados como produtores de micotoxinas, foi utilizado Método Plug Agar, onde os isolados fúngicos testados da seção *Circundati* e *Flavi* foram inoculados em meio YES (Yeast Extract Sucrose Agar) e os fungos da seção *Nigri* foram inoculados em CYA (Czapek Yeast Agar) por 7 dias a 25°C, conforme Filtenborg e Frisvad (1980). Foram utilizados padrão de OTA e padrões de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ da Sigma Company, Placas de Cromatografia de Camada Delgada (Merk-Sílica Gel 60, 20x20) e como Fase móvel TEF-Tolueno Acetato de Etila e Ácido Fórmico 85% (50:40:10). As confirmações quanto a produção de OTA e aflatoxina foram feitas em luz ultravioleta com 366 nm em cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER).

3.5 Métodos de preservação

3.5.1 Liofilização

As amostras dos fungos foram congeladas em duplicata a -80°C em um ultra-freezer, após o congelamento as amostras foram levadas ao liofilizador marca Liotop, modelo L101 (Figura 1), onde a temperatura inicial de estava $-50 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Com a temperatura estabilizada, iniciou o vácuo, com pressão em torno de $650\mu\text{Hg}$, após 48 horas finalizou a liofilização com pressão entorno de $150\mu\text{Hg}$.

A cada dois meses os fragmentos liofilizados (Figura 2) eram retirados e colocados em meio MA2% para teste de viabilidade, e os fungos revelados como toxigênicos eram também colocados em meio específico para teste de potencial toxigênico.



Figura 1 Liofilizador marca Liotop, modelo L101



Figura 2 Discos de micélio liofilizados das amostras fúngicas

3.5.2 Água destilada estéril

Foi realizada a inoculação de frascos de vidro, contendo água destilada esterilizada, com pequena porção do meio de cultura (aproximadamente 5 mm x 10mm), com o fungo a preservar. Os frascos empregados foram os mesmo utilizados para antibiótico, com capacidade para 6 ml, preenchidos com 4ml de água destilada, selados com rolhas próprias de borracha e autoclavados a 121° sob 1 atm por 30 minutos. Após a autoclavagem foi realizada a repicagem dos fungos em duplicata para os frascos com água em câmara asséptica retirando as rolhas e transferindo-se pedaços de meio de cultura contendo micélio dos fungos para dentro dos frascos (Figura 3).

A cada dois meses os fragmentos eram retirados e colocados em meio MA2% para teste de viabilidade, e os fungos revelados como toxigênicos eram também colocados em meio específico para teste de potencial toxigênico.



Figura 3 Frascos com água destilada estéril e fragmento dos fungos preservados pelo método de Castellani

3.5.3 Repique contínuo

Foi realizada a repicagem dos fungos em duplicata colocados em placas de petri (Figura 4) com meio MA2% seladas com parafilme, as culturas foram estocadas em geladeira à temperatura de 4 a 8°C conforme a literatura , e a cada dois meses os fungos eram repicados para outras placas com meio MA2% para teste de viabilidade, e os toxigênicos eram também colocados em meio específico para teste de potencial toxigênico.



Figura 4 Fungos preservados por repique contínuo em placas de Petri

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste de viabilidade dos isolados fúngicos

Na Tabela 2 pode-se avaliar os isolados fúngicos no tempo 0 isto é, antes de serem submetidos aos testes de preservação, encontrando-se os mesmos viáveis e puros.

Tabela 2 Representa a viabilidade dos isolados fúngicos potencialmente toxigênicos no tempo 0

Fungos	Viabilidade
<i>Aspergillus carbonarius</i>	+
<i>Aspergillus niger</i>	+
<i>Aspergillus niger</i> Agregados	+
<i>Aspergillus ochraceus</i>	+
<i>Aspergillus parasiticus</i>	+
<i>Aspergillus versicolor</i>	+
<i>Aspergillus flavus</i>	+
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	+
<i>Penicillium chrysogenum</i>	+
<i>Penicillium citrinum</i>	+
<i>Penicillium commune</i>	+
<i>Penicillium expansum</i>	+

Pelos dados representados nas Tabelas 2 e 3 observam-se os resultados dos testes de viabilidade dos isolados nos tempos 1, 2, 3 e 4 correspondentes a 2, 4, 6 e 8 meses de preservação pelos métodos de repique contínuo, Castellani e liofilização sendo representado pelo sinal + como viável pelo sinal – como inviável, conforme os resultados obtidos e representados pelas Tabelas 2 e 3 observa-se que os isolados apresentavam viabilidade nos três métodos de preservação.

Na Tabela 3 encontram-se relacionados os isolados fúngicos submetidos a diferentes métodos e períodos de preservação que mostravam-se viáveis por ocasião do início do trabalho

Tabela 3 Análise da viabilidade dos isolados fúngicos

Fungos	tempo 1 (2 meses)			tempo 2 (4 meses)			
	Repetição	Liofilização	Castellani	Repique contínuo	Liofilização	Castellani	Repique contínuo
<i>A. carbonarius</i>	1 e 2	+	+	+	+	+	+
<i>A. niger</i>	1 e 2	+	+	+	+	+	+
<i>A. niger</i> <i>Agregados</i>	1 e 2	+	+	+	+	+	+
<i>A. ochraceus</i>	1 e 2	+	+	+	+	+	+
<i>A. parasiticus</i>	1 e 2	+	+	+	+	+	+
<i>A. versicolor</i>	1 e 2	+	+	+	+	+	+
<i>A. flavus</i>	1 e 2	+	+	+	+	+	+
<i>P.</i> <i>aurantiigriseum</i>	1 e 2	+	+	+	+	+	+
<i>P. chrysogenum</i>	1 e 2	+	+	+	+	+	+
<i>P. citrinum</i>	1 e 2	+	+	+	+	+	+
<i>P. commune</i>	1 e 2	+	+	+	+	+	+
<i>P. expansum</i>	1 e 2	+	+	+	+	+	+

Tabela 3, continuação

Fungos	tempo 3, 6 meses			tempo 4, 8 meses			
	Repetição	Liofilização	Castellani	Repique contínuo	Liofilização	Castellani	Repique contínuo
<i>A. carbonarius</i>	1 e 2	+	+	+	+	+	+
<i>A. niger</i>	1 e 2	+	+	+	+	+	+
<i>A. niger</i> <i>Agregados</i>	1 e 2	+	+	+	+	+	+
<i>A. ochraceus</i>	1 e 2	+	+	+	+	+	+
<i>A. parasiticus</i>	1 e 2	+	+	+	+	+	+
<i>A. versicolor</i>	1 e 2	+	+	+	+	+	+
<i>A. flavus</i>	1 e 2	+	+	+	+	+	+
<i>P.</i> <i>aurantiogriseum</i>	1 e 2	+	+	+	+	+	+
<i>P. chrysogenum</i>	1 e 2	+	+	+	+	+	+
<i>P. citrinum</i>	1 e 2	+	+	+	+	+	+
<i>P. commune</i>	1 e 2	+	+	+	+	+	+
<i>P. expansum</i>	1 e 2	+	+	+	+	+	+

Os fungos, ao contrário da maioria das bactérias, são seres com velocidade de crescimento lento em meios de cultura. Por outro lado, muitas vezes há contaminação bacteriana ou por outros fungos, o que prejudica a conservação das colônias. As técnicas existentes para a manutenção de micotecas são trabalhosas, dispendiosas e muitas vezes ineficientes. O desenvolvimento de novas formas de preservação de fungos por períodos prolongados faz-se necessário (COSTA; FERREIRA, 1991).

Bueno e Gallardo (1998) em um estudo utilizando 26 cepas preservadas pelo método de Castellani durante 2 anos observou a viabilidade de 100% das cepas e sem alterações nas características macroscópicas e morfológicas, demonstrando a eficiência desse método na preservação da viabilidade de culturas fúngicas.

Avaliando os resultados obtidos observa-se que os mesmos estão de acordo com a afirmativa de Cavalcanti (2010) que obteve em seu estudo alta

viabilidade na preservação pelos métodos de Castellani, repique contínuo e liofilização, afirmando também método de Castellani se mostra mais viável na preservação de fungos dimórficos e o método de liofilização se mostra mais eficiente na preservação de leveduras, apresentando taxa de viabilidade de 100% no estudo realizado.

Outras pesquisas desenvolvidas também demonstram as vantagens comparativas entre os métodos de Castellani, liofilização e repique contínuo.

Aparecido e outros (2007) comparando viabilidade de culturas fúngicas preservadas pelos métodos de Castellani e liofilização sugere que o método de Castellani (água destilada) seja mais vantajoso para manter, em laboratório, diferentes gêneros e espécies de fungos, ainda comparando os dois métodos Qiangqiang, Jiajun e Li (1998) comparou a viabilidade de setenta e oito isolados após doze anos, utilizando os métodos de liofilização e Castellani na preservação dos mesmos obtendo como viáveis 89,7% dos isolados preservados pelo método de Castellani e 87,2% dos isolados preservados pelo método de liofilização.

López-Martinez e outros (1999) comparou em um estudo a utilização do método de Castellani e repique contínuo, na preservação de cento e onze cepas de diferentes espécies de microrganismos durante o período de sete anos tendo com resultado, (71,2%) de viabilidade nas cepas preservadas pelo método de Castellani e (77,5%) de viabilidade nas cepas preservada através de repique contínuo.

4.2 Teste de potencial toxigênico dos isolados fúngicos

Durante o presente trabalho foi realizado teste de potencial toxigênico nos tempos 1, 2, 3, e 4 nos fungos revelados como produtores de toxinas e os resultados podem ser observados nas Tabelas 4, 5, 6, e 7 que representa a produção de toxina por cada fungo nos quatro tempos e utilizando os três

métodos de preservação, sendo utilizado + para produtor e – para não produtor de toxina no teste inicial realizado pelo Método Plog Agar foram revelados como toxigênicos os fungos: *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* como produtores de OTA, *Aspergillus parasiticus* como produtor de aflatoxina B1, B2, G1, G2 e *Aspergillus flavus* como produtor de aflatoxina B1, B2.

De acordo com o resultado obtido na Tabela 4 observa-se que não houve produção de OTA pelo *A. carbonarius* apenas no tempo 4 (8 meses) mantido pelo método de liofilização.

Tabela 4 Produção de OTA por *A. carbonarius* submetidos a diferentes métodos de preservação

<i>A. carbonarius</i>				
Método de preservação	tempo 1	tempo 2	tempo 3	Tempo 4
Castelani	+	+	+	+
Liofilização	+	+	+	-
Repique contínuo	+	+	+	+

De acordo com o resultado obtido na Tabela 5 observa-se que a partir do tempo 3 (6 meses) não houve produção de OTA pelo *A. ochraceus* preservado pelo método de Castellani e repique contínuo e no tempo 4 (8 meses) não houve produção de OTA pelo isolado preservado tanto pelos métodos Castellani e repique contínuo quanto pelo método de liofilização.

Tabela 5 Produção de OTA por *A. ochraceus* submetidos a diferentes métodos de preservação

<i>A. ochraceus</i>				
Método de preservação	tempo 1	tempo 2	tempo 3	tempo 4
Castelani	+	+	-	-
Liofilização	+	+	+	-
Repique contínuo	+	+	-	-

De acordo com o resultado obtido na Tabela 6 observa-se que a partir do tempo 3 (6 meses) não houve produção de aflatoxina pelo *A. flavus* preservado pelo método de Castellani e repique contínuo e no tempo 4 (8 meses) não houve produção de OTA pelo isolado preservado tanto pelos métodos Castellani e repique contínuo quanto pelo método de liofilização

Tabela 6 Produção de aflatoxina por *A. flavus* submetidos a diferentes métodos de preservação

<i>A. flavus</i>				
Método de preservação	tempo 1	tempo 2	tempo 3	tempo 4
Castelani	+	+	-	-
Liofilização	+	+	+	-
Repique contínuo	+	+	-	-

De acordo com o resultado obtido na Tabela 7 observa-se que não houve produção de aflatoxina pelo *A. parasiticus* apenas no tempo 4 (8 meses) mantido pelo método de liofilização e Castellani, o isolado preservado por repique contínuo ainda apresentava-se como produtor.

Wei e Jong (1986) testaram em um estudo cepas de *A. flavus* da American Type Culture Collection (ATCC) e observou que as linhagens preservadas pelo método de liofilização, mantiveram suas características originais como produtoras de aflatoxinas.

Taniwaki, Fonseca e Pizzirani-Kleiner (1993) testaram a produção de aflatoxinas por *A. flavus* em diferentes tempos de manutenção por um período de 280 dias e observou que a produção de aflatoxina em linhagens mantidas por repique contínuo diminuiu com o passar do tempo, o que comprova os resultados obtidos nesse trabalho onde o a partir do tempo 3 não foi detectado a produção de aflatoxina por *A. flavus* mantida pelo método de repique contínuo.

Tabela 7 Produção de aflatoxina *A. parasiticus* submetidos a diferentes métodos de preservação

<i>A. parasiticus</i>				
Método de preservação	tempo 1	tempo 2	tempo 3	tempo 4
Castelani	+	+	+	-
Liofilização	+	+	+	-
Repique contínuo	+	+	+	+

Téren e outros (1996) em seu estudo informou que o método plug agar não foi suficientemente sensível para detectar produção de OTA em isolados dos *Aspergillus* da seção Nigri, o que subentende-se que qualquer sensível variação na produção de toxinas pelos isolados, pode ter levado à não detecção pelo Método Plug Agar.

5 CONCLUSÃO

Os métodos de liofilização, Castellani e repique contínuo testados neste trabalho se mostraram eficientes na preservação dos 12 isolados durante os 4 tempos (8 meses), porém é importante ressaltar que os tempos testados correspondem a um período de curta duração, o que sugere a necessidade de estudos mais prolongados.

Em relação à produção de micotoxinas pelos isolados fúngicos nos diferentes tempos de preservação observou-se que os isolados responderam de maneira variada em relação aos métodos de preservação o que sugere a utilização de métodos específicos para cada fungo toxigênico. Sugere-se também a utilização de outro método de terminação de potencial toxigênico, além do Método Plug Agar, pois a variação na produção de toxina pode não ser detectada pelo método, interferindo diretamente nos resultados.

Baseando-se no fato de que a produção de micotoxina é considerada mecanismo de defesa dos fungos, a ausência de outros microrganismos que atuariam como eventuais competidores pode ter induzido a redução da capacidade de alguns dos microrganismos testados quanto à produção de toxina.

Em relação aos métodos utilizados no presente trabalho, indica-se o método de Castellani como o mais vantajoso dentre os três métodos utilizados, pois além de ter alta taxa de viabilidade e preservar as características dos isolados, o mesmo se trata de um método simples, de baixo custo e que não necessita da utilização de energia elétrica, não sendo assim afetado por qualquer circunstância devido a falta de eletricidade.

REFERÊNCIAS

ABARCA, M. L. et al. Hongos productores de micotoxinas emergentes. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 17, p. 63-68, Jun. 2000.

ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de micro-organismos do UniCEUB. **Universitas Ciências da Saúde**, Brasília, v. 2, n. 2, p. 236-251, 2004.

AGUIRRE, J. et al. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 13, n. 3, p. 111–118, Mar. 2005.

APARECIDO, C. C. et al. Divulgação técnica: avaliação da viabilidade de culturas fúngicas preservadas pelos métodos de Castellani (água destilada) e liofilização. **Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 5-8, jan./jun. 2007.

ASAO, T. et al. Aflatoxins B and G. **Journal of the American Chemical Society**, Amsterdam, v. 85, p. 1706-1707, 1963.

BATISTA, L. R. et. al. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 293-300, Aug. 2003.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 3, p. 497-516, July 2003.

BOYSEN, M. E.; JACOBSSON, K.-G.; SCHNURER, J. Molecular identification of species from the *Penicillium roqueforti* group associated with spoiled animal feeds. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 4, p. 1523–1526, Apr. 2000.

BOZOGLU, T. F.; ÖZILGEN, M.; BLAKIR, U. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying, **Enzyme and Microbiology Technology**, New York, v. 9, n. 9, p. 531–537, Sept. 1987.

BRACKETT, R. E. Alteración microbiológicas y microorganismos patógenos de frutas y hortalizas refrigeradas mínimamente procesadas. In: WILEY, R. C. **Frutas y hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas**. Zaragoza: Acribia, 1997. p. 263-304.

BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 71, n. 2, p. 139-144, Dec. 2001.

BUENO, L.; GALLARDO, R. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, n. 15, p. 166-168, May 1998.

BUTLER, W. H. Aflatoxin. In: PURCHASE, I. F. H. (Ed.). **Micotoxins**. Amsterdam: Elsevier, 1974. p. 1-28.

CAMEOTRA, S. S. Preservation of microorganisms as deposits for patent application. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 353, n. 4, p. 849-850, Feb. 2007.

CANHOS, V. P. Centros de recursos biológicos: suporte ao desenvolvimento científico e inovação tecnológica. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 27-29, jul./set. 2003.

CANHOS, V. P. et al. O papel da Sociedade Brasileira de Microbiologia no suporte à consolidação da Rede Brasileira de Coleções de Culturas de Microorganismos. **Microbiologia in Foco**, São Paulo, v. 2, p. 40-48, 2007.

CANHOS, V. P.; VAZOLLER, R. F.; SOUZA, R. D. F. Diretrizes e estratégias para a melhoria das coleções microbiológicas brasileiras, tendo como meta a implantação e consolidação da Rede Brasileira de Centros de Recursos Biológicos no horizonte de 10 anos. In: KURY, A. B. (Ed.). **Diretrizes e estratégias para a modernização de coleções biológicas brasileiras e a consolidação de sistemas integrados de informação sobre biodiversidade**. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2006. Cap. 4, p. 213-240.

CAPRILES, C. H. de; MATA, S.; MIDDELVEEN, M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 106, n. 3, p. 73-80, June 1989.

CASTELLANI, A. A Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water: further researches. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, Mclean, v. 70, p. 181-184, 1967.

CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 225-226, May 1939.

CAVALCANTI, S. D. B. **Aplicação de metodologias de preservação e caracterização de fungos na coleção de culturas do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 2010. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. Incidência de Ocratoxina A em diferentes frações de grãos de café (*Coffea Arabica* L.). **Coffee Science**, Lavras, v. 1, n. 1, p. 28-35, 2006.

CHRISTENSEN, C. M. **Molds, mushrooms and mycotoxins**. Minneapolis: University of Minnesota Press, 1975.

CHRISTENSEN, C. M. The *Aspergillus ochraceus* group: two new species from western soils and a synopticon. **Mycologia**, New York, v. 74, n. 2, p. 210-225, Mar./Apr. 1982.

CLARK, G.; DICK, M. W. Long-term storage and viability of aquatic Oomycetes. **Transactions of the British Bryological Society**, London, v. 63, p. 611-612, 1974.

COMMISSION Regulation (EC) 472/2002: amending regulation (EC) 466/2001 setting maximum level for certain contaminants in food stuffs. **Official Journal of the European Communities**, Brussels, v. 45, p. L 86/5-L 86/6, Mar. 2002.

CONSERVAÇÃO de microorganismos. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2008. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/conservacao-de-microrganismos-pdf-a23612.html>>. Acesso em: 17 mar. 2010.

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microorganismos. **Revista Brasileira de Microbiologia**, Rio de Janeiro, v. 22, p. 263-268, 1991.

COSTA, E. et al. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze drying. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, n. 5, p. 793–800, Nov. 2000.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGYS.
Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems task force report. Ames: Council for Agricultural Science and Technology, 2003.

DIOGO, H. C.; SARPIERI, A.; PIRES, M. C. Preservação de fungos em água destilada. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 6, dez. 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962005000700004&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 23 nov. 2010.

DONEV, T. **Methods for conservation of industrial microorganisms**. Sofia: National Bank for Industrial Microorganisms and Cell Cultures, 2001.

DOWLING, D. K.; SIMMONS, L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in the life-history evolution. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological sciences**, London, v. 22, n. 276, p. 1737–1745, May 2009.

FANELLI, C. et al. Aflatoxins and ochratoxins in cereal grains: an open challenge. **Recent Research Developments in Crop Science**, Kerala, v. 1, p. 295–317, 2004.

FARIAS, A. X.de et al. Contaminação endógena por *Aspergillus spp.* em milho pós-colheita no Estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 3, mar. 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2000000300018&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 31 mar. 2010.

FEOFILOVA, E. P. et al. Species composition of food-spoiling mycelial fungi. **Microbiology**, New York, v. 78, n. 1, p. 112-116, Feb. 2009.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 2000. (SISVAR 4. 1 - Pacote Computacional).

FIGUEIREDO, M. B. Métodos de preservação de fungos patogênicos. **Biológico**, São Paulo, n. 1-2, p. 73-82, jan. 2001.

FIGUEIREDO, M. B.; PIMENTEL, C. P. V. Metodos utilizados para conservação de Fungos na micoteca da seção de micologia fitopatológica do Instituto Biológico. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 1, n. 1, p. 299-302, Jan. 1975.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 13, p. 128-130, 1980.

FONSECA, H. Estudo da aflatoxina no amendoim, da colheita à industrialização. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Piracicaba, v. 33, p. 365-405, 1976.

FONSECA, H. Os fungos e a deterioração de alimentos. **Micotoxinas Online**, Piracicaba, n. 4, 2006. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>>. Acesso em: 13 jun. 2011.

FREIRE, F. das C. O. et al. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, Fortaleza, n. 110, p. 1-48, out. 2007.

FRISVAD, J. C. et al. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 50, p. 23-43, 2004.

GALTIER, P. Contribution of pharmacokinetic studies to mycotoxicology ochratoxin A. **Veterinary science communications**, Amsterdam, v. 1, p. 349-358, Dec. 1978.

GOLDBLATT, L. A. (Ed.). **Aflatoxin scientific background, control, and implications**. New York: Academic Press, 1969.

GUERREIRO, R. T.; SILVEIRA, R. M. B. **Glossário ilustrado de fungos: termos e conceitos aplicados à micologia**. 2. ed. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen is a toxic gas—an introduction to oxygen toxicity and reactive species. In: HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. (Ed.). **Free radicals in biology and medicine**. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, 2007. p. 1–29.

HUMBER, R. A. Fungi: preservation of cultures. In: LACEY, L. (Ed.). **Manual of techniques in insect pathology**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 269–280.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, Limerick, v. 167, n. 2, p. 101-134, Oct. 2001.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY.
Environmental health criteria 11: mycotoxins. Geneva: UNEP/WHO, 1979.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002.

KOPPEN, R. et al. Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 86, n. 6, p. 1595-1612, May 2010.

LARSEN, T. O.; SVENDESEN, A.; SMEDSGAARD, J. Biochemical of ocratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 8, p. 3630-3635, Aug. 2001.

LIMA, R. F. et al. Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* dimorphism of *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, and *Paracoccidioides brasiliensis* isolates after preservation in mineral oil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, n. 7, p. 445-449, 2004.

LLEDIAS, F.; RANGEL, P.; HANSBERG, W. Singlet oxygen is part of a hyperoxidant state generated during spore germination. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, n. 11-12, p. 1396-1404, June 1999.

LÓPEZ-MARTINÉZ, R. et al. Comparative study of two culture conservation methods in medical mycology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 15, p. 471-474, 1999.

MARQUARDT, R. R.; FROHLICH, A. A. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 12, p. 3968-3988, Dec. 1992.

MIYAMOTO-SHINOHARA, Y. et al. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. **Cryobiology**, San Diego, v. 41, n. 3, p. 251-255, Nov. 2000.

NAKASONE, K. K.; PETERSON, A. W.; JONG, S. Preservation and distribution of fungal cultures. In: MUELLER, G. M.; BILLS, G. F.; FOSTER, M. S. **Biodiversity of fungi, inventory and monitoring methods**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. p. 37-47.

NGUYEN-THE, C.; CARLIN, F. Microbiology of minimally processed fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 34, n. 4, p. 371-401, 1994.

NJOBEH, P. B. et al. Contamination with storage fungi of human food from Cameroon. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 135, n. 3, p. 193-198, Nov. 2009.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 417-424, ago. 1997.

PACIN, A. M. et al. Fungi associated with food and feed commodities from Ecuador. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 156, n. 2, p. 87-92, 2003.

PAPP, E et al. Liquid chromatographic determination of aflatoxins. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 73, n. 1-2, p. 39-46, Oct. 2002.

PELCZAR, M. J.; CHANG, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações: volume 2**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

PERAICA, M. et al. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin World Health Organization**, New York, v. 77, n. 9, p. 754-766, 1999.

PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. 2. ed. Australia: CSIRO Food, 1988.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2. ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997.

PORTE, A.; MAIA, L. H. Alterações fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas de alimentos minimamente processados. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 105-118, 2001.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos: volume 1**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 1998.

QIANGQIANG, Z.; JIAJUN, W; LI, L. Storage of fungi using sterile distilled water orlyophilization: comparison after 12 years. **Mycoses**, Berlin, v. 41, n. 5-6, p. 255-257, May/June 1998.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore: Williams & Wilkins, 1965.

REVERBERI, M. et al. Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for the ApyapA gene. **Eukariot Cell**, Washington, v. 7, n. 6, p. 988-1000, June 2008.

ROMEIRO, R. da S. **Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1996.

SABINO, M. Micotoxinas em alimentos. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 461-471.

SAMSON, R. A. et al. **Introduction to food and airborne fungi**. 6. ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000.

SAMSON, R. A. et al. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 50, p. 23-43, 2004.

SIBANDA, L.; MAROVATSANGA, L. T.; PETSTKA, J. J. Review of mycotoxin work in sub-Saharan Africa. **Food Control**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 21–29, Feb. 1997.

SILVA, E. N. da. **Tecnologia avançada de carnes e derivados: contaminação e deterioração da carne**. Campinas: Universidade de Campinas, 1999. (Roteiro de Aula).

SINGH, K. et al. **An illustrated manual on identification of some seed-borne Aspergilli, Fusaria, Penicillia and their mycotoxins**. Hellerup: Danish Government Institute of Seed Pathology and Department of Biotechnology, 1991.

SKERMAN, V. B. D. The organization of a small general culture collection. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CONFERENCE ON CULTURE COLLECTIONS, 2., 1973, Brisbane. **Anais...** Brisbane: Unesco, 1973.

SLY, L.I. Australian Microbial Resources: exploring the need for a priority research program on Australian Microbial Diversity incorporating support for a network of Australian Collections of microorganisms and genetic resources, and an Australian Microbial resources information network. **Microbiology**, Australia, v. 19, n. 1, p. 27-35, Jan. 1998.

SMITH, D. Culture collection over the world. **International Microbiology**, Egham, v. 6, n. 2, p. 95-100, July 2003.

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

STORMER, F. C.; LEA, T. Effects of ochratoxin A upon early and late events in human T-cell proliferation. **Toxicology**, Amsterdam, v. 95, n. 1-3, p. 45-50, Jan. 1995.

TANIWAKI, M. H.; FONSECA, H.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. variabilidade de produção de aflatoxinas por linhagens de *Aspergillus flavus* em diferentes tempos de manutenção. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 50, n. 1, p. 140-150, fev./maio 1993.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. **Fungos em alimentos: ocorrência e detecção**. Campinas: Núcleo de Microbiologia do ITAL, 2001.

TORTORA, G., B. R. F.; CASE, C. L. **Microbiology: an introduction**. Boston: Addison Wesley, 1997.

TÉREN, J. et al. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 134, n. 3, p. 171-176, 1996.

URUBURU F. History and services of culture collections. **Insternational Microbiology**, Egham, v. 6, n. 2, p. 101-103, 2003.

WEI, D.-L.; JONG, S. C. Production of aflatoxin by strains of the *Aspergillus flavus* group maintained in ATCC. **Mycopathologia**, Den Haage, v. 93, n. 3, p. 19-24, Mar. 1986.

WILSON, D. M.; MUBATANHEMA, W.; JURJEVIC, Z. Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 504, p. 3-17, 2002.

WOGAN, G. N. Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v.30, n. 2, p.460-470, June, 1966.