



IARA ELEUTÉRIA DIAS

**CRESCIMENTO MICELIAL E PRODUÇÃO DE
TOXINAS POR FUNGOS DE
ARMAZENAMENTO ASSOCIADOS A GRÃOS
DE MILHO SOB DIFERENTES NÍVEIS DE
RESTRICÇÃO HÍDRICA**

LAVRAS – MG

2012

IARA ELEUTÉRIA DIAS

**CRESCIMENTO MICELIAL E PRODUÇÃO DE TOXINAS POR
FUNGOS DE ARMAZENAMENTO ASSOCIADOS A GRÃOS DE
MILHO SOB DIFERENTES NÍVEIS DE RESTRIÇÃO HÍDRICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Patologia de Sementes, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. José da Cruz Machado

LAVRAS – MG

2012

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

Dias, Iara Eleutéria.

Crescimento micelial e produção de toxinas por fungos de armazenamento associados a grãos de milho sob diferentes níveis de restrição hídrica / Iara Eleutéria Dias. – Lavras : UFLA, 2012.

58 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: José da Cruz Machado.

Bibliografia.

1. *Aspergillus spp.* 2. *Penicillium sp.* 3. Comportamento. 4. Potencial osmótico. 5. *Aspergillus flavus* toxigênico. 6. Aflatoxina.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.43

IARA ELEUTÉRIA DIAS

**CRESCIMENTO MICELIAL E PRODUÇÃO DE TOXINAS POR
FUNGOS DE ARMAZENAMENTO ASSOCIADOS A GRÃOS DE
MILHO SOB DIFERENTES NÍVEIS DE RESTRIÇÃO HÍDRICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Patologia de Sementes, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA, 29 de Fevereiro de 2012.

Dr. Mario Sobral de Abreu UFLA

Dr. Renato Mendes Guimarães UFLA

Dr. José da Cruz Machado

Orientador

LAVRAS – MG

2012

Aos meus pais, Ione e Gabriel, pelo amor, por me apoiarem sempre, qualquer que tenha sido a situação e por não pouparem esforços para que todos os meus sonhos se realizassem. Aos meus amores, Isabela, Daniel, Ana Carla e Helena por acreditarem que eu seria capaz e por tornarem minha vida mais feliz.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, a oportunidade de realizar mais um sonho e por me conceder força em todos os momentos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia.

Ao professor Dr. Luis Roberto Batista, pelos ensinamentos e confiança.

Ao professor Dr. Mário Sobral de Abreu, pelo apoio e contribuição no início desta caminhada.

A professora Dra. Maria Luiza Nunes Costa pelo grande apoio, ensinamento, dedicação, e amizade.

A Marcella e Mirella pelo grande apoio nos trabalhos, desde início até o final, por esta grande amizade nos momentos de dificuldades e também nas alegrias.

A Carla Corrêa e ao meu estagiário Vinicius pela a grande ajuda na realização das análises e também pela amizade.

A Úrsula pela amizade e a grande ajuda no início dos trabalhos.

Ao Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, em especial as meninas do Laboratório de Micotoxina e Micologia de Alimentos, em especial ainda, a Fabiana Couto.

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de estudos.

As pós-doutorandas Carla, Maria Eloisa, Ellen Noly, Luana Botelho.

Aos amigos de laboratório Christiano, Bruno, Vitor, Luiz Eduardo (Luizinho), Willian Zancan, Rayana, Elenice, Nice, pelo carinho e pelos momentos de descontração. A Carol, pela enorme força, pela linda amizade formada e pela confiança.

A todos os funcionários envolvidos no nosso dia a dia de trabalho.

Agradeço a minha querida Ione e ao meu pai Gabriel, fundamentais em minha vida, pelo amor incondicional; a minha irmã, Isabela, ao meu cunhado

Daniel e as minhas sobrinhas Ana e Helena, que sempre estiveram ao meu lado, pelo eterno amor e carinho.

Às amigas de república Mari, Angel, Susan e Kedma pela convivência e momentos de descontração. A minha amiga Érica, pela alegria contagiante e pelo incentivo em diversos momentos. A minha amiga Thaís Helena de Araujo pessoa muito especial para mim, uma grande irmã obrigada pelo grande apoio sempre. A Márcia pela inigualável ajuda e amizade.

Aos colegas de mestrado dos quais tenho muito carinho, Thaís, Davi, Gustavo, Helon, Willian e Leandro, pelos momentos mais que divertidos.

E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

Muito Obrigada!

*“Se Chorei ou se Sorri o importante é que
Emoções eu Vivi...”*

(Roberto Carlos e Erasmo Carlos)

RESUMO

Os fungos comumente presentes no armazenamento de grãos, como espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* são responsáveis por diversas perdas na cultura do milho, devido às alterações das condições ambientais durante o armazenamento e por suas habilidades na produção de toxinas. O objetivo neste estudo foi reavaliar a relação de comportamento de algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* em substratos com restrição hídrica, além de avaliar o efeito do *Aspergillus flavus* na qualidade dos grãos de milho durante o armazenamento em condições de ambiente controlado. Foram utilizados isolados de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus glaucus* (*Eurotium herbariorum*) e *Penicillium* sp., colocados em meio BDA, modificado pelo soluto NaCl e pelo glicerol, em cinco níveis de potenciais (-1,0; -5,0; -10,0; -15,0; -20,0 MPa) acondicionados em quatro níveis de temperatura 15, 20, 25 e 30°C. Para o ensaio de armazenamento os grãos de milho foram acondicionados em dessecadores, em 3 níveis de umidade atmosférica (30, 70 e 80% UR), um isolado de *Aspergillus flavus* produtor de aflatoxina, a uma temperatura de 25°C, pelo período de 4 meses. Os grãos inoculados e não-inoculados foram avaliados em intervalos de 30 dias por meio da aplicação de testes de sanidades e produção de aflatoxina. No crescimento micelial dos fungos em estudo, o comportamento foi diferenciado, de acordo com os níveis de potenciais osmóticos e temperatura. O *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus glaucus* demonstraram habilidade de crescimento nos níveis de potenciais mais altos em relação. No ensaio do armazenamento, à medida que aumentou o período de armazenamento a qualidade dos grãos diminuiu, sendo que os grãos armazenados, nas três umidades atmosféricas, apresentaram variação na qualidade, e na produção de aflatoxina.

Palavras-Chave: Fungos de armazenamento, comportamento, qualidade dos grãos e micotoxina.

ABSTRACT

The storage fungi such as *Aspergillus* and *Penicillium* are responsible for various losses in maize crops and this may be the results of changes in the environmental conditions and their ability to produce toxins. The objective in this study was to review the behavior among some species of *Aspergillus* and *Penicillium* in agar substrate osmotically modified. In addition to evaluate the effect of *Aspergillus flavus* in the quality of the stored grain. We used strains of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium* sp., *Aspergillus glaucus* (*Eurotium Herbariorum*) placed on PDA medium, modified by reagents, in five levels of osmotic potential (-1.0, -5.0, -10.0 , -15.0, -20.0 MPa), in four temperature levels 15, 20, 25 and 30°C. For the test of storage were selected three levels of humidities for storage, maize grain, a strain of *Aspergillus flavus*, a temperature and four months of storage. Each month of storage, grains inoculated and non-inoculated were removed of the desiccators and subjected to assessments of quality and production of aflatoxin. In the mycelial growth of the fungi under study, the behaviors were different when the levels of potential and temperature were increased (-1.0 to -15.0), and *Aspergillus glaucus* showed a greater ability to grow in the medium with high level of potential compared with other fungi studied. In the assay of storage, as it the storage period increased, the quality of stored grain decreases, and the grains that was stored, in the two atmospheric humidity had greater variation in the quality, whereas the production of mycotoxins was raised to 70% atmospheric humidity.

Keywords: Storage fungi, behavior, grains quality and mycotoxins.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Aspectos gerais da cultura e do armazenamento de milho	14
2.2 Fungos associados aos grãos de milho armazenados	15
2.2.1 Principais espécies de <i>Aspergillus</i> em grãos milho armazenados	16
2.2.1.1 <i>Aspergillus flavus</i> Link	17
2.2.1.2 <i>Aspergillus ochraceus</i> Wilhelm	18
2.2.1.3 <i>Aspergillus glaucus</i> (<i>Eurotium herbariorum</i>) Link	19
2.2.2 O gênero <i>Penicillium</i> Link: Fr	19
2.3 Principais fatores que influenciam na invasão e no crescimento dos fungos em grãos de milho de armazenados	20
2.3.1 Umidade	20
2.3.2 Temperatura	21
2.3.3 Injúrias de tecidos dos grãos ou condição física do grão	22
2.4 Produção de toxinas por fungos de armazenamento	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Obtenção de isolados fúngicos	27
3.2 Preparo do substrato e avaliação do crescimento micelial dos fungos em relação a restrição hídrica.....	27
3.3 Avaliação dos efeitos de <i>Aspergillus flavus</i> na qualidade dos grãos durante o armazenamento	29
3.3.1 Instalação do ensaio (tratamentos estatísticos, inoculação e acondicionamento dos grãos	30
3.3.2 Avaliação da presença e nível de aflatoxina nos grãos armazenados	31
3.3.3 Avaliação da qualidade sanitária e física dos grãos inoculados e não inoculados durante o período de armazenamento	31
3.3.3.1 Teste de Sanidade.....	32
3.3.3.2 Teste de Condutividade elétrica	32
3.3.3.3 Teste de Umidade	32

4 RESULTADOS	35
4.1 Crescimento micelial de espécies de <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> em substrato com restrição hídrica, em diferentes temperaturas	35
4.2 Efeito de <i>Aspergillus flavus</i> nos grãos de milho durante o período de armazenamento	41
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO	51
7 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	52

1 INTRODUÇÃO

Os fungos de armazenamento, representados em sua maioria por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* são responsáveis por diversas perdas na cultura do milho, ocorrendo em níveis variados, devido à diversidade das condições climáticas e de cultivo do milho no Brasil. Parte dessas perdas pode ser atribuída à baixa qualidade fisiológica e física dos grãos, resultado da interferência de fatores ambientais, como a umidade e temperatura. Geralmente a ação de espécies de ambos os gêneros de fungos em condições desfavoráveis para o armazenamento, resultam, na produção de micotoxinas, como aflatoxinas e ocratoxinas.

Diversos trabalhos envolvendo variações na temperatura, umidade relativa do ar e presença de fungos, na conservação dos grãos de milho durante o armazenamento, evidenciaram vários aspectos. Sobre estes aspectos, tem sido observado que algumas espécies de *Aspergillus* têm apresentado comportamento distinto dos padrões referenciados em literatura. Isto faz com que as relações entre comportamento dos fungos e a produção de micotoxinas em grãos armazenados sejam revistas. O objetivo neste estudo foi reavaliar a relação de comportamento de algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* em substrato com restrição hídrica, além de avaliar os efeitos do *Aspergillus flavus* na qualidade do grão de milho durante o armazenamento em condições de ambiente controlado.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais da cultura e do armazenamento de grãos de milho

O milho é um dos cereais mais importantes do mundo, utilizado como fonte de energia para humanos e animais destacando-se como uma das culturas de maior produção de grãos (FAO, 2008). Entre os maiores produtores de grãos de milho no mundo destacam-se os Estados Unidos, China, União Européia e Brasil (AGRIANUAL, 2011). Na agricultura brasileira a cultura do milho é de grande importância econômica fornecendo matéria prima para uma infinidade de produtos e subprodutos, como o etanol (SILVA, 2004).

Na última década a produtividade do milho no Brasil cresceu significativamente, alcançando uma produção na safra 2010/11 de aproximadamente 51 milhões de toneladas de grãos (AGRIANUAL, 2011). Este aumento da produção ocorre em função de vários fatores, estando diretamente ligado com o sucesso do estabelecimento das plantas em campo, em conjunto com um manejo racional e com a qualidade da semente (MACHADO, 2009). Entretanto, o sistema de produção brasileiro apresenta elevados índices de perdas, que estão relacionadas a vários fatores, dentre eles, as condições de armazenamento (ALVES et al., 1999).

Na fase de armazenamento de grãos podem ocorrer vários danos causados por fungos. Muitas espécies além de causar danos físicos, podem causar perdas qualitativas pela produção das micotoxinas (PINTO, 2001). Segundo Christensen e Kaufmann (1974), a incidência de organismos microbianos e os consequentes riscos de produção de toxinas no armazenamento têm assumido cada vez mais importância e gerado preocupações em todo mundo. A incidência destes fungos em grãos associada a uma combinação ideal

de umidade e temperatura podem proliferar e conseqüentemente deteriorar os tecidos dos grãos armazenados.

Dhingra e Coelho Neto (1998) relataram que o crescimento de *Aspergillus flavus* no armazenamento depende quase que exclusivamente do teor de água dos grãos em equilíbrio com a umidade relativa do ar e da temperatura. Assim, condições ideais de armazenamento dos grãos são necessárias na tentativa de evitar o desenvolvimento deste fungo e a formação de aflatoxinas.

2.2 Fungos associados aos grãos de milho armazenados

Nos últimos anos têm-se observado um avanço das doenças na cultura do milho, sendo os grãos vulneráveis a invasão microbiana, como conseqüência do estreitamento das relações patógeno-hospedeiro-ambiente (COSTA, 2000). Entre os diversos fatores que afetam a qualidade dos grãos de milho, os microrganismos são considerados como dos mais importantes, pelo fato de acelerarem o processo de deterioração durante o armazenamento. É importante salientar que a maioria dos fitopatógenos são capazes de sobreviver nos grãos por longos períodos de tempo causando sérios prejuízos aos agricultores e consumidores deste produto (SMITH; BERJAK, 1995).

Os fungos de armazenamento podem colonizar os grãos de milho antes e durante o armazenamento, mas podem ser encontrados em grande número em armazéns, moinhos, silos, elevadores, equipamentos, ou seja, em lugares onde estes produtos são armazenados, manuseados e processados. Segundo Dingra (1965), os principais fungos de armazenamento são as espécies de *Aspergillus* das quais as mais comuns são; *A. glaucus*, *A. ochraceus*, *A. candidus*, *A. flavus*, *A. parasiticus* e *Penicillium spp.*

Asevêdo et al.(1994) e Orsi et al. (1995) demonstraram que o gênero fúngico mais encontrado em grão de milho recém-colhido foi *Fusarium*, seguido

por *Aspergillus* e *Penicillium*. Puzzi (2000) apud Corrêa (1995) também pesquisaram mensalmente a microbiota fúngica de 130 amostras de milho. Os gêneros mais encontrados nas amostras analisadas foram: *Fusarium* (83,8%), *Penicillium* (55,3%) e *Aspergillus* (40,7%).

Em estudos Almeida et al. (2000) avaliaram a microbiota fúngica em amostras de três híbridos de milho recém-colhidos, provenientes de três regiões distintas do Estado de São Paulo foram encontrados, em média, 71,1; 46,7 e 22,7% de incidência de *Fusarium*, *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp., respectivamente. Nesta pesquisa os autores observaram, também, que os fatores abióticos, tais como o teor de umidade nos grãos de milho, a atividade de água, e a temperatura do ar influenciam diretamente no nível de contaminação fúngica, bem como na potencialidade toxigênica dos fungos em estudo.

2.2.1 Principais espécies de *Aspergillus* em grãos de milho armazenados

Fungos do gênero *Aspergillus* crescem rapidamente, podendo ter cores que variam de branca, amarela, marrom, verde, preto. Os seus conidióforos são eretos, não septados e com presença de uma vesícula na parte apical. As fiálides (local de onde surgem os conídios) podem originar-se diretamente da vesícula (uniseriado) ou diretamente da métula (biseriado). A cabeça conidial é formada pela vesícula, métula (quando presente), fiálides e conídios. Os conídios são formados em cadeias formando colunas compactadas (colunar) ou divergidas (radiado). Podem ser lisos ou ornamentados, hialinos ou pigmentados (SAMSON, 2000).

O referido gênero possui espécies que podem ser toxigênicas e causadores de deterioração em grãos. São saprófitos cosmopolitas de disseminação fácil devido a seus esporos leves e secos. São xerofílicos ou xerotolerantes, ou seja, podem crescer em baixo potencial de água, sendo os

primeiros a se desenvolverem nas condições de baixa umidade dos grãos, facilitando assim o desenvolvimento de outros gêneros quando há o aumento dessa umidade (NEERGAARD, 1979; PUZZI, 2000).

2.2.1.1 *Aspergillus flavus* Link

Dentre as espécies de *Aspergillus* isoladas no milho, o *Aspergillus flavus* é a mais frequente. Esta espécie, do Subgênero *Circumdati*, seção *Flavi*, em meio de cultura CY20S, MEA, CZ e CYA a 25°C, têm uma colônia de coloração verde oliva, e sobre as sementes, em geral, apresenta coloração verde amarelada. Os conidióforos com vesículas esféricas, pouco definidas, 500-600 µm de diâmetro, raramente maiores. As fiálides cobrem a vesícula. Os conidióforos são ásperos, apresentam cabeça normalmente menor que 1 µm de comprimento. Os conídios são tipicamente globosos e subglobosos, equinulados, medindo 3-6 µm de diâmetro, às vezes elípticos ou periformes. Podem ser uniseriado ou biseriado, cabeças dos conídios são radicais ou formando colunas pouco definidas (SANSOM, 2000; KLICH, M. A., 2002).

Aspergillus flavus tem ampla distribuição mundial, podendo ser encontrado em vários alimentos em decomposição, grãos e outros substratos. (PITT e HOCKING, 1997; SAMSON et al., 2001). Este fungo é produtor da aflatoxina, uma micotoxina altamente tóxica ao ser humano e aos animais, podendo ocorrer tanto antes da colheita como no armazenamento. Há evidências de que a competição com outros fungos possa limitar a infecção por *Aspergillus flavus*, determinando o nível de contaminação por aflatoxina na lavoura e nos grãos.

2.2.1.2 *Aspergillus ochraceus* Wilhelm.

Subgênero *Circumdati*, Seção *Circumdati* inclui espécies taxonomicamente relacionadas com *A. ochraceus*. Em meio CYA a 25°C a colônia é de coloração ocre no centro, colônias de aspecto sulcado e reverso pálido em tons verde-amarelados a marrom-escuro. As espécies possuem conidióforos de tamanho variado, sem estreitamento próximo da vesícula, as paredes são lisas a marcadamente rugosas e a pigmentação pode ser amarelada, laranja, marrom e também incolor. A cabeça conidial é bisseriada. As vesículas são globosas, raramente alongadas, com métulas longas de tamanho muito próximo e forma de cunha medindo 10 a 14 µm, ocasionalmente septadas. Os conídios de paredes finas são lisos a finamente rugosos, globosos a elipsoidais, nunca excedendo 4-5µm de diâmetro. Os escleródios, quando presentes, possuem coloração creme, amarelo, avermelhado, vináceo ou preto com a maturidade de forma variada (SANSOM, 2000; CHALFOUN e BATISTA, 2003).

O *Aspergillus ochraceus* tem ampla distribuição em regiões tropicais, solos de desertos, campos cultivados e florestas, principalmente em latitudes que variam de 26°C a 45°C são o habitat mais comum destas espécies as quais podem ser isoladas de vegetação em decomposição e grãos armazenados (KLICH, M. A., 2002).

As toxinas produzidas por este fungo são ácido penicílico, a ochratoxina A, xanthomegnin, viomellein, e vioxanthin (SAMSON, 2000).

2.2.1.3 *Aspergillus glaucus* (*Eurotium herbariorum*) Link

Subgênero *Aspergillus*, Seção *Aspergillus* em meio CYA a 25°C. A colônia é de coloração brilhante azulada se tornando verde para castanho verde, ocasionalmente formando cleistotécio de cor amarela a laranja. Conídio radial, conidióforos lisos e septados, fiálides são formadas diretamente da vesícula, uniseriada, que possuem cabeças globosas e amarelas brilhantes e podendo ocorrer à formação de cleistotécio. Os conídios são rugosos, raramente lisos, formato oval tipo pêra com 5 µm de comprimento (KLICH, M. A., 2002)

2.2.2 O gênero *Penicillium* Link: Fr

A incidência de *Penicillium* vem aumentando em muitas áreas de cultivo de milho, principalmente nos grãos, nos últimos anos. As colônias de *Penicillium* geralmente são de crescimento rápido, de coloração esverdeada, às vezes branca, consistindo principalmente de uma massa de conidióforos. Os conidióforos são curtos, geralmente eretos, lisos ou ligeiramente ásperos, mononematoso ou sinematoso. Ocorre a formação de poucas fiálides. Os conídios são unicelulares, variáveis, lisos subglobosos para esféricos, mas geralmente elípticos 3,4-12 x 3-8 µm. Existem cerca de 1107 espécies, variedades e *formae speciales* de táxons pertencentes ao gênero *Penicillium* sp. descritos em literatura. Foram observadas 182 variedades e duas *formae speciales* associadas ao gênero (Index Fungorum, 2010). Dentre 2.140 registros de ocorrência de hospedeiro que apresentava *Penicillium* sp. em seu tecido, cerca de 90 registros foram na cultura do milho (*Zea mays* L.) e 30 na noqueira-pecã (*Carya illinoensis* K.) (Index Fungorum, 2010; Embrapa, 2010).

Estes fungos podem causar descolorações nos grãos, redução na germinação de sementes, perda da matéria seca, produção de micotoxinas e

alteração do valor nutricional. Os principais metabólitos produzidos por este fungo são o ácido oxálico e o ácido secalônico D (SAMSON, 2000).

2.3 Principais fatores que influenciam na invasão e no crescimento dos fungos em grãos armazenados.

Alguns fatores são críticos, tais como: temperatura, atividade de água, pH, oxigênio entre outros, além de fatores físicos, como injúrias nos grãos, são importantes, pois, interferem no crescimento e na produção de toxinas pelos fungos. A umidade e a temperatura são consideradas os fatores mais importantes, pois, afetam tanto o crescimento quanto a produção de toxinas (HERMANN e TRIGO-STOCKLI, 2008).

2.3.1 Umidade

As exigências de umidade podem variar entre as espécies de fungos, tanto no limite inferior de umidade de crescimento, quanto no intervalo sobre o qual irão predominar. Em grãos, os limites mais baixos de umidade que permitem a invasão dos fungos de armazenamento comuns variam conforme a espécie: *Aspergillus halophilicus*, de 13,0 a 13,2%; *A. restrictus*, de 13,2 a 13,5%; *A. amstelodami*, *A. chevalieri*, *A. repens* e *A. ruber*, 14,0 a 14,2%; *A. candidus* e *A. ochraceus*, 15,0 a 15,2% e *A. flavus*, 17,5 a 18,0%. Peritécios do *A. amstelodami*, *A. chevalieri*, *A. repens* e *A. ruber* são produzidos em grãos de cereais apenas se o teor de umidade destas estruturas for pelo menos 15,0-15,5%, e peritécios raramente são produzidos quando o teor de umidade do grão é superior a 17,0%, pois, neste nível de umidade há a predominância de outros fungos (CHRISTENSEN e KAUFMANN, 1965).

NA tabela 1 são apresentadas as condições ideais para o crescimento de alguns fungos de armazenamento em grãos variando as temperaturas de 25 a 27°C (BAKKER-ARKEMA, 1999).

Tabela 1- Condições para o crescimento de alguns fungos em grãos nas temperaturas de 25 a 27°C.

Espécie	Umidade relativa do ar intergranular - %	Teor de umidade dos grãos - %
<i>Aspergillus halophilicus</i>	68	12-14
<i>A. restrictus</i>	70	13-15
<i>A. glaucus</i>	73	13-15
<i>A. candidus</i> , <i>A. ochraceus</i>	80	14-16
<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	82	15-18
<i>Penicillium</i> spp.	80-90	15-18

2.3.2 Temperatura

A temperatura é outro fator que afeta a armazenagem de grãos, sendo crucial a interação de fatores bióticos e abióticos que promovem a deterioração de grãos. Como o grão é comumente colhido seco ou pode ter seu teor de umidade reduzido a um nível de segurança, este passa a ter um papel menos importante que o da temperatura (D'ARCE, 2009).

A temperatura tem um papel importante no crescimento do micélio, na formação e germinação dos esporos (SANSON, et al 2000). A temperatura ótima para o crescimento da maioria dos fungos de armazenamento é de 28 a 35°C e um mínimo de 0 a 5°C. De acordo com Dhingra (1985), Christensen e Kaufmann (1965), entre outros, algumas espécies de *Penicillium*, comuns em grãos, podem crescer vagarosamente nas temperaturas de -5 a 0°C, mas para isso os grãos devem ter um teor de umidade em equilíbrio com 100% de UR. Na espécie de *Aspergillus flavus*, para que haja a infecção nos grãos estes devem

apresentar uma umidade em equilíbrio com 85% UR (umidade relativa), o que representa 18% de teor de umidade nos grãos de milho a 25-30°C. Abaixo destes valores o fungo não é capaz de infectar os grãos. Os fungos que invadem os grãos em equilíbrio com 85% UR crescem lentamente em temperaturas abaixo de 10°C (DHINGRA, 1965).

A umidade relativa, o teor de umidade dos grãos e a temperatura são fatores interligados em sua ação sobre os grãos (DELOUCHE et al., 1983).

2.3.3 Injúrias de tecidos dos grãos ou condição física do grão

Os efeitos do crescimento fúngico são emboloramento visível, descoloração, odor desagradável, perda de matéria seca, aquecimento, mudanças químicas e nutricionais, perda de qualidade e produção de compostos tóxicos – as micotoxinas (POMERANZ, 1982).

Os danos mecânicos sofridos pelos grãos geram trincas no endosperma e escarificações no pericarpo do grão ou mesmo a ruptura do endosperma, expondo seu conteúdo à ação de fungos e de insetos, com reflexos negativos na potencialidade de armazenamento (FARIAS et al., 2000; RADÜNZ et al., 2006). Em geral, a deterioração dos grãos começa ainda no campo, onde, por implicações econômicas, o produto é mantido na planta até a secagem, prática esta que é largamente utilizada pelos agricultores, uma vez que requer o mínimo de investimento. Todavia, esta prática pode resultar no início de elevadas infestações de fungos e de pragas em grãos armazenados (NESCI et al., 2003).

A presença de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* é um indicativo da deterioração das sementes ou grãos de cereais e oleaginosas, e estes patógenos promovem danos ao embrião, descoloração, alterações nutricionais e perda da massa seca (MILLER, 1995). A deterioração depende da atividade das variáveis bióticas que, por seu turno, é afetada, principalmente, pela interação da temperatura e umidade. Essa deterioração pode ser baixa no

início, porém, quando ocorrem combinações dessas variáveis, juntamente com um prolongado período de armazenagem, podem gerar perdas significativas na qualidade dos produtos (D'ARCE 2009).

A deterioração do grão é, portanto, um processo resultante da ação de microorganismos que utilizam os nutrientes presentes no grão para seu crescimento e reprodução. Pode ocorrer, também, devido ao aquecimento do grão e microorganismos associados, quanto maior a umidade, maior o risco de deterioração (D'ARCE, 2009).

2.5 Produção de toxinas por fungos de armazenamento

O desenvolvimento de microrganismos, particularmente os fungos, é um dos mais sérios fatores responsáveis pelas perdas de produção de grãos na pós-colheita, sendo que o desenvolvimento dos fungos pode ser acompanhado pela produção de micotoxinas (AIDOO, 1993). O termo micotoxina é derivado da palavra grega “mykes”, que significa fungo, e do latim “toxican”, que significa toxinas. As micotoxinas são metabólitos secundários de fungos filamentosos, e são tóxicas ao homem e animais mesmo em pequenas concentrações (PITT, 2000). A contaminação de grãos por micotoxinas pode ocasionar perdas substanciais à economia associados ao comércio internacional destes produtos, pois, muitos países estabelecem limites para micotoxinas em alimentos, segundo a FAO (2008) estas perdas chegam a milhões de toneladas por ano.

Os principais gêneros produtores de micotoxinas em produtos agrícolas, principalmente em grãos de milho são *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (CAST, 2003). Outros fungos podem fazer parte do complexo de grãos ardidos, tais como espécies de *Stenocapella*. O tipo e a quantidade de micotoxina produzida por um fungo dependem de fatores ecológicos e do processamento particular de cada produto (FILTENBORG et al., 1996). Vale ressaltar que a

presença de fungo produtor em associação com grãos não indica necessariamente a presença de micotoxina, pois, as condições nas quais o fungo produz sua micotoxina são muito específicas (TANIWAKI e SILVA, 2001).

Várias micotoxinas têm sido identificadas em alimentos contaminados por espécies de *Aspergillus* sendo que as mais importantes são as aflatoxinas produzidas por *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* e as ochratoxinas produzidas por *Aspergillus ochraceus* e algumas espécies de *Penicillium* (VARGA et al. 2004).

As aflatoxinas estão entre os mais importantes carcinógenos conhecidos, as mais estudadas são as aflatoxina B₁, B₂, G₁, G₂. Devido as suas elevadas toxicidades estudos sobre a ocorrência natural, identificação, caracterização, biosíntese e regulação genética das aflatoxinas têm sido conduzidas (PAYNE & BROWN 1998; BENNETT & KLICH 2003; YU et al. 2004). Já algumas espécies de *Penicillium* são conhecidas por produzirem ochratoxina, e patulina (WHITLOW e HAGLER, 2005).

A ochratoxina A é uma potente nefrotoxina, que possui ação destrutiva específica sobre as células renais, pode contaminar vários produtos. Trata-se de uma toxina que exibe propriedades carcinogênicas, teratogênicas e imunotóxica em humanos e animais. A ochratoxina de maior importância é produzida por *Aspergillus* da seção *Circumdati* e *Nigri* (SAMSON et al., 2004; FRISVAD et al., 2004).

Para a detecção de micotoxina inúmeros métodos de análise em alimentos e produtos agrícolas são descritos na literatura, dentre os quais o proposto por Fennel et al., Bothast e Hesseltine *apud* Singh et al. (1991), denominado de BGYF (Bright Greenish Yellow Fluorescence). Neste método a detecção rápida das aflatoxinas é determinada através da fluorescência produzida por substâncias específicas (ácido kójico e peroxidase) em sementes submetidas à luz UV de comprimento onda longa (365nm). Segundo Wogan (1966), as

aflatoxinas B₁ e B₂ emitem luz fluorescente azul, enquanto as G₁ e G₂ emitem fluorescência amarela esverdeada, quando submetidas à luz U.V. Metodologias semelhantes foram desenvolvidas por Lin e Dianese (1976), os quais adotaram o meio ágar-coco (CAM-Coconut Agar Medium), e por Hara *apud* Wicklow et al. (1981), utilizando o meio APA (Aflatoxin Producing Ability) para distinguir *Aspergillus flavus* de produtores positivos ou negativos de aflatoxinas, baseando-se na fluorescência.

Diversas metodologias analíticas para a detecção de micotoxinas são utilizadas. Dentre estas a cromatografia de camada delgada (TLC - Thin Layer Chromatography), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e ELISA (SCOTT, 1995), são adotadas na detecção de tais micotoxinas. As duas últimas têm sido também empregadas na quantificação das toxinas presentes nos produtos (GOURAMA e BULLERMAN, 1995).

Técnicas moleculares têm sido utilizadas na identificação de espécies fúngicas e na tentativa de detecção de genes responsáveis pela biossíntese de micotoxinas. Dentre as técnicas utilizadas na tentativa de detecção dos genes responsáveis pela produção de micotoxinas inclui-se o sequenciamento, que analisa as seqüências das bases nitrogenadas presentes no gene, podendo identificar a mutação em apenas uma única base. Entretanto, estas mutações podem ser silenciosas, podendo não afetar a estrutura do aminoácido ou a proteína produzida (ZAHA et al, 2000).

No intuito de proteger os consumidores, além de técnicas rápidas de identificação, leis têm sido adotadas em muitos países, como no Brasil, contra o efeito nocivo das micotoxinas em alimentos. No Brasil pela resolução nº 3476, publicada no Diário Oficial da União, de 19/01/77, a Comissão de Normas e Padrões Alimentares (CNPA) fixou um limite máximo de aflatoxinas B₁ e B₂ em 30 µg/kg. O programa Nacional de Monitoramento e Controle de Micotoxinas propôs para aflatoxinas B₁, B₂, G₁, e G₂ os limites de 3µg/kg (alimentos infantis)

e 20 µg/kg (outros produtos). Para ochratoxina A, o limite proposto é de 50 µg/kg em arroz, cevada, feijão e milho, e para zearalenona, o limite proposto é de 200 µg/kg para o milho (FAO, 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de isolados fúngicos

Neste trabalho foram utilizados isolados de fungos associados a grãos de milho de amostras recebidas no laboratório de Patologia de Sementes para análise sanitária. Dos grãos foram feitos isolamentos de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium* sp.. O isolado *Aspergillus glaucus* (*Eurotium herbariorum*) foi obtido de grãos de soja. A metodologia utilizada para estes isolamentos consistiu no uso do blotter salino, conforme descrição de Machado (1988) e Machado (2002). Os grãos foram incubados em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro esterilizadas e umedecidas com solução salina esterilizada, contendo 6% de cloreto de sódio em água destilada. As placas foram mantidas em câmara de incubação sob luz negra (radiação na faixa de 320-400 nm), com fotoperíodo de 12 h, à temperatura de 20°C ± 2°C, por um período de 7 dias.

A observação dos grãos para identificação da microflora foi realizada com o auxílio do microscópio estereoscópico, e quando necessário microscópio ótico para confirmação das estruturas do fungo, conforme descrição de Machado (1988; 2002).

3.2 Preparo do substrato e avaliação do crescimento micelial dos fungos em relação à restrição hídrica

Os quatro fungos - *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus glaucus* (*Eurotium herbariorum*) e *Penicillium* sp foram crescidos em BDA básico e cultivado por 7 dias à temperatura de 20°C e fotoperíodo de

12h. Após este período os fungos foram colocados em um meio sólido agarizado modificado e seu crescimento micelial foi avaliado. Foram utilizados os solutos NaCl e ϕ Glicerol, separadamente, que proporcionaram uma diferente condição de umidade pela restrição hídrica do meio de cultura. Em seguida discos de micélio de 5mm em estudo foram colocados no centro das placas de Petri de 9 cm, em contato com substratos modificados, em diferentes potenciais osmóticos (-1,0, -5,0, -10,0, -15,0, -20,0 MPa).

As placas contendo o substrato modificado como inóculo dos fungos foram acondicionadas em câmaras tipo BOD, previamente reguladas com as temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C e fotoperíodo de 12 horas no período de 10 dias.

O crescimento micelial dos fungos foi avaliado diariamente, pela medição do diâmetro das colônias no verso das placas com o auxílio de régua milimetrada, calculando-se as médias ao final do período de incubação.

Para a avaliação de crescimento micelial foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado, com 5 repetições, em esquema fatorial, 4 espécies fúngicas (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus glaucus* e *Penicillium*), 2 solutos de restrição hídrica (Cloreto de sódio e Glicerol) 5 potenciais osmóticos (-1,-5, -10, -15, -20 MPa) e 4 temperaturas (15, 20, 25 e 30°C), sendo testemunha o crescimento somente em meio BDA.

3. 3 Avaliação de efeitos de *Aspergillus flavus* na qualidade dos grãos de milho durante o armazenamento

3.3.1 Instalação do ensaio (tratamentos, inoculação e acondicionamento dos grãos)

Para este ensaio foram estabelecidos 2 níveis de umidades de armazenamento, um genoma de milho, um isolado de *Aspergillus flavus* produtor de aflatoxina, uma temperatura (25°C), e período de 4 meses de armazenamento. Antes do armazenamento foi realizada uma avaliação na qualidade sanitária dos grãos de milho utilizados no experimento.

Para a contaminação dos grãos com *Aspergillus flavus* lançou-se mão da técnica descrita por Machado (2005). Por esta técnica o isolado de *Aspergillus flavus* foi transferido, inicialmente, para meio BDA e mantidos por sete dias sob regime de 12 horas de luz negra, à temperatura de 25 °C. Após esse período, foi preparada uma suspensão de conídios acrescentando-se 10 mL de água esterilizada e 50 ppm de TWEEN 80 por placa. A suspensão de fungos foi vertida em uma cuba de vidro contendo meio BDA modificado (0,5% de ágar - 5g/L), esterilizado, padronizando a solução na concentração de $1,0 \times 10^6$ conídios / mL. Após homogeneização desse meio, dois discos de papel de filtro de 15 cm de diâmetro, previamente esterilizados, foram mergulhados nessa calda agarizada e colocados em placas de Petri de 15 cm de diâmetro. Essas placas foram mantidas em incubadoras a 25°C, por um período de aproximadamente 20 dias, até a desidratação completa do papel de filtro. A esse substrato, contendo as colônias dos fungos em estudo com elevada esporulação, foram adicionados 2 g de caolim (material inerte de granulometria fina), previamente esterilizado, por placa de 15 cm de diâmetro, obtendo-se assim uma mistura de pó com esporos dos fungos.

A concentração de conídios na formulação obtida foi ajustada para $1,0 \times 10^6$ conídios/g de produto, com auxílio de uma câmara de Neubauer. A incorporação do inóculo, composto de propágulos fúngicos, aos grãos de milho, foi realizada tomando-se como base a relação de 200 g do produto/100 kg de grãos previamente desinfestados com hipoclorito de sódio 1% por 30 segundos.

Os grãos inoculados e não inoculados foram distribuídos uniformemente em potes de plástico e colocados dentro de dessecadores com teores de umidade distintos proporcionados pelo uso de soluções saturadas de NaCl e KCl (Cloreto de Sódio e Cloreto de Potássio). Através destas soluções de NaCl e KCl foram obtidos os teores de umidades atmosféricas de 32%, 74% e 80% (STOKES e LEVIEN, 1946). Os grãos inoculados e não inoculados foram mantidos dentro dos dessecadores por um período total de quatro meses na temperatura de 25°C.

Durante o armazenamento, em intervalos de 30 dias uma amostra dos grãos inoculados e não inoculados foi retirada dos dessecadores e submetidos a avaliações de qualidade e da produção de aflatoxina.

3.3.2 Avaliação da presença e nível de aflatoxina nos grãos armazenados

A detecção de micotoxina foi realizada através do Kit **Romer Labs®** conforme recomendação do fabricante e de acordo com as normas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Para extração da aflatoxina, amostras de 20 g dos grãos de milho foram trituradas, pesadas e colocadas em 50 mL de solução de metanol a 70%, com agitação constante por 3 minutos. O conjugado (enzima da micotoxina) foi misturado a 50 µL do extrato obtido, na proporção de 1:1. Em seguida, 100 µL da mistura (extrato + conjugado) foram pipetadas para os micropoços da placa de Elisa contendo anticorpos específicos à aflatoxina, permanecendo em contato

com eles por 15 minutos. Após este período, os micropoços foram lavados e secos, aos quais foram adicionados 100 µL de um substrato enzimático para o desenvolvimento de uma coloração azul. Após cinco minutos foi adicionado 100µL da solução “stop” havendo a alteração da cor para amarelo. A densidade óptica (DO) foi mensurada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm e comparadas às DO dos padrões.

3.3.3 Avaliação da qualidade sanitária e física dos grãos inoculados e não inoculados durante o período de armazenamento

Para estas avaliações foram utilizados os testes de sanidade, condutividade elétrica, e teor de umidade dos grãos conforme descrição a seguir.

3.3.3.1 Teste de sanidade

Para este teste foi utilizado *blotter* modificado com o meio de cultura DG18, no qual os grãos foram incubados em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro esterilizadas e umedecidas com meio de cultura. As placas são acondicionadas em câmara de crescimento sob luz negra (radiação na faixa de 320-400 nm), com fotoperíodo de 12 h, à temperatura de 20° C ± 2° C, num período de 7 dias.

A visualização dos grãos para identificação da microflora foi realizada com a utilização do microscópio estereoscópico, e quando necessário, foi utilizado o microscópio ótico para confirmação das estruturas do fungo.

3.3.3.2 Teste de Condutividade Elétrica

Neste teste foram utilizados quatro repetições de 50 sementes. Preliminarmente foi determinado o teor de água das amostras. Cada amostra foi devidamente pesada, com precisão de duas casas decimais. Em seguida os grãos foram colocados para embeber em um recipiente contendo 75 ml de água deionizada e mantidas em uma câmara (germinador) à temperatura de 25°C durante 24 horas. A água colocada nos recipientes foi mantida a 25°C, com uma antecedência de 24 horas, visando o equilíbrio da temperatura. Após a embebição dos grãos por 24 horas, foi realizada a leitura da condutividade elétrica na solução de embebição, através do condutivímetro, que possui um sensor (eletrodo), com constante de eletrodo 1,0. O aparelho foi calibrado sempre no início do trabalho, pelo menos 30 minutos antes das atividades de leitura.

Os recipientes contendo as sementes foram retirados, 15 de cada vez e agitados por 10 a 15 segundos antes da leitura. O resultado obtido através do condutivímetro foi dividido pelo peso da amostra ou repetição (KRZYZANOWSKI, 1999).

3.3.3.3 Teste de Umidade

O método utilizado para aferição da umidade foi o da estufa a 105°C, oficialmente estabelecido pela RAS (Regras para Análise de Sementes no Brasil) para uso nos laboratórios de análise de sementes no país. Após a retirada dos dessecadores as amostras foram pesadas em balança com sensibilidade de 0,001g e colocadas em recipientes com tampa. Os recipientes foram secos em estufa a 105°C e resfriados em dessecadores, convenientemente identificados. Os recipientes já contendo as amostras de grãos de milho inoculados e não

inoculados foram colocados na estufa a 105°C, sobre suas respectivas tampas. A contagem do tempo para a secagem das amostras iniciou-se após o retorno da temperatura da estufa a 105°C. As amostras de milho inoculadas e não inoculadas foram mantidas na estufa durante 24 horas, após este período as amostras foram retiradas, tampadas rapidamente e colocadas em dessecadores para serem resfriadas e então pesadas.

A porcentagem de umidade foi calculada na base do peso úmido aplicando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Umidade (U)} = 100 (P-p) / P-t$$

Onde:

P = peso inicial, peso do recipiente e sua tampa mais o peso da semente;

p = peso final, peso do recipiente e sua tampa mais peso da semente;

t = tara, peso do recipiente com sua tampa;

O peso (g) foi registrado utilizando-se com três casas decimais, o e resultado final foi obtido através da média aritmética das porcentagens de cada uma das repetições retiradas da amostra de trabalho.

3.3.3.4 Análises Estatísticas

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. A análise de variância foi realizada em esquema fatorial 5x4x2 (potenciais osmóticos; temperaturas; solutos). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar[®] versão 5.3 (Ferreira, 2008) e as médias comparadas pelo teste t de Student, Tukey ou regressão ($p \leq 0,05$), de acordo com a natureza dos dados.

4 RESULTADOS

4.1 Crescimento micelial de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* em substrato com restrição hídrica, em diferentes temperaturas

De acordo com a análise de variação, o diâmetro médio das colônias das espécies de *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus* e *Penicillium* sp. foram influenciados significativamente ($P < 0,005$) pelos diferentes solutos, níveis de potenciais osmóticos dos substrato e pelas diferentes temperaturas, havendo diferenças significativas na interação entre ambos.

No condicionamento osmótico proporcionado pelo soluto Glicerol observa-se (Figura 1) que crescimento micelial dos fungos em estudo foi estimulado em todas as temperaturas, obtendo um maior crescimento na temperatura de 30°C, como observado na figura 1. Já nos diferentes potenciais observa-se (Figura 1) que no maior potencial, de -20 MPa, houve o crescimento destes fungos apenas nas temperaturas de 20°C e 30°C.

Na temperatura de 15°C (Figura 1A) houve o crescimento dos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus glaucus* e *Penicillium* sp. nos potenciais de 0,0; -1,0; -5,0; -10,0 e -15,0 MPa, diferentemente do potencial de -20,0 MPa que não estimulou o crescimento deste fungos. Para a temperatura de 20°C, representada pela figura 1B, observa-se o crescimento em todos potenciais osmóticos do *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* e do *Aspergillus glaucus*, com exceção do *Penicillium* sp, que não teve seu crescimento estimulado nos potenciais mais altos.

O crescimento micelial dos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus glaucus* e *Penicillium* sp na temperatura de 25°C (Figura 1C) foi estimulado até o potencial de -15,0 MPa. No potencial de -20,0 MPa observa-se na figura 1C que houve apenas o crescimento do *Aspergillus ochraceus*.

Na temperatura de 30°C (Figura 1D), observa-se o maior crescimento dos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus glaucus* e *Penicillium sp.* quando comparados com as outras temperaturas. Observa-se o crescimento destes fungos em todos os potenciais. *Aspergillus glaucus* nesta temperatura obteve seu maior crescimento nos potenciais de -5,0; -10,0; -15,0 e -20,0 MPa, quando comparado aos outros fungos. Já o crescimento micelial do *Penicillium sp.* não foi promovido nos potenciais maiores.

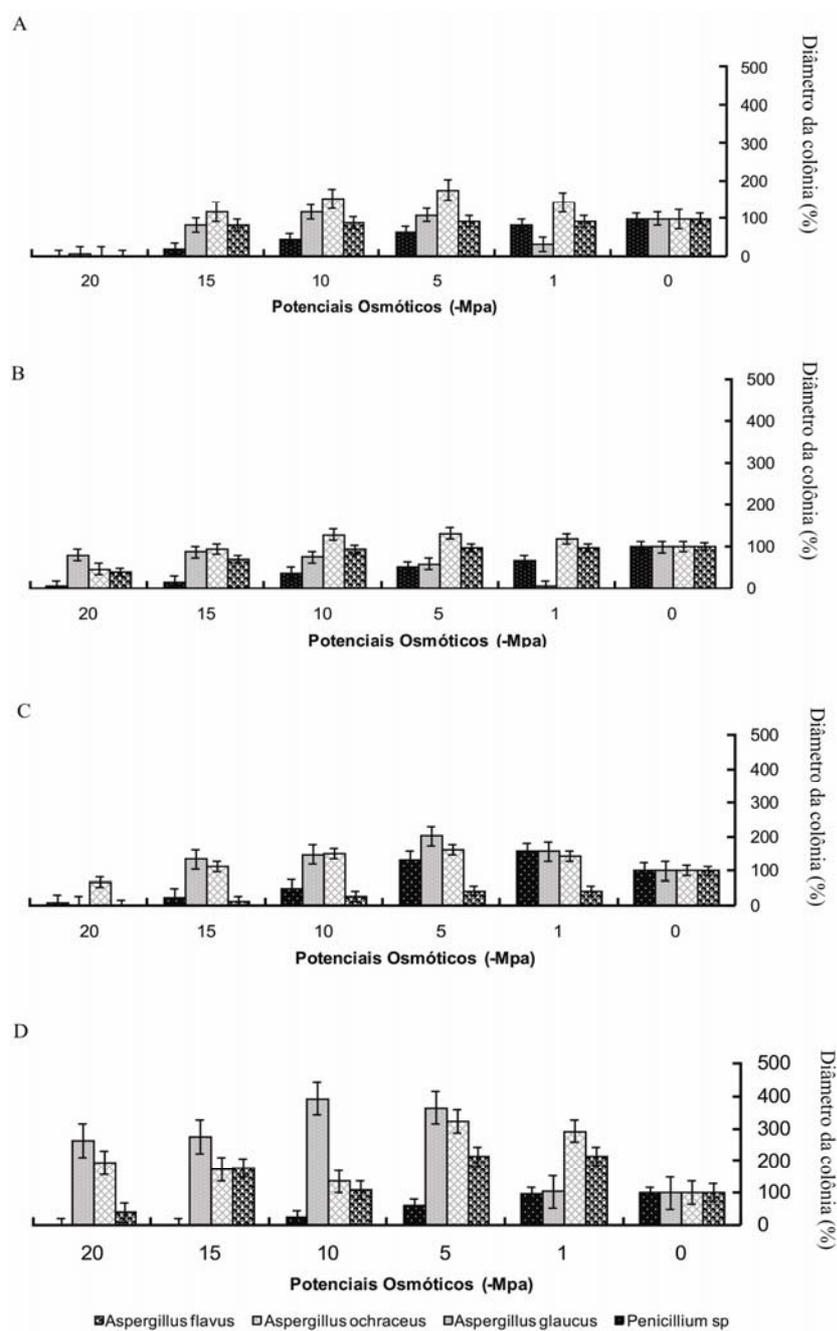


Figura 1 – Diâmetro médio da colônia de *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. glaucus* e *Penicillium* sp. aos 10 dias de idade sobre influência de diferentes níveis de restrição hídrica no meio BDA + Glicerol, acondicionados em diferentes temperaturas. A - 15°C, B - 20°C, C - 25°C e D - 30°C.

No condicionamento osmótico proporcionado pelo NaCl (Figura 2) observa-se de maneira geral que o crescimento dos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus glaucus* e *Penicillium sp*, em comparação com o condicionamento osmótico proporcionado pelo glicerol, tiveram um menor crescimento micelial em todas as temperaturas e nos diferentes níveis de potenciais osmóticos. Neste substrato observa-se que a temperatura de 25°C foi à única que os fungos em estudo cresceram em todos os potenciais, ainda observando a figura 2 verifica-se que todos os fungos obtiveram seus maiores crescimentos na temperatura de 30°C.

Nas temperaturas de 15 e 20°C (Figura 1A e 1B, respectivamente) os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus glaucus* e *Penicillium sp* apresentaram menor crescimento micelial, quando comparados às outras temperaturas. Em relação ao crescimento nos diferentes potenciais observa-se que o *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus glaucus* cresceram nos potenciais de 0,0, -1,0 e -5,0MPa, sendo o crescimento do *Aspergillus glaucus* menor do que os dois fungos citados. No potencial de -10,0MPa houve apenas o crescimento do *Aspergillus ochraceus* nas duas temperaturas. Nos potenciais de -15,0 e -20,0MPa não houve crescimento algum destes fungos em estudo.

Na temperatura de 25°C (Figura 2C) observa-se o comportamento diferencial dos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus glaucus* e *Penicillium sp*, em seu crescimento micelial. Nesta temperatura houve o crescimento de todos os fungos nos potenciais de 0,0; -1,0; -5,0; -10,0 e -15,0MPa. *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus* apresentaram maior crescimento micelial nos potenciais de -5,0, -10,0 e -15,0MPa. No potencial osmótico de -20,0MPa observa-se apenas o crescimento do *Aspergillus ochraceus*. Para a temperatura de 30°C (Figura 2D) observa-se que os fungos em estudo obtiveram um maior crescimento nos potenciais de 0,0, -1,0 e -5,0, no

potencial de -10,0 apesar de haver o crescimento, este por sua vez foi menor quando comparado aos menores potenciais. Já nos potenciais de -15,0 e -20,0 não houve o crescimento destes fungos.

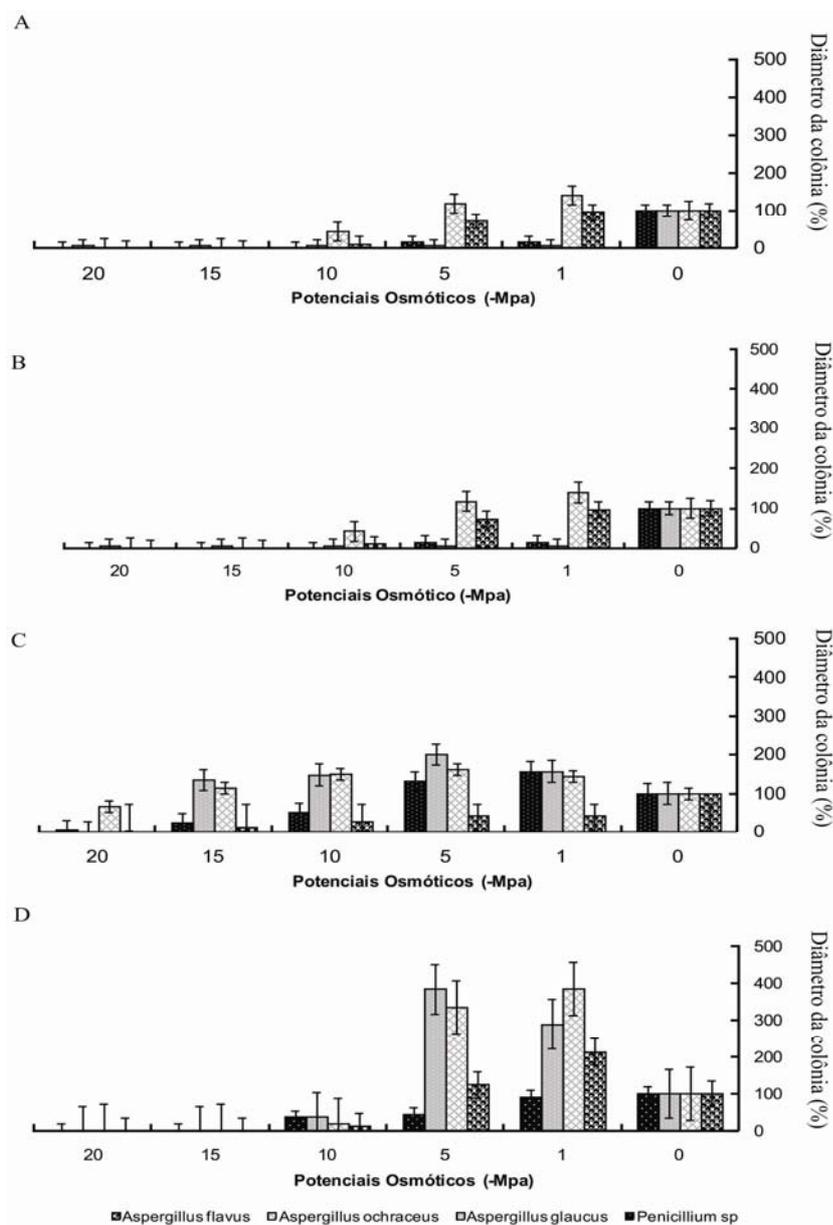


Figura 2 – Diâmetro médio da colônia de *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. glaucus* e *Penicillium* sp. aos 10 dias de idade sobre influência de diferentes níveis de restrição hídrica no meio BDA + NaCl, acondicionados em diferentes temperaturas. A – 15°C e B – 20°C, C - 25°C e D – 30°C.

4.2 Efeitos de *Aspergillus flavus* nos grãos de milho durante o armazenamento.

Na avaliação da qualidade sanitária dos grãos de milho antes do armazenamento foi observada a presença de 100% de *Fusarium verticillioides* e a presença natural de *Aspergillus flavus* com incidência baixa. Passado o período de armazenamento observou uma diferença significativa ($P < 0,005$) em relação à presença ou não destes fungos nos grãos de milho quando inoculados ou não com *Aspergillus flavus* e colocados em diferentes umidades atmosféricas de armazenamento (Figura 3).

No ambiente com 30 e 80% de umidade atmosférica (Figura 3 A e 3C, respectivamente), observa-se, que apesar da presença do *Fusarium verticillioides*, à medida que se estendeu o período de armazenamento, do 1º ao 4º mês, houve um aumento na incidência do *Aspergillus flavus* nos grãos inoculados, vale ressaltar, que apenas no segundo mês de armazenamento dos grãos inoculados, armazenados em umidade atmosférica de 80%, ocorreu uma queda na incidência do *Aspergillus flavus*. Nos grãos não inoculados a incidência de *A. flavus* não passou de 20% e 40% nas respectivas umidades atmosféricas de armazenamento de 30% e 80%, ao contrário do *Fusarium verticillioides* que obteve 100% de sua incidência em praticamente todos os períodos de armazenamento.

Na umidade de atmosférica de armazenamento de 70% (Figura 3B) houve uma maior incidência de *Aspergillus flavus* nos grãos inoculados e não inoculados, quando comparados às outras umidades. Nos grãos inoculados a incidência deste fungo foi de 100% em todos os quatros meses, já nos grãos não inoculados, mesmo com uma incidência de 100% de *Fusarium verticillioides*, observa-se que a incidência de *Aspergillus flavus* foi aumentando à medida que se estendeu o período de armazenamento.

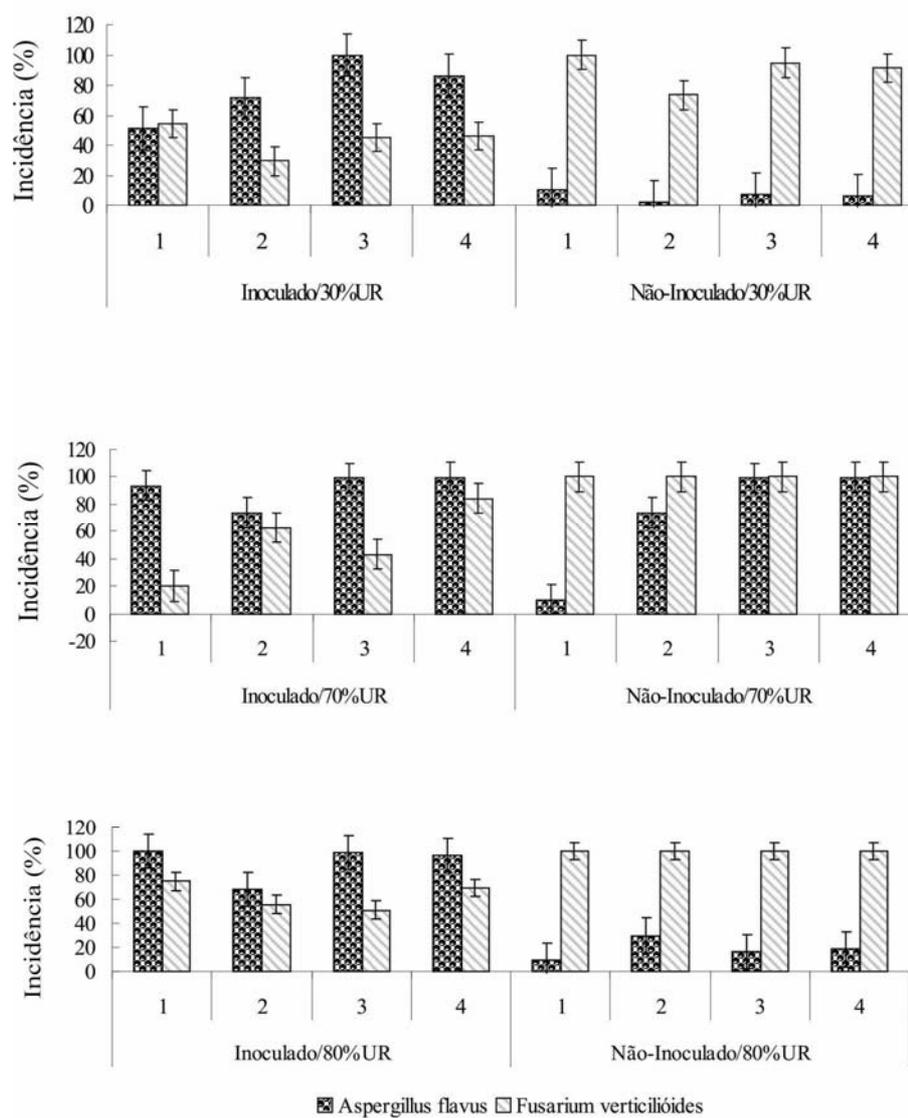


Figura 3 – Percentual de ocorrência de fungos em grãos milho inoculados com *A. flavus* e não inoculados em ambiente de armazenamento com 30% - A, 70% - B e 80% - C de Umidade atmosférica.

Na avaliação da porcentagem de umidade dos grãos de milho inoculados e não inoculados indica (Figura 4) que não houve diferença estatística ($P < 0,005$) entre este dois tratamentos. Porém, houve diferenças estatísticas ($P < 0,005$) entre as umidades atmosféricas de armazenamento de 30, 70 e 80% e entre os diferentes períodos de armazenamento (Figura 4).

À medida que estendeu o período houve um aumento na umidade dos grãos de milho armazenados a 30, 70 e 80% de umidade atmosférica. A umidade atmosférica de 80% foi a que proporcionou o maior aumento da porcentagem de umidade dos grãos, atingindo aproximadamente 25%, quando comparada às outras umidades atmosféricas em estudo.

Na avaliação da condutividade elétrica dos grãos de milhos, inoculados e não inoculados armazenados a 30, 70 e 80%, observa-se (Figura 5) que não houve diferenças significativas entre os tratamentos inoculados e não inoculados com *Aspergillus flavus*. Entre as umidades atmosféricas de armazenamento e ~~entre~~ os diferentes períodos de armazenamento (Figura 5) houve diferenças estatísticas.

Do primeiro ao quarto mês houve um acréscimo nos valores médios da condutividade dos grãos de milho inoculados e não inoculados. Na umidade atmosférica de 80% os valores médios foram maiores, aproximadamente $60 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}$, quando comparado às outras umidades atmosféricas utilizadas neste presente trabalho.

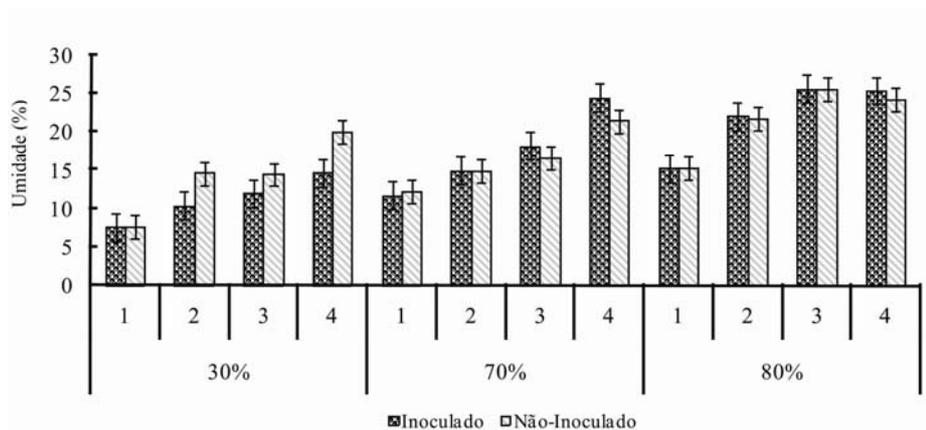


Figura 4 – Percentual de umidade de grãos milho inoculados com e não inoculados *A. flavus* em armazenados por um período de quatro meses nas umidades atmosféricas de 30%, 70% e 80%.

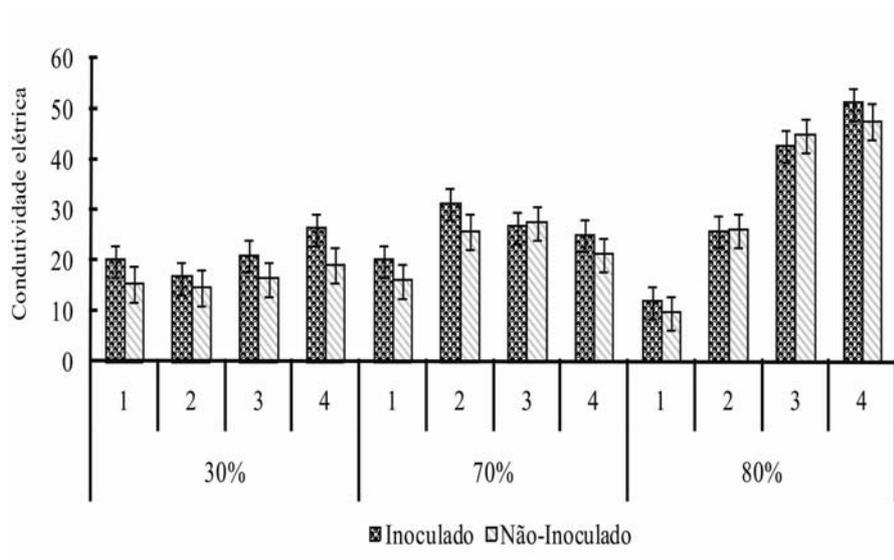


Figura 5 – Valores médios de Condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^1\cdot\text{g}^1$) dos grãos de milho inoculados e não inoculados com *A. flavus*, armazenados por um período de quatro meses nas umidades atmosféricas de 30%, 70% e 80%.

Na avaliação da concentração de aflatoxina nos grãos inoculados e não inoculados armazenados a 30%, 70% e 80% de umidade atmosférica, houve diferenças significativas ($P < 0,005$) entre os tratamentos (Figura 6).

Na umidade atmosférica de 30% a concentração de aflatoxina de maneira geral não ultrapassou 6 ppb. Nesta umidade à medida que se estende o período de armazenamentos do grão de milho, inoculados e não inoculados, aumentou-se a concentração de aflatoxina.

Na umidade atmosférica de 80% do primeiro ao quarto mês de armazenamento houve um aumento na concentração de aflatoxina os tratamentos dos grãos inoculados e não inoculados, sendo que, os grãos inoculados apresentaram maior concentração, aproximadamente 6ppb, em comparação com os grãos não-inoculados que apresentaram uma concentração final de 4 ppb.

A umidade atmosférica de 70% foi a que promoveu uma maior concentração de aflatoxina, variando de 100 a 150 ppb, nos grãos inoculados, quando comparados aos grãos inoculados armazenados a 30% e 80% de umidade atmosférica. Nesta umidade, nos grãos inoculados, a concentração de aflatoxina aumentou a partir do segundo mês, mantendo-se alta até o quarto mês de armazenamento. Para os grãos não inoculados o aumento na concentração de aflatoxina deu-se a partir do segundo mês, entretanto, a concentração desta toxina neste tratamento foi bem mais baixa em comparação com o ocorrido no tratamento dos grãos inoculados.

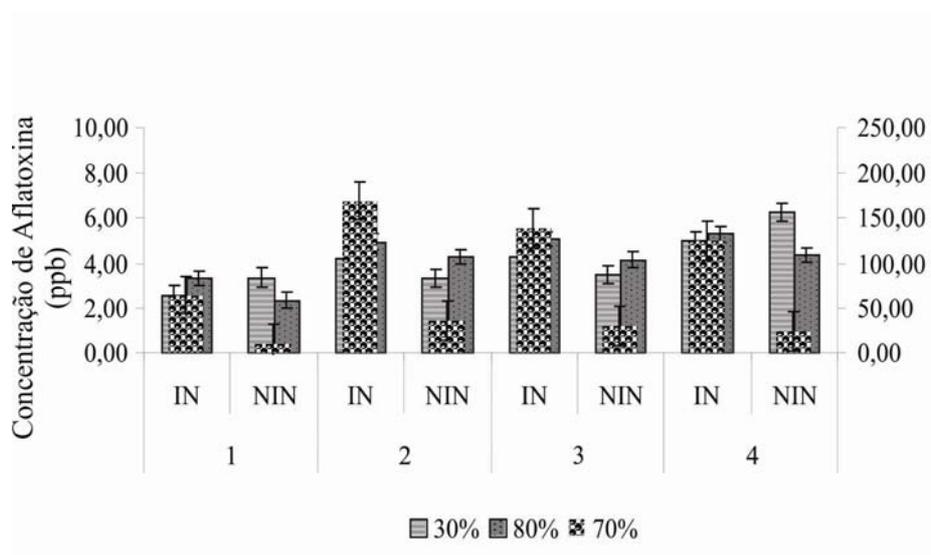


Figura 6 – Valores médios (ppb) de aflatoxina dos grãos de milho inoculados (IN) e não inoculados (NIN) com *A. flavus*, armazenados por um período de quatro meses na umidade atmosféricas de 30%, 80% e 74%, respectivamente.

5- Discussão

Os efeitos de fungos de armazenamento em grãos armazenados têm sido alvos de estudos por alguns autores, sendo as informações atuais baseadas em pesquisas realizadas já por algumas décadas. O conhecimento de fatores ou de condições que condicionam ou determinam o crescimento e a produção de toxinas é importante para uma escolha correta de um bom armazenamento.

No presente trabalho o resultado da avaliação do índice de crescimento micelial de *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus* e do *Penicillium sp* (Figura 1 e 2) estão de acordo com os trabalhos de Christensen e Kaufmann (1965) que relatam o comportamento diferencial dos fungos de armazenamento, nos níveis de potenciais osmóticos do substrato. Estes autores ainda relatam que há uma redução no desenvolvimento destes fungos, na seguinte ordem: *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus* e do *Penicillium sp*.

Baseado na habilidade de crescerem em ambientes secos, em uma temperatura mais elevada, os resultados deste estudo, evidenciou o efeito positivo e o efeito negativo da alteração do potencial hídrico à medida que aumentou os potenciais em diferentes temperaturas. Deste modo, Subbarao et al. (1993) verificaram diferenças no crescimento micelial do *Aspergillus niger* quando se combinou diferentes potenciais hídricos com diferentes temperaturas. O aumento dos níveis de potenciais inibiu o crescimento do *Aspergillus níger*, em relação à temperatura, este autor demonstrou que o crescimento micelial foi diretamente proporcional ao aumento.

Estudos sobre o crescimento *in vitro* de fungos em meio de cultura osmoticamente modificado com adição de solutos iônicos e não iônicos, têm sido constatados por vários autores, que estes organismos diferem na habilidade de absorver água do ambiente, e que existe uma faixa de potencial hídrico adequada para cada espécie (Alam et al, 1996; Carvalho, 1999; Coutinho, 2000).

Davis e Baudoin (1985) verificaram um decréscimo no diâmetro das colônias de *Geotrichum candidum* de 48 horas de idade entre os potenciais osmóticos de -1,5 a -2,5, porém, um incremento no crescimento micelial foi observado sob os potenciais de -0,5 a -1,0 MPa. Morley et al (1993). Em seu trabalho com *Ascochyta paspali*, verificaram que o crescimento micelial deste fungo foi reduzido a partir do potencial osmótico de -1,2 MPa sendo inibido a -4,5 MPa.

Em relação a fungos de armazenamento do gênero *Aspergillus* (*Aspergillus ochraceus*, *A. niger* e *A. carbonarius*), outros estudos já demonstraram a influência de diferentes meios de cultura, atividade de água, tempo e temperatura no crescimento micelial dos mesmos. Cabrera et al. (2005) verificaram que houve um comportamento diferencial destes fungos nos diferentes ambientes proporcionados. Estes resultados são compatíveis com os encontrados neste trabalho, em que os diferentes ambientes proporcionaram mudanças no comportamento fungos de armazenamento.

No armazenamento dos grãos inoculados e não inoculados em diferentes níveis de umidade atmosférica, *Aspergillus flavus* após invadir os grãos armazenados provocou grandes perdas significativas na qualidade, estando de acordo com Christensen e Kaufmann (1965) que relatam que os fungos de armazenamento podem causar várias mudanças na qualidade dos grãos tornando-os impróprios para o uso e a comercialização. Fatores como tempo, temperatura, umidade dos grãos e umidade do local de armazenamento podem determinar a infecção por fungos de armazenamento (DINGRA, 1985), que foram determinantes na infecção por *Aspergillus flavus* nos grãos armazenados deste estudo. Foroni et al (2005) relataram que quanto maior a temperatura e o período de armazenamento maior a condutividade elétrica da solução que continha os grãos, indicando maior deterioração da membrana celular desses grãos, conseqüentemente perda na qualidade dos grãos.

A presença do *Aspergillus flavus* nos grãos, neste estudo, não inibiu o crescimento de outros fungos que podem atuar também no armazenamento como *Fusarium verticillioides*, como observado por Farias et al. (2000) que em amostras de grãos de milho encontrou os três dos principais gêneros de fungos: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. De acordo com Christensen e Kaufmann (1965) as espécies de fungos que atuam em grãos têm bem definido os fatores favoráveis para seu desenvolvimento. De acordo com estes autores, *Aspergillus flavus* invade os grãos de milho quando se encontram em equilíbrio com 85% UR, que representa 18% de teor de umidade dos grãos de milho a 25-30°C. Entretanto se o grão estiver em equilíbrio de 70% de UR permitindo o crescimento de outros fungos a água metabólica aumenta o teor de umidade do grão permitindo a invasão por fungos que necessitam de teores de umidade elevados (CHRISTENSEN e KAUFMANN, 1965 e DINGRA, 1985).

Em concordância, ainda, com este estudo, os fungos de armazenamento, de acordo com Sauer et al. (1992) podem desenvolver-se em substrato com baixo teor de umidade, mesmo na ausência de água livre. A alta umidade do grão e a temperatura favorável para a invasão e crescimento do *Aspergillus flavus* no presente estudo indicam que a contaminação fúngica dos grãos com alta umidade associada com a temperatura deteriora rapidamente os grãos, levando ao acúmulo de micotoxina (CHRISTENSEN E MERONUCK, 1986; DIENER et al, 1982;. JELINEK et al., 1989; LILLEHOJ, 1987). Da mesma forma, Janardhana et al. (1999) em seu estudo com 197 amostras de milho coletadas em diferentes regiões climáticas e locais (campo e armazenamento) relataram que 34,8% das amostras analisadas foram consideradas positivas com altos níveis de micotoxina. Segundo este autor, a falta de instalações apropriadas, o manuseio incorreto na pré e pós-colheita em interação com fatores ambientais (umidade, temperatura) e físicos dos grãos (umidade do grão) podem induzir a contaminação, invasão e o acúmulo de toxinas por fungos.

6. Conclusões

Os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus glaucus* e *Penicillium sp.* mostraram que assim como outras espécies, possuem diferentes habilidades em absorver água do ambiente e que para cada espécie há um nível de potencial adequado para o seu crescimento. O crescimento maior de *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus glaucus*, neste estudo, em substrato com restrição hídrica elevada, confirmam relatos anteriores para estas espécies. O uso do soluto glicerol proporcional maior crescimento dos fungos em estudo em potenciais mais elevados, diferentemente do soluto NaCl que inibiu o crescimento destes fungos.

A umidade atmosférica de 70% determinou os maiores valores de produção de aflatoxina, por *Aspergillus flavus*, em contraste aos maiores valores desta toxina produzida em ambiente de umidade atmosférica de 80%.

7. Referências Bibliográficas

AIDOO, K. E. Post-harvest stored and preservation of tropical crops. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 161-173, Oct. 1993.

ALVES, W. M.; D' ANTÔNIO FARONI, L. R.; QUEIROZ, D. M. Avaliação de perdas em milho causadas por diferentes umidades de colheita. In: CONFERÊNCIA BRASILEIRA DE PÓS-COLHEITA, 1., 1999, Porto Alegre. **Anais...**Porto Alegre: Abrapós, 1999. p.123-127.

ALMEIDA, A. P.; CORREA, B.; MALLOZZI, M. A. B. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 321-326, 2000.

ASEVÊDO, I.G., GAMBALE, W., CORRÊA, B., *et al.* Mycoflora and aflatoxigenic species of *Aspergillus spp* isolated from stored maize. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 25, n. 1 p. 46-50, 1994.

BAKKER-ARKEMA, F. W. CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume IV Agro-Processing Engineering, Published by: American Society of Agricultural Engineers. 1999. 527 p.

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

CAST. Council for Agricultural Science and Technology. Mycotoxins: risk in plant and animal systems. In Task Force Report 139; CAST: Ames, IA, 2003, 199p .

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. **Fungos associados a frutos e grãos de café *Aspergillus & Penicillium***. Brasília, DF: Embrapa, 2003. 69 p.

Christensen, C.M., Kaufmann, H.H., 1965. Microflora. In: Christensen, C.M. (Ed.), Storage of Cereal Grains and their Products. Monograph Series, vol. 5. American Association of Cereal Chemists, pp. 158e192. 615.

CONAB, disponível em: <http://www.conab.gov.br> acessado em 15 de Janeiro de 2011.

COSTA, M.L.N. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro por meio da restrição hídrica. (Tese de Mestrado). Lavras. Universidade Federal de Lavras. 2000

COUTINHO, W.M. Uso da restrição hídrica no controle da germinação de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em testes de sanidade. Dissertação de Mestrado. Lavras MG. Universidade Federal de Lavras. 2000.

D'ARCE, M. A. B. R. Pós-colheita e armazenamento de grãos. Material didático. Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, ESALQ/USP, 2009

Davis, L.L.; Baudoin, A.B.A.M. Effect of osmotic potential on *Geotrichum candidum*: growth, polygalacturonase production, and polygalacturonase action. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 1985.

Delouche, J.C.; Mathes, R.K.; Dougherty, G.M. & Boyd, A.H. Storage os seeds in sub-tropical and tropical regions. *Seed Science & Technol.*, 1:671-700, 1973.

Diener U. L. and Davis N. D. (1966) Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus*. *Phytopathology* 56, 1390±1393.

DHINGRA, O.D.; COELHO NETO, R.A. Micotoxinas em grãos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.6, n.1, p.49-101, 1998.

DHINGRA, ONKAR O. Prejuízos Causados por Microorganismos durante o armazenamento de sementes. *Revista Brasileira de Sementes*, vol. 7, no 1, p. 139-146, 1985.

EMBRAPA, disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/mihtml/fgbd01.asp#P>, acessado em 15 de abril de 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO [2008].. Disponível em: <[http:// fa o s t a t . f a o . o r g](http://faostat.fao.org) >
A c e s s o em: 20/12/11.

FARIAS, A. X.; ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M.; ANDERSEN, P. M.; CORRÊA, T. B. S. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no Estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 3, p. 617-621, 2000.

FARONI, L. R. A. *et al.* Avaliação qualitativa e quantitativa do milho em diferentes condições de armazenamento. **Engenharia na Agricultura**, v. 13, n. 03, 193-201, 2005.

FENNELL, D.I., BOTHAST, R.J., LILLEHOJ, E.B. & PETERSEN, R.E. Bright greenish-yellow fluorescence and associated fungi in white corn naturally contaminated with aflatoxins. In: SINGH, K., FRISVAD, J.C., THRANE, V. &

FERREIRA, D. F. SISVAR: Um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposio** 6:36-41, 2008

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C.; THRANE, U. Moulds in food spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 33, p. 85-102, 1996

GOURAMA, H. & BULLERMAN, L.B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: A review. *J. Food Prot.*, 58(12):1395-1404, 1995.

HARA, S. In: WICKLOW, D.T., SHOTWELL, O.L. & ADAMS, G.L. Use of aflatoxin producing ability medium to distinguish aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41(3):697-699, 1981.

Herman, T. and Trigo- Stockli, D. (2008) : "Mycotoxins in feed grains and ingredients". Mycotoxins Technical Articles, Engormix. Com., 12.

ÍNDICE FUNGORUM, disponível em: <http://www.indexfungorum.org/names/genusrecord.asp?RecordID=9257>, acessado em 17 de Janeiro de 2010.

Jelinek C. F., Pohland A. E. and Wood G. E. (1989) World wide occurrence of mycotoxins in foods and feeds an update. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 72, 223±230.

Klich MA., 2002 Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht, Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures. 116 p

KRZYZANOWSKI FC. 1999. VIEIRA RD, Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI FC; VIEIRA RD; FRANÇA NETO JB (eds). Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES. cap.4. p.1-26.

Lillehoj E. B. (1987) The a⁻atoxin in maize problem: the historical perspectives. In A⁻atoxin in Maize, ed. M. S. Zuber, E. B. Lillehoj and B. L. Renfro. Proceedings of the Workshop, CIMMYT, Mexico, DF.

LIN, M.T. & DIANESE, J.C. A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus spp.* *Phytopathology*, 66:1466-1469, 1976.

MORLEY, T. B.; WILLIAMS, B. L.; PRICE, T. V. The effects of water stress on the incidence and severity of paspalum leaf blight and on *Ascochyta paspali*. **Australasian Plant Pathology**, v. 22, n. 3, p.105-110, 1993.

MACHADO, J. da C. **Patologia de sementes**: fundamentos e aplicações. Lavras: UFLA/FAEPE, 1988, 2002. 106 p.

MILLER, J. D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research**, v. 31, n. 1, p. 1-16, 1995.

NEERGAARD, P. - *Seed Pathology*. London: Macmillan, 1979. 839 p.

NESCI, A.; RODRIGUEZ, M.; ETCHEVERRY, M. Control of *Aspergillus* growth and aflatoxin production using antioxidants at different conditions of water activity and pH. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 2, p. 279-287, 2003.

PALACIOS-CABRERA, H.; TANIWAKI, M. H.; MENEZES, H. C.; IAMANAKA, B. T. The production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in raw coffee at different equilibrium relative humidity and under alternating temperatures. *Food Control*, v.15, p. 531-535, 2005.

Payne G. 1998. Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impacts on crops. In *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*, ed. KK Sinha, D Bhatnagar. New York: Marcel Dekker

PINTO, N. F. J. de A. Tratamento químico de grãos de sorgo úmidos visando o controle de fungos de armazenamento. *Revista Brasileira de Armazenamento*. v.6, n.2, p. 55-59, 2001.

Pitt, J. I. & Hocking, A. D. 1997. *Fung and Food Spoilage* 2nd ed. London, U.K.; Blackie Academic & Professional.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important. **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, p. 17-22, 2000. Supplement.

POMERANZ, Y. **Biochemical, functional and nutritive changes during storage.** In: CHRISTENSEN, C.M. (ed). Storage of cereal grains and their products, p. 145-217, 1982.

PUZZI, D. – **Abastecimento e Armazenagem de Grãos.** Instituto Campineiro de Ensino Agrícola. 2000. 660p.

RADÜNZ, L. L.; DIONELLO, R. G.; ELIAS, M. C.; BARBOSA, F. F. Influência do método de armazenamento na qualidade física e biológica de grãos de milho. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 31, n. 2, p. 136-143, 2006.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food-borne fungi.** 4. ed. Centraalbureau: Voor Schimmelcultures Baarn Delft, 2000.

Sauer, D.B., Meronuck, R.A., Christensen, C.M., 1992. Microflora. In: Sauer, D.B. (Ed.), Storage of Cereals grains and their Products, fourth ed. American Association of Cereal Chemists, pp. 313e340 (chapter 9).

SMITH, M.T. & BERJAK, P. Deteriorative changes associated with the loss of viability of storage desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. In: KIMOJEL, Y. & GOLILI, G. (eds.) Seed development and germination. New York: Marcel Dekker Inc., 1995. p.701-746.

SUBBARAO, K.V.; MICHAELIDES, T.J.; MORGAN, D.P. Effects of osmotic potential and temperature on growth of two pathogens of figs and a biocontrol agent. **Phytopathology**, v. 83, n. 12, p. 1454-1459, 1993.

Taniwaki, M. H.; Silva, N. **Fungos em Alimentos: ocorrência e detecção.** Campinas: Núcleo de Microbiologia ITAL, 2001. 82p.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÉREN, J.; MESTERHÁZY, Á. Recent advances in ochratoxin research I: Production, detection and occurrence of ochratoxins. *Cereal Research Communications*, v. 29, p. 85-100, 2001.

Whitlow L.W., Hagler W.M. (2005) "Mycotoxins in dairy cattle: occurrence, toxicity, prevention and treatment" in *Proceeding of Southwest Nutritional Conference*, pp. 124-138

ZAHA, A. **Biologia Molecular Básica.** Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996. 336p.

