



SIRLEI CRISTINA DE SOUZA

**CRESCIMENTO DE *Aspergillus carbonarius* E
Aspergillus ochraceus E PRODUÇÃO DE
OCRATOXINA A EM MEIO DE CULTURA
SINTÉTICO E A BASE DE PRODUTOS
AGRÍCOLAS**

LAVRAS – MG

2014

SIRLEI CRISTINA DE SOUZA

**CRESCIMENTO DE *Aspergillus carbonarius* E *Aspergillus ochraceus* E
PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A EM MEIO DE CULTURA
SINTÉTICO E A BASE DE PRODUTOS AGRÍCOLAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Luís Roberto Batista

Coorientadora

Dr. Sara Maria Chalfoun

LAVRAS – MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Souza, Sirlei Cristina de.

Crescimento de *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus*
e produção de ocratoxina A em meio de cultura sintético e a base de
produtos agrícolas / Sirlei Cristina de Souza. – Lavras : UFLA,
2014.

84 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Luis Roberto Batista.

Bibliografia.

1. Micotoxinas. 2. Fungos ocratoxigênicos. 3. Alimentos. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.23

SIRLEI CRISTINA DE SOUZA

**CRESCIMENTO DE *Aspergillus carbonarius* E *Aspergillus ochraceus* E
PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A EM MEIO DE CULTURA
SINTÉTICO E A BASE DE PRODUTOS AGRÍCOLAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2014.

Dra. Sara Maria Chalfoun EPAMIG

Dr. Rodrigo Luz da Cunha EPAMIG

Dr. Luís Roberto Batista
Orientador

LAVRAS – MG

2014

A Waldemar Cardozo de Souza, meu pai (in memoriam), que me amou antes mesmo do meu nascimento e esse amor se reflete até hoje.

A Maria das Graças, minha mãe amada, exemplo de mulher e a quem eu devo todas as minha conquistas.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre iluminar meus caminhos e por fazer com que esse sonho se realizasse.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade concedida para realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), pelo apoio estrutural e a disponibilidade de seus laboratórios.

Ao meu orientador, Dr. Luis Roberto Batista, pelos ensinamentos, paciência, compreensão e confiança em meu trabalho. Muito obrigada!

À minha coorientadora, Dra. Sara Maria Chalfoun, pela dedicação, disponibilidade e apoio em momentos de muitas dúvidas. Serei sempre grata!

À Professora Dra. Maria das Graças Cardoso e ao doutorando Wilder Douglas Santiago, do Departamento de Química da UFLA, pela cooperação e disposição para me ajudar.

À minha mãe, pelo apoio incondicional, pela paciência em momentos difíceis, por acreditar que eu sou capaz de chegar muito mais longe. Amo-te!

As minhas amigas do Laboratório de Micologia e Micotoxinas do Departamento de Ciências dos Alimentos (DCA), Fabiana Couto, Vanessa, Mariana, Gislaine, Fabiana Passamani, Michelle, Ábiah, Thaiana, Nathasha, Priscilla, Daniele e Luísa, pela ajuda em meus experimentos, pela troca de experiências e momentos de descontração.

Ao Núcleo de Estudos de Taxonomia Polifásica de *Aspergillus* e *Penicillium* (NETAX), pela oportunidade de aprofundar os meus conhecimentos.

*"Depois de termos conseguido subir a uma grande montanha, só descobrimos
que existem ainda maiores montanhas para subir."*

Nelson Mandela

RESUMO GERAL

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos e podem ser encontrados em diferentes produtos agrícolas. Entre as micotoxinas conhecidas atualmente, destaca-se a ocratoxina A, produzida principalmente por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, que apresenta propriedades nefrotóxicas, teratogênicas e imunotóxicas o que representa um sério risco para a saúde humana e animal. A sua presença em qualquer alimento ou bebida é indesejável, tanto do ponto de vista da saúde quanto economicamente. Neste trabalho, objetivou-se avaliar a taxa de crescimento e a produção de ocratoxina A por *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* em diferentes meios de cultura à base de alimentos e sintético. Foram utilizados meios de cultura à base de grãos de café beneficiado, trigo e fubá, os quais foram preparados nas seguintes proporções: 30 g de alimento, 20 g de ágar e 1000 ml de água, e o meio de cultura sintético: Yeast Extract Sucrose Agar (YES) e preparados segundo instruções da embalagem. *A. carbonarius* e *A. ochraceus* foram inoculados nos quatro meios de culturas e incubados em B.O.D a 15 °C e 25 °C durante 25 dias. As medições dos diâmetros das colônias foram feitas a cada 48 horas para descrição da taxa de crescimento. O screening inicial de produção de OTA foi feito, por meio de Cromatografia de Camada Delgada (CCD). A quantificação de OTA foi feita por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) durante três períodos diferentes (5° 15° e 25° dia). As medidas de pH foram feitas com fitas de papel quantitativas. *A. carbonarius* abaixou drasticamente os valores de pH dos meios testados, chegando ao valor ácido de 2. Todos isolados apresentaram maior taxa de crescimento no meio YES a 25 °C, entretanto houve crescimento em todos os meios de cultura nas duas temperaturas testadas. O meio de cultura que levou a uma menor taxa de crescimento foi o meio à base de milho. O meio que mais induziu a produção de OTA foi YES. Em meios de cultura à base de alimentos os isolados de *A. ochraceus* produziram baixas quantidades de OTA, chegando ao máximo de 0,39µg/g. Entretanto, os isolados de *A. carbonarius*, produziram quantidades bem maiores, destacando-se os isolados CDCA0126 que produziram 29,83µg/g a 15° em YES, 13,06 em meio à base de trigo a 15 °C e o isolado CDCA0169 produziu 8,3µg/g em meio de café a 15 °C. E o isolado CDCA0126 produziu 5,07 µg/g em meio de café a 25 °C. Portanto, foi possível concluir que diferentes condições de temperatura, tempo de incubação e tipo de substrato podem influenciar o crescimento fúngico, como a produção de ocratoxina A, e que conhecendo as condições favoráveis e desfavoráveis para a síntese de OTA é possível minimizar as possibilidades de contaminação dos alimentos.

Palavras-chave: Micotoxina. Fungos. Alimentos.

GENERAL ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites produced by different filamentous fungi and can be found in different agricultural products. Among the currently known mycotoxins, the ochratoxin A stands out, produced mainly by species of *Aspergillus* and *Penicillium*, which has nephrotoxic, teratogenic and immunotoxic properties representing a serious risk to human and animal health. Their presence in any food or beverage is undesirable from an economic and health point of view. The objective of this study was to evaluate the growth rate and production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* in different synthetic and food-based culture media. Culture media based on green coffee beans and, wheat and corn meal were used, which were prepared in the following proportions : 30 g of feed, 20 g of agar and 1000 ml of water, and the synthetic culture medium: Yeast Extract Sucrose Agar (YES) prepared according to package directions. *A. ochraceus* and *A. carbonarius* were inoculated in the four culture media and incubated in a chamber at 15 °C and 25 °C for 25 days. The colony diameter measurements were taken every 48 hours for growth rate description. The initial screening of OTA production was done through Layer Chromatography (TLC). Quantification of OTA was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for three different periods (5th to 15th and 25th day). The pH measurements were performed by Quantitative test strips. *A. carbonarius* dramatically lowered the pH of the media tested, reaching the acid value of 2. All isolates showed a higher growth rate in YES medium at 25 °C, however, there was growth in all culture media at both temperatures. The culture medium leading to the lowest growth rate was the corn based medium. The medium that most induced the production of OTA was YES. In culture media based on the food isolates, *A. ochraceus* produced low amounts of OTA, reaching a maximum of 0.39 mg / g . However, isolates of *A. carbonarius* produced a much higher amount, highlighting the CDCA0126 isolates that produced 29.83 mg/g at 15° in YES, 13.06 in the wheat based at 15 °C and isolate CDCA0169 that produced 8.3µg/g in the coffee medium at 15 °C. Isolate CDCA0126 produced 5.07 mg/g in the coffee medium at 25 °C. Therefore, we conclude that different conditions of temperature, incubation time and substrate type can influence fungal growth, as the production of ochratoxin A, and that knowing the favorable and unfavorable conditions for the synthesis of OTA, it is possible to minimize the chances of food contamination.

Keywords: Mycotoxin. Fungi. Food.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

| | | |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Estrutura química da ocratoxina A | 28 |
|----------|---|----|

CAPÍTULO 2

| | | |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Placa de CCD, com seis isolados (A) CDCA0169, (B) CDCA0170, (C) CDCA01261 (<i>A.carbonarius</i>) e (D) CDCA0151, (E) CDCA0153, (F) CDCA0162 (<i>A.ochraceus</i>); (P) padrão de OTA, visualizada sob luz UV a 366 nm, após sete dias de incubação em CYA..... | 59 |
| Figura 2 | Imagens das colônias do isolado CDCA0126 (<i>A. carbonarius</i>) em diferentes meios de cultura a 25 °C; (A) Meio YES; (B) Meio de café; (C) Meio de milho e (D) Meio de trigo..... | 68 |
| Figura 3 | Imagens das colônias do isolado CDCA0626 (<i>A. ochraceus</i>) em diferentes meios de cultura a 25 °C; (A) meio YES; (B) meio de café; (C) meio de milho e (D) meio de trigo | 69 |
| Figura 4 | Cromatogramas dos tratamentos em diferentes combinações de fatores. (A) CDCA0126 em meio YES no 15° dia a 15 °C; (B) CDCA0162 em meio YES no 25° dia a 25 °C..... | 70 |

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 2

- Gráfico 1 Valores de pH dos seis isolados: CDCA0169, CDCA0170, CDCA0126 (*A.carbonarius*) e CDCA0151, CDCA0153, CDCA0162 (*A.ochraceus*), cultivados em meio YES a 15 °C e 25 °C no 25° dia60
- Gráfico 2 Valores de pH dos seis isolados: CDCA0169, CDCA0170, CDCA0126 (*A.carbonarius*) e CDCA0151, CDCA0153, CDCA0162 (*A.ochraceus*), cultivados em meio de café a 15°C e 25 °C no 25° dia61
- Gráfico 3 Valores de pH dos seis isolados: CDCA0169, CDCA0170, CDCA0126 (*A.carbonarius*) e CDCA0151, CDCA0153, CDCA0162 (*A.ochraceus*), cultivados em meio de trigo a 15 °C e 25 °C no 25° dia61
- Gráfico 4 Valores de pH dos seis isolados: CDCA0169, CDCA0170, CDCA0126 (*A.carbonarius*) e CDCA0151, CDCA0153, CDCA0162 (*A.ochraceus*), cultivados em meio de milho a 15 °C e 25 °C no 25° dia62
- Gráfico 5 Curva de crescimento dos seis isolados: CDCA0169, CDCA0170, CDCA0126 (*A.carbonarius*) e CDCA0151, CDCA0153, CDCA0162 (*A.ochraceus*), cultivados em meio YES a 15 °C durante 24 dias63
- Gráfico 6 Curva de crescimento dos seis isolados: CDCA0169, CDCA0170, CDCA0126 (*A.carbonarius*) e CDCA0151, CDCA0153, CDCA0162 (*A.ochraceus*), cultivados em meio de café a 15 °C durante 24 dias63

| | | |
|------------|--|----|
| Gráfico 7 | Curva de crescimento dos seis isolados: CDCA0169, CDCA0170, CDCA0126 (<i>A.carbonarius</i>) e CDCA0151, CDCA0153, CDCA0162 (<i>A.ochraceus</i>), cultivados em meio de trigo a 15 °C durante 24 dias | 64 |
| Gráfico 8 | Curva de crescimento dos seis isolados: CDCA0169, CDCA0170, CDCA0126 (<i>A.carbonarius</i>) e CDCA0151, CDCA0153, CDCA0162 (<i>A.ochraceus</i>), cultivados em meio de milho a 15 °C durante 24 dias | 64 |
| Gráfico 9 | Curva de crescimento dos seis isolados: CDCA0169, CDCA0170, CDCA0126 (<i>A.carbonarius</i>) e CDCA0151, CDCA0153, CDCA0162 (<i>A.ochraceus</i>), cultivados em meio YES a 25 °C durante 24 dias | 65 |
| Gráfico 10 | Curva de crescimento dos seis isolados: CDCA0169, CDCA0170, CDCA0126 (<i>A.carbonarius</i>) e CDCA0151, CDCA0153, CDCA0162 (<i>A.ochraceus</i>), cultivados em meio de café a 25 °C durante 24 dias | 65 |
| Gráfico 11 | Curva de crescimento dos seis isolados: CDCA0169, CDCA0170, CDCA0126 (<i>A.carbonarius</i>) e CDCA0151, CDCA0153, CDCA0162 (<i>A.ochraceus</i>), cultivados em meio de trigo a 25 °C durante 24 dias | 66 |
| Gráfico 12 | Curva de crescimento dos seis isolados: CDCA0169, CDCA0170, CDCA0126 (<i>A.carbonarius</i>) e CDCA0151, CDCA0153, CDCA0162 (<i>A.ochraceus</i>), cultivados em meio de milho a 25 °C durante 24 dias | 66 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1 Potencial toxigênico das principais espécies de *Aspergillus* que contaminam alimentos.....20
- Tabela 2 Micotoxina mais relevantes para a segurança alimentar produzidas por diferentes gêneros de fungos filamentosos.....24
- Tabela 3 Principais toxinas encontradas em produtos agro-alimentares26

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 Relação de microrganismos utilizados para avaliação da produção de ocratoxina A52
- Tabela 2 Resumo da análise de variância das médias e coeficientes de variação referente à concentração de ocratoxina A em isolados de *A. carbonarius* e *A. ochraceus* submetidos a diferentes meios de cultura, temperaturas e tempos de avaliação71
- Tabela 3 Concentração de ocratoxina A produzida por três isolados de *A. ochraceus* em diferentes meios de cultura, temperatura e tempo de incubação.....72
- Tabela 4 Concentração de ocratoxina A produzida por três isolados de *A. carbonarius* em diferentes meios de cultura, temperatura e tempo de incubação.....73

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 1 Introdução Geral..... | 15 |
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 18 |
| 2.1 Importâncias de fungos toxigênicos em alimentos | 18 |
| 2.2 Fatores envolvidos no desenvolvimento de fungos toxigênicos em alimentos | 21 |
| 2.3 Micotoxinas..... | 23 |
| 2.4 Ocratoxina A em alimentos e bebidas | 28 |
| 2.5 Ocratoxina A em trigo | 30 |
| 2.6 Ocratoxina A em milho..... | 31 |
| 2.7 Ocratoxina A em café | 32 |
| 2.8 Técnicas de estudo e detecção do desenvolvimento de fungos toxigênicos e produção de ocratoxina..... | 34 |
| REFERÊNCIAS | 36 |
| CAPÍTULO 2 Crescimento de <i>Aspergillus carbonarius</i> e <i>Aspergillus ochraceus</i> e produção de ocratoxina a em diferentes meios de cultura | 48 |
| 1 INTRODUÇÃO | 50 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 52 |
| 2.1 Local de estudo | 52 |
| 2.2 Obtenção de microrganismos..... | 52 |
| 2.3 Screening do potencial ocratoxigênico dos isolados | 53 |
| 2.4 Meio de cultura padrão | 53 |
| 2.5 Meios de cultura à base de alimentos | 54 |
| 2.6 Medição da atividade de água..... | 54 |
| 2.7 Preparação e inoculação de esporos para avaliação do crescimento fúngico e para quantificação de OTA..... | 55 |
| 2.8 Medição do pH | 56 |
| 2.9 Análises de OTA..... | 56 |
| 2.10 Extração | 56 |
| 2.11 Quantificações por CLAE | 56 |
| 2.12 Análises estatísticas | 57 |
| 3 RESULTADOS | 59 |
| 3.1 Potencial ocratoxigênico dos isolados..... | 59 |
| 3.2 Medição da atividade de água..... | 59 |
| 3.3 Medição do pH | 60 |
| 3.4 Curva de crescimento em diferentes condições de tempo, temperatura e substrato | 62 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.5 | Quantificações de OTA por CLAE..... | 69 |
| 4 | DISCUSSÃO..... | 75 |
| 5 | CONCLUSÃO..... | 79 |
| | REFERÊNCIAS..... | 80 |

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

As micotoxinas são produtos do metabolismo secundário de algumas espécies de fungos filamentosos e têm atraído as atenções mundiais pelos seus efeitos tóxicos em humanos e animais. Sua diversidade estrutural acarreta em um complexo diagnóstico dos seus impactos na saúde pública, além do eminente risco econômico de alimentos contaminados para os produtores em geral, pois, cerca de 25% dos produtos agrícolas, estão contaminados por micotoxinas. Estas podem ser encontradas em vários alimentos como: cereais, milho, frutas secas, frutas, sementes oleaginosas e especiarias, mas também em produtos de origem animal como o leite, ovos e carne, em razão da sua capacidade de permanecer ao longo da cadeia alimentar.

A Ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por diversas espécies de fungos filamentosos, especialmente dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* que são muito difundidos em diferentes produtos agrícolas, e têm uma importante peculiaridade que é resistência a altas temperaturas durante seu processamento. Dentre as ocratoxinas a OTA é mais potente e mais relevante no aspecto nocivo à saúde, isso se deve as suas propriedades carcinogênicas, nefrotóxicas, teratogênicas, imunotóxicas e neurotóxicas.

Apesar dos aprimoramentos nas técnicas de produção e de armazenagem, não é possível impedir completamente o desenvolvimento fúngico nos alimentos, consequentemente, a ocratoxina A não pode ser totalmente eliminada. Portanto, devem ser fixados limites tão baixos quanto razoáveis, determinados por órgãos responsáveis, para que os alimentos possam ser consumidos com baixo risco à saúde.

O crescimento fúngico e subsequente produção de OTA estão ligados a diversos fatores, os quais incluem a temperatura, umidade durante a colheita, a secagem, atividade de água do alimento e o armazenamento dos produtos.

Os métodos de análise, cada dia mais, têm demonstrado agilidade e eficácia nos resultados, não só em alimentos e produtos animais, como também preparados laboratoriais como meios de cultura à base de alimentos utilizados para crescimento de fungos ocratoxigênicos, os quais podem ser cultivados em condições físicas e químicas extremamente controladas.

No Brasil, há necessidade de mais estudos sobre a produção de ocratoxina A em alimentos, principalmente em grãos, nos quais os fungos apresentam alta taxa de crescimento e potencial produção de OTA, em decorrência dos fatores favoráveis como a atividade de água reduzida.

Os estudos sobre produção de micotoxinas por espécies ocratoxigênicas em meios de cultura baseada em alimentos podem ajudar a estimar a quantidade de OTA em alimentos em condições ambientais favoráveis aos fungos. Dessa forma, neste trabalho, objetivou-se estudar o crescimento e produção de OTA pelas espécies *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* nos meios de cultura à base de grãos de café beneficiado, trigo, milho e um meio de cultura padrão sintético: Yeast Extract Sucrose Agar (YES).

A dissertação apresenta-se dividida em dois capítulos, sendo o Capítulo 1 uma revisão bibliográfica, na qual, são abordados os seguintes temas: Importância de fungos toxigênicos em alimentos; Fatores envolvidos no desenvolvimento de fungos toxigênicos em alimentos; Micotoxinas, Ocratoxina A em alimentos e bebidas; Ocratoxina em milho; Ocratoxina em trigo; Ocratoxina em café e Técnicas de estudo do desenvolvimento de fungos toxigênicos e produção de ocratoxina.

No Capítulo 2, avalia-se o crescimento fúngico e a quantificação de ocratoxina A por *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* em diferentes

meios de cultura à base de grãos de café beneficiado, trigo, milho e um meio de cultura padrão sintético: Yeast Extract Sucrose Agar (YES), em detrimento do tempo e temperatura.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importâncias de fungos toxigênicos em alimentos

Existem mais de 80 espécies micotoxigênicas, que podem produzir mais de 300 diferentes estruturas de micotoxinas, sendo que algumas espécies são capazes de produzir mais de um tipo e podem ser encontradas simultaneamente em um único produto (CARDOSO FILHO, 2012).

O crescimento de fungos filamentosos nos alimentos pode resultar na produção de micotoxinas, que podem causar uma variedade de efeitos adversos, em seres humanos, a partir de respostas alérgicas, de imunossupressão e câncer (ZAIN, 2011). De acordo com Smith et al. (2006), cinco grupos de micotoxinas são importantes para a saúde humana em todo o mundo: ocratoxina A, aflatoxinas, fumonisinas, certos tricotecenos e zearalenona.

Essas toxinas são produzidas por apenas um pequeno número de espécies de fungos, em uma gama limitada de produtos. A ocratoxina A é uma toxina cancerígena, e pode causar câncer do trato urinário e renal. Ela é produzida por *Penicillium verrucosum* em grãos de cereais em climas frios (PITT, 1987), e por *A. carbonarius* em uvas, vinhos (TERRA, 2013), e por *A. ochraceus*, por vezes, nos grãos de café (OLIVEIRA, 2012).

As aflatoxinas também são potentes agentes cancerígenos, produzidas por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* em amendoim, milho e sementes oleaginosas, além disso, as aflatoxinas, quando em associação com o vírus da hepatite B, são responsáveis por milhares mortes por ano, principalmente em países tropicais não industrializados (PERRONE et al., 2014; EZEKIEL et al., 2013).

As fumonisinas, que podem causar câncer esofágico, são formadas por *Fusarium moniliforme* e *F. proliferatum*, mas somente no milho (FERROCHIOA et al., 2013).

Tricotecenos são altamente imunossupressores e zearalenona provoca efeitos estrogênicos, ambos são produzidos por *F. graminearum* e espécies afins (PINTO; PATRIARCA; POSE, 2013). Relatórios correntes provavelmente subestimam o efeito de micotoxinas como uma causa de mortalidade humana (PITT, 2000).

Essas toxinas vêm causando grandes epidemias no homem e animais há centenas de anos. As epidemias mais importantes foram: ergotismo, que matou centenas de milhares de pessoas na Europa no último milênio. Aleucia tóxica alimentar (ATA), que foi responsável pela morte de pelo menos 100 mil pessoas russas entre 1942 e 1948. Intoxicação pelos fungos do gênero *Stachybotry*, matou dezenas de milhares de cavalos no URSS na década de 1930. E aflatoxicose, que matou 100 mil filhotes de perus no Reino Unido em 1960 e causou a morte e a doença em outros animais (STEVENS et al., 1960; MERHOFF; PORTER, 1974; PERAICA et al., 1999; KUHN; GHANNOUM, 2003).

As micotoxicoses são causadoras de diversos surtos por todo o mundo, um dos exemplos mais recentes ocorreu em 2004, no Quênia, onde uma aflatoxicose que pode ser produzida por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius* e *Aspergillus parasiticus* levou à morte de mais de 120 vítimas (MUTURE; OGANA, 2005).

Diferentes autores estudaram espécies de *Aspergillus* e encontram um alto potencial toxigênico desse gênero em alimentos, como é possível observar na Tabela 1.

Tabela 1 Potencial toxigênico das principais espécies de *Aspergillus* que contaminam alimentos

| Espécies | Micotoxinas | Referências |
|-----------------------|--|---|
| <i>A. aculeatus</i> | Ácido itacónico B, D e F | (ANTIA et al., 2011) |
| <i>A. candidus</i> | Ácido Kojico, candidulina, terfenilina, Xantoacina | (HUE et al., 2013) |
| <i>A. clavatus</i> | Citochalasin E, patulina, ascladiol, clavato, triptoquivalinas | (SNINI et al., 2014) (GNIADK et al., 2012) |
| <i>A. carbonarius</i> | Ocratoxina A | (GARCIA-CELA et al., 2011) (CRESPO-SEMPERE et al., 2013) |
| <i>A. carneus</i> | Citrinina | (TEIXEIRA et al., 2012) |
| <i>A. flavus</i> | Aflatoxina B1 e B2, ácido aspergílico, ácido ciclopiazônico, Ácido Kójico, ácido 3-nitropropionico, paspalinas | (AMAIKEL e KELLER., 2011) |
| <i>A. fumigatus</i> | Fumitremorginas A e C, gliotoxinas, fumigaclavinas, fumitoxinas, fumigatinas, fumagilinas, triptoquivalinas | (BRUNS et al., 2010) (PENA et al., 2010) |
| <i>A. niger</i> | Ocratoxinas, malforminas, naptoquinonas, fumonisina B2 | (SOARES et al., 2013) |
| <i>A. nomius</i> | Aflatoxinas B e G, ácido aspergílico, ácido kójico | (OLSEN et al., 2013) |
| <i>A. ochraceus</i> | Ocratoxinas, ácido penicílico, ácido kójico, A, xantomegnina | (HARRIS e MANTLE, 2001) |
| <i>A. oryzae</i> | Ácido ciclopiazônico, ácido kójico | (BARBESGAARD et al., 1992) |
| <i>A. parasiticus</i> | Aflatoxina B e G, ácido aspergílico, Aflavininas | (DORNEL et al., 1984) |
| <i>A. tamaritii</i> | Ácido ciclopiazônico, ácido kójico | (GOTO et al 1996) (TAMANO et al., 2013) |
| <i>A. terreus</i> | Citrinina, patulina, citreoviridina, mevinolina, ácido terreico | (GRESSLER et al 2011) |

2.2 Fatores envolvidos no desenvolvimento de fungos toxigênicos em alimentos

O crescimento de fungos e consequente produção de OTA são determinados por uma ampla gama de parâmetros, classificados em físicas, químicas e biológicas, e por interações que envolvem esses fatores (NIELSEN, 2003). A biossíntese de OTA pode ser influenciada por fatores intrínsecos ecofisiológicos, tais como umidade, pH, e a composição do substrato, bem como fatores extrínsecos, tais como a temperatura. A flora endógena competitiva própria dos alimentos também é um fator contribuinte. Além disso, as espécies de *Aspergillus* são capazes de crescer numa variedade de climas e produtos alimentares e este pode oferecer uma explicação adequada para a prevalência a nível mundial do OTA (JORGENSEN, 2005).

Os fatores ambientais, como temperatura, esgotamento de nitrogênio, condições de pH, quando diferentes daqueles considerados adequados para o desenvolvimento do fungo, podem desencadear a produção de metabólitos, secundários (SAGARAM; KOLOMIETS; SHIM, 2006). Em condições de estresse, as vias de sinalização induzem, certamente, a produção de micotoxina (CHOI et al., 2008; KOHUT et al., 2009). Portanto, entender os efeitos desses fatores pode auxiliar na redução de micotoxinas, tanto no campo e durante o armazenamento.

O crescimento de fungos e produção de OTA são marcadamente influenciados por diferentes fatores ambientais, os dois mais importante a disponibilidade de água (atividade de água) e temperatura que influenciam a germinação, crescimento e esporulação (MAGAN et al., 2003).

Cada estirpe fúngica tem sua peculiaridade fisiológica e, conseqüentemente, diferentes habitats. A água disponível e a temperatura são

muito importantes, pois condicionam o crescimento e produção de OTA (PARDO et al., 2005).

Estudos de Lasram et al. (2010), demonstram que tanto o crescimento quanto a produção de OTA por *Aspergillus carbonarius* isolados de uvas apresentou atividade de água ótima de 0,99. A produção máxima de toxina ocorreu entre 15 a 25° C e a taxa de crescimento diminuiu significativamente ($P < 0,05$) na temperatura de 37 °C e quantidades significativas de OTA foram produzidos após apenas 5 dias de incubação.

Diversas substâncias podem interferir na produção de OTA. A adição de ácido hidroperoxioctadecenoico (HPODE) ao meio de cultura aumenta a síntese de OTA em *Aspergillus ochraceus* (REVERBERI et al., 2010). Resveratrol, um antioxidante natural presente em frutas vermelhas e vinho, inibe as enzimas da lipoxigenase e da ciclooxigenase e, por sua vez, também inibe a biossíntese de OTA por *A. ochraceus* (FANELLI et al., 2004).

Um importante modulador sobre os níveis de ocratoxina A são os fatores nutricionais. Diferentes fontes de carbono, incluindo glicose, sacarose, maltose, galactose, xilose e glicerol são capazes de reprimir a produção de OTA por *Aspergillus ochraceus*, em contraste, lactose parece induzir a sua produção. Diferentes fontes de nitrogênio também afetam a produção de OTA, o cloreto de amônio reduz significativamente a produção de OTA, enquanto fontes de nitrogênio orgânico, como ureia e aminoácidos, incluindo fenilalanina, lisina, glutamina e prolina, induzem à produção de OTA (ABBAS; VALEZ; DOBSON, 2009).

Além dos fatores ambientais e nutricionais, outros tipos de controles podem ser empregados para minimizar os impactos causados pela contaminação fúngica e consequente produção de micotoxinas. O controle de pré-colheita de fungos toxigênicos trata-se de controle eficiente, que inclui práticas agrotécnicas, tratamentos com fungicidas, métodos de controle biológico,

sistemas integrados de gestão e de engenharia genética (TÓTH et al., 2008) e melhoramento para resistência da planta hospedeira (VELMOUROUGANE; BHAT; GOPINANDHAN, 2010). Estratégias de controle pós-colheita incluem a manutenção de níveis elevados de CO₂ (~75%) em lotes de grãos parcialmente secas ou o uso de óleos essenciais e de antioxidantes. A mais eficiente prevenção de micotoxinas, manejo pós-colheita de hoje, é manter boas condições de armazenamento em paralelo com os sistemas de controle adequados para detectar qualquer aparecimento de deterioração (HORNOK, 2011).

2.3 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários de fungos com baixo peso molecular e com estruturas químicas adequadas para causar uma variedade de efeitos tóxicos em seres humanos e animais (BENNETT; KLICH, 2003). O termo micotoxina deriva da palavra grega Mikes que significa fungo e da palavra latina Toxicum, que significa veneno, ou seja, micotoxina é a toxina produzida por fungos (SCUSSEL, 1998).

Alguns desses compostos podem ser cancerígenos, citotóxicos, estrogênicos, imunossupressores, mutagênicos, nefrotóxicos e teratogênicos. Em caso de ingestão, podem causar distúrbios graves, incluindo alimentar tóxico aleukia (ATA), diarreia, câncer do esôfago, ciclo estral irregular, distúrbios do sistema nervoso, edema pulmonar e vômitos (WINDELS, 2000; HORNOK, 2011).

Uma grande variedade de fungos filamentosos, sob condições apropriadas (tais como umidade e temperatura), podem causar enormes perdas econômicas anuais para o comércio de grãos e comercialização de alimentos e rações (WU, 2006).

As condições climáticas de um país determinam, em grande parte, as classes de fungos que irão crescer e os tipos de micotoxinas que podem produzir (PATERSON; LIMA, 2010). No Brasil, existem condições propícias para o crescimento de todo tipo de fungos produtores de micotoxinas (MAZIERO; BERSOT, 2010).

Há muitas décadas, foi reconhecido que a contaminação de culturas agrícolas por fungos pode ser fonte de problemas de saúde em humanos e animais (Tabela 2), entretanto as ações e sintomas foram anotados há mais de dois milênios (CAMPBELL, 1996).

Tabela 2 Micotoxina mais relevantes para a segurança alimentar produzidas por diferentes gêneros de fungos filamentosos.

| Gênero | Micotoxinas |
|--------------------|--|
| <i>Alternaria</i> | Ácido tinuazônico, alternariol, alternariol metil-éter |
| <i>Aspergillus</i> | Aflatoxina B ₁ , G, M, ocratoxina A, esterigmatocistina, ácido clicopiazônico |
| <i>Claviceps</i> | Ergo-alcalóides |
| <i>Fusarium</i> | Desoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, toxina T-2, diacetoxiscirpenol, fermonisinas, moniliformina |
| <i>Penicillium</i> | Patulina, ocratoxina A, citrina, penitrinina A, ácido clicopiaz |

Fonte: ABRUNHOSA (2008)

O risco de contaminação por micotoxinas surge no campo, onde as plantas são sensíveis à infecção com fungos potencialmente toxigênicos. Durante a maturação, os tecidos da planta entram num estado senescente, seus declínios de resistência basais e parasitas ou mesmo saprófitas pode dar início à colonização. Sob condições ambientais favoráveis a invasão por fungos toxigênicos torna-se mais grave. A colonização por fungos prossegue durante o

armazenamento, especialmente se os produtos vegetais, alimentos e rações que são armazenados em condições quentes e úmidas ou os produtos são inadequadamente secos (Tabela 3) (HORNOK, 2011).

Estima-se que, cerca de 25% de toda produção anual de grão esteja afetada pela presença de micotoxinas, acarretando em eminente risco de problemas de saúde associado à ingestão de produtos contaminados (LAWLOR; LYNCH, 2001).

Tabela 3 Principais toxinas encontradas em produtos agroalimentares

| Produto agrícola | Micotoxinas | Referências |
|-------------------------|---|--|
| Amendoins | Aflatoxina, ácido clicopiazônico | (SANTOS et al., 2001) |
| Café | Ocratoxina A, esterigmatocistina | (OUETHRAVIA et al., 2013) (VERSILOVSKIS et al., 2010) |
| Carnes e ovos | Patulina, citrinina, ocratoxina A, ácido clicopiazônico | (LUI et al., 2011) (FRENICH et al., 2012) |
| Cereais | Desoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, ácido fumonisinas, ocratoxina A, citrinina, esterigmatocistina | (KOBAYASTI e PIRES., 2011) (DUARTE et al., 2010) |
| Figos | Ocratoxina A | (HEPERKAN et al., 2012) |
| Maçãs | Patulina, citrinina | (RAIOLA et al., 2012) (YANG et al., 2014) |
| Milho | Aflatoxina, fumanisinas, citrinina, octaroxina A | MAGNOLI et al., 2007) |
| Produtos lácteos | Aflatoxina M1 e M2, zearalenona, ocratoxina A | (SIGNORINIA et al., 2012) (BELTRANA et al., 2011) |
| Uvas passas e vinhos | Ocratoxina A | (COVARELLIA et al., 2012) |

Embora a produção de micotoxinas dependa do metabolismo secundário dos fungos, isso não implica, necessariamente, que o alimento contendo fungos também tenha a presença de micotoxina. Assim como um alimento determinado, possuidor de micotoxinas, pode não conter mais o fungo produtor, uma vez que esses apresentam uma viabilidade muito menor, dependendo de condições favoráveis, enquanto as micotoxinas são de difícil degradação (ABRUNHOSA, 2008).

Segundo Reverberi et al. (2010), o papel de metabólitos secundários nem sempre é claro, e é evidente que ainda só é possível explicar apenas casos específicos e interações específicas, em vez de a complexidade e diversidade do fenômeno como um todo. No entanto, sabe-se que o estresse oxidativo desempenha um papel fundamental, levando a ideia da "Teoria do estresse oxidativo da biossíntese de micotoxinas", similar para a "teoria dos radicais livres do envelhecimento", apresentando que o estresse oxidativo promove um processo de diferenciação em fungos, metabólitos secundários, tais como micotoxinas, fazem parte do processo de diferenciação e o estresse oxidativo promove o metabolismo secundário.

Em 18 de fevereiro de 2011, foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Esse regulamento possui o objetivo de estabelecer os limites máximos para aflatoxinas (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2 e AFM1), ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON), fumonisinas (FB1 + FB2), patulina (PAT) e zearalenona (ZON) admissíveis em alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias-primas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA, 2011).

2.4 Ocratoxina A em alimentos e bebidas

Ocratoxina A [7 - (L- β -phenylalanylcarbonyl)-carboxi-5-cloro-8-hidroxi-3, 4-di-hidro-3R-metil-isocumarin, OTA] (Figura 1), é uma micotoxina contaminante de alimento comum que entra no corpo humano através do consumo de alimentos contaminados. Após a ingestão, leva a imunossupressão e imunotoxicidade. OTA tem sido conhecida por produzir atividade nefrotóxica, teratogênica e carcinogênica (via dano oxidativo ao DNA) em várias espécies (KAUSHIK et al., 2013). Segundo Marin (2005), as ocratoxinas apresentam um grupo de sete derivados de isocumarina ligados a uma amina que, por sua vez, está unida a um grupo β -fenilalanina.

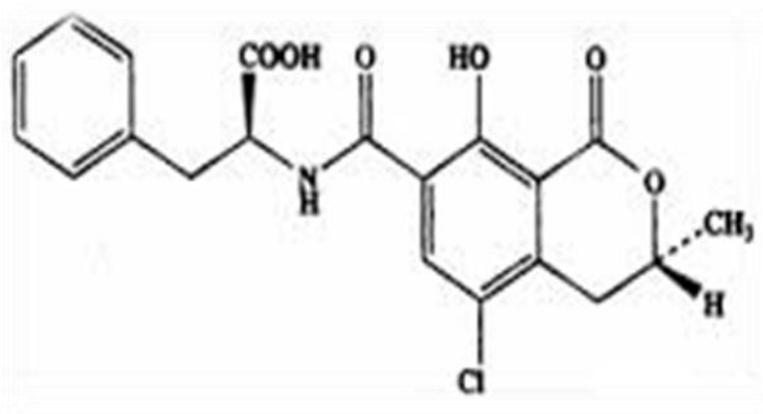


Figura 1 Estrutura química da ocratoxina A

Fonte: Anli e Alkis (2010), modificada

Foi descoberta como um metabólito secundário de *Aspergillus ochraceus*, em 1965, durante um grande estudo sobre metabólitos fúngicos que foi projetado especificamente para identificar novas micotoxinas (VAN DER MERWE et al., 1965).

Ocratoxina A tem atraído muita atenção por causa de sua abundância e toxicidade. OTA é produzida por dois principais gêneros de fungos filamentosos *Aspergillus* e *Penicillium*, que crescem em uma variedade de produtos alimentares. Além disso, a redução dos níveis de OTA em alimentos não é simples, porque é muito resistente aos procedimentos de preparação de alimentos como fermentação e cozimento (BOUDRA; BARS; BARS, 1995).

Além disso, OTA é uma micotoxina com propriedades nefrotóxica, teratogênica e imunotóxica o que representa um sério risco para a saúde humana e animal. *Aspergillus carbonarius* é considerada a principal espécie de fungo produtora de OTA nas uvas e nos produtos tais como passas, vinho ou sucos, embora também tenham sido isolado a partir de café, cacau e cereais (CRESPO-SEMPERE et al., 2013; TERRA et al., 2013; CABAÑES et al., 2002). *Aspergillus ochraceus* também aparece como grande produtor e é isolado, principalmente, de grãos de café (OLIVEIRA, 2012).

Um estudo recente descobriu que a OTA desencadeia a apoptose, pela ativação de uma via dependente de mitocôndria. OTA induz a apoptose, por elevar a produção de ERO, causando um potencial transmembranas mitocondrial, que pode ser perdido através da abertura dos poros das mitocôndrias, desencadeando a liberação de citocromo c, e pela ativação de caspase (BOUAZIZ et al., 2011).

Segundo Hsuuw, Chan e Yu (2013), blastocistos expostos a OTA in vitro, quando implantados em camundongos causa efeitos citotóxicos, levando ao aumento significativo do nível de apoptose e uma redução no número total de células, além disso, retarda o desenvolvimento precoce pós-implantação.

Estudos feitos com a deleção dos genes de fatores de transcrição *veA* e *laeA*, mostram que há uma redução drástica na produção de conídio, a redução chegou a 87,5% dos cultivos no escuro. *A. carbonarius* demonstrou uma ligeira diferença no crescimento vegetativo, mas uma forte redução na produção de

conídios. A produção de OTA também foi avaliada e houve uma variação 68,5-99,4 % em mutantes nulos de *veA* e *laeA*, se comparados a estirpes selvagens. Tais resultados sugerem que *veA* e *laeA* têm um importante papel regulador na produção de conídios e biossíntese de OTA, em resposta à luz em *A. carbonarius* (CRESPO-SEMPERE et al., 2013).

2.5 Ocratoxina A em trigo

Apesar da grande importância do trigo como o principal alimento na dieta diária de muitas pessoas em todo o mundo, são relativamente poucos os estudos feitos sobre a estabilidade da OTA (TROMBETE et al., 2013). Depois da colheita, o trigo é submetido a vários processos tecnológicos e o principal são as temperaturas, inclusive durante o preparo de alimentos pela população.

Segundo Boudra, Bars e Bars (1995), a presença de água (50 %) aumentou a decomposição de OTA em trigo entre 100 e 150 °C; o oposto era observado a 200 °C. A destruição completa da OTA dentro dos limites do estudo (100 a 250 °C) não foi obtida, demonstrando, assim a alta estabilidade da OTA mesmo em elevadas temperaturas.

Estudo semelhante realizado em 2004, quando a estabilidade de ocratoxina A durante a extrusão de farinha de trigo integral foi examinada, usando equipamento em escala piloto. Os fatores analisados foram temperatura, umidade, velocidade do parafuso e tempo de residência. Ocratoxina A foi parcialmente estável, aumentando sua degradação com aumento da temperatura e teor de umidade. No entanto, mesmo sob as mais severas condições susceptíveis a serem utilizadas na prática comercial, a perda máxima não foi superior a 40%, com um tempo de residência de cerca de 40 segundos (SCUDAMORE; BANKS; GUY, 2004). Portanto, a OTA pode sobreviver a muitos procedimentos típicos de processamento de alimentos, e tem sido

relatada no pão feito de trigo contaminado, por exemplo (SCUDAMORE; BANKS; MACDONALD, 2003).

Estudos feitos com farinhas de trigo provenientes de Chapecó (SC), Brasil, em agosto de 2008, demonstraram que a produção de OTA ficou abaixo do limite estipulado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2011) de 10 µg / kg, assim como o da Comissão Europeia, que estabeleceu um limite máximo de 5 µg / kg para grãos de cereais crus e 3 µg / kg para todos os produtos derivados de cereais (BAZIN; NABAIS; LOPEZ-FERBER, 2010., TEIXEIRA et al., 2010; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011). Entretanto, em grãos de trigo analisados na Índia constatou que 26 % das amostras excediam o nível de OTA sugerida pela União Europeia (KUMAR et al., 2012).

2.6 Ocratoxina A em milho

O milho (*Zea mays*) apresenta diferentes variedades e se adapta a diversos climas e condições de temperatura, umidade, e precipitação, por essa razão, o milho é um produto cultivado em escala mundial e é usado tanto para alimentação de animais e humanos (JIMENES et al., 1985). Geralmente, a contaminação dos grãos e seus derivados ocorrem em três momentos distintos: pré-colheita, pós-colheita e armazenamento. Muitos estudos têm sido realizados para analisar a deterioração de ração de milho armazenado, causada pela contaminação de fungos, entretanto há poucas informações sobre a micoflora do milho na pré-colheita.

O milho é um cereal, em que diferentes micotoxinas têm sido encontradas, por exemplo, aflatoxina, ocratoxina A, fumonisinas, zearalenona, deoxinivalenol e outros tricotecenos relacionados (SCUDAMORE; PATEL, 2000). A ocratoxina A normalmente é encontrada na pós-colheita do milho,

podendo ser encontrada também na pré-colheita e na colheita (FERREIRA, 2011). Entretanto, grãos colhidos no campo sem a toxina, quando armazenados com umidade abaixo de 15%, podem ser preservados da contaminação (MOLIN, 1999).

Ocratoxina A já foi detectada em amostras de farinha de milho provenientes da Romênia, Espanha, Colômbia e Equador e em grão para pipoca da França, Espanha, Argentina e EUA. A concentração de OTA nessas amostras variou 0,79-1,71 µg / kg (ALBORCH et al., 2012).

Micobiota predominante, tendo em conta as suas ocorrências e abundância em milho, tem como elementos principais: *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., Mucorales, *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp. e leveduras (ALBORCH et al., 2012) e o processo de moagem pode interferir nas diferentes micoxinas existentes no milho (BURGER, 2013).

2.7 Ocratoxina A em café

Desde meados da década de 70, estudos vêm sendo feitos para entender a contaminação de café verde por fungos ocratoxigênicos (LEVI; TRENK; MOHR, 1974). Estudos concluíram que *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. niger* são os responsáveis pela ocorrência de OTA em café, embora *A. ochraceus* tenha sido focalizado na maioria dos estudos (URBANO et al., 2001).

A contaminação comercial por OTA em cafés embalados é muito comum, apesar do fato de que, uma parte da OTA produzida é destruída durante a torração (OLIVEIRA, 2012). No Reino Unido, cerca de 80% dos cafés instantâneos amostrados, continham até 8 µg / kg o que excede ao atual limite estipulado pela União Europeia que é de 5,0 µg / kg (BAYMAN; AKER, 2006).

No Brasil, cerca de 63%, 31% e 3% das amostras de café pesquisadas em um estudo estavam contaminadas com *A. niger*, *A. ochraceus*, e *A. carbonarius*, respectivamente (TANIWAKI et al., 2003).

Segundo Batista et al. (2009) a maior incidência de fungos filamentosos foi observada no café de varrição e amostras de café boia. As espécies *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus sulphureus* e *Aspergillus sclerotiorum* foram produtoras de ocratoxina A. Em 44% das amostras não foi detectado OTA, no entanto, em 31% a ocratoxina A foi detectada em níveis de 0,1-5,0 ug / kg. Outras amostras, representando 25%, apresentaram contaminação acima de 5,0 mg / Kg .

Durante a torração dos grãos de café, os níveis de OTA são reduzidos drasticamente (ROMANI et al., 2000). O método de preparação do café também parece desempenhar um papel fundamental na degradação da OTA. Após a preparação, a redução de 49,8% de OTA em café expresso, 32,1% em fabricação de cerveja, e de 14,5 % em autogotejamento (OBANOS; GONZÁLEZ-PEÑAS; CERAIN 2005).

As principais espécies produtoras de OTA isoladas de cafés de sistemas de cultivo convencional e orgânico do sul de Minas Gerais foram: *Aspergillus auricoumus*, *A. ochraceus*, *A. ostianus*, *A. niger* e *A. niger* agregado. *Aspergillus ochraceus* correspondeu a 89,55% da produção de OTA. No entanto, não houve diferença significativa em relação à presença de ocratoxigênicas *A. ochraceus* entre os sistemas de cultivo, o que sugere que o risco de contaminação é semelhante para ambos (REZENDE et al., 2013).

2.8 Técnicas de estudo e detecção do desenvolvimento de fungos toxigênicos e produção de ocratoxina

Nem todas as estirpes de uma dada espécie são capazes de produzir micotoxinas, e se tratando de culturas puras a produção de micotoxinas é bastante consistente, desde que usadas as condições ótimas para o crescimento da espécie em estudo. No entanto, a composição do meio de cultura afeta grandemente a produção de micotoxinas pelas estirpes. Portanto, as micotoxinas produzidas em cultura pura podem não ser as mesmas produzidas em substratos naturais.

O método de detecção e quantificação através de inoculação de fungos em meios de cultura, sejam sintéticos ou à base de alimentos, apresentam vantagens em relação ao simples preparo e apresentar alta pureza. Além disso, é possível detectar micotoxina em pequenas amostras.

Para a detecção e quantificação de OTA são, sobretudo, utilizadas técnicas cromatográficas como o TLC/ CCD (Thin Layer Chromatography – Cromatografia em Camada Delgada) e o HPLC/ CLAE (High Performance Liquid Chromatography – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). (BOZZA, 2010). O CCD ainda é uma técnica muito usada, principalmente para screening de fungos produtores de OTA, entretanto essa técnica vem sendo substituída, principalmente por CLAE em razão, essencialmente, da maior sensibilidade, precisão e reprodutibilidade, mas, também, em decorrência da possibilidade de automação (GILBERT; ANKLAN, 2002).

O ensaio imunológico constitui-se por uma técnica analítica alternativa promissora na análise de micotoxinas em alimentos, com ênfase ao ensaio imunoenzimático (*enzyme linked immunosorbent assay*) (ELISA). As vantagens consistem na alta sensibilidade das reações imunológicas, capazes de detectar concentrações traço de um composto, pouca ou nenhuma necessidade de

limpeza, facilidade de operação, além do potencial de utilização no campo (VALENTA, 1998).

Outra técnica recente para a detecção de OTA é espectroscopia por infravermelho próximo (NIRS), já é amplamente utilizada na indústria de alimentos, principalmente de grãos, para determinar a concentração de OTA nos produtos (SINGH et al., 2006).

Além disso, métodos moleculares para a identificação de fungos potencialmente produtores de OTA, também estão sendo utilizados, pois as técnicas clássicas para a identificação de fungos ocratoxigênicos em alimentos exigem o cultivo do microorganismo por 5 a 7 dias, não fornecem indicação da biomassa fúngica, são pouco sensíveis e detectam apenas a presença de células viáveis (SARTORI et al., 2006).

Os métodos moleculares são capazes de detectar genes PKS que codificam um policetídeo sintetase envolvido na biossíntese de OTA, embora toda biossíntese da ocratoxina A ainda não tenha sido desvendada (O'CALLAGHAN; CADDICK; DOBSON, 2003).

Ainda existem técnicas para o desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores para análises de *fingerprints* (RAPD ou AFLP), capazes de detectar sequências específicas e empíricas. As sequências alvo, ditas empíricas, são aquelas que não pertencem aos genes da biossíntese de micotoxinas, mas que sua presença está associada somente a linhagens ou espécies com capacidade de produzir a micotoxina (SARTORI et al., 2006).

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; VALEZ, H.; DOBSON, A. D. W. Analysis of the effect of nutritional factors on OTA and OTB biosynthesis and polyketide synthase gene expression in *Aspergillus ochraceus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 135, n. 1, p. 22–27, Sept. 2009.
- ABRUNHOSA, L. J. **Estratégia para o controle de ocratoxina A em alimentos**. 2008. 236 p.
- Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Universidade do Minho, Minho, 2008.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n. 7, de 18 de fevereiro de 2011**. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília: ANVISA, 2011. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 15 jan.2011.
- ALBORCH, L. et al. Mycobiota and mycotoxin contamination of maize flours and popcorn kernels for human consumption commercialized in Spain. **Food Microbiology**, London, v. 32, n. 1, p. 97-103, Oct. 2012.
- AMAIKEL, S.; KELLER, N. P. *Aspergillus flavus*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 49, n. 2, p. 107-133, 2011.
- ANLI, E.; ALKIS, I. M. Ochratoxin A and brewing technology: a review. **Journal of Institute Brewing**, London, v. 116, n. 1, p. 23-32, Jan. 2010.
- ANTIA, B. S. et al. Itaconic acid derivatives and diketopiperazine from the marine-derived fungus *Aspergillus aculeatus* CRI322-03. **Phytochemistry**, New York, v. 72, n.8, p. 816–820, June 2011.
- BARBESGAARD, P.; HELDT-HANSEN, H. P.; DIDERICHSEN, B. On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 36, n. 5, p. 569-572, Feb. 1992.
- BATISTA, L. R. et al. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea Arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 9, p. 784–790, Sept. 2009.

- BAYMAN, P.; BAKER, J. L. Ochratoxins: a global perspective. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 162, n. 3, p. 215-223, Sept. 2006.
- BAZIN, I., NABAIS, E.; LOPEZ-FERBER, M. Rapid visual tests: fast and reliable detection of ochratoxin A. **Toxins**, New York, v. 2, n. 9, p. 2230-2241, Sept. 2010.
- BELTRÁNA, E. et al. UHPLC–MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxin A in baby food and milk. **Food Chemistry**, London, v. 126, n. 2, p. 737-744, May 2011.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 16, n. 3, p. 497–516, 2003.
- BOUAZIZ, C. et al. Molecular events involved in ochratoxin A induced mitochondrial pathway of apoptosis, modulation by Bcl-2 family members. **Environmental Toxicology**, New York, v. 26, n. 6, p. 579–590, Nov. 2011.
- BOUDRA, H.; BARS, P.; BARS, J. Thermostability of ochratoxin a in wheat under two moisture conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 3, p. 1156–1158, Mar. 1995.
- BOZZA, A. **Deteção e quantificação de ocratoxina A produzida por espécies de aspergillus isoladas de grãos de café**. 2010. 144 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- BRUNS, S. et al. Functional genomic profiling of *Aspergillus fumigatus* biofilm reveals enhanced production of the mycotoxin gliotoxin. **Proteomics**, Weinheim, v. 10, n. 17, p. 3097–3107, Sept. 2010.
- BURGER, H.-M. The mycotoxin distribution in maize milling fractions under experimental conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 165, n. 1, p. 57–64, July 2013.
- CABAÑES, F. J. et al. What is the source of ochratoxin A in wine? **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.79, p. 213–215, Dec. 2002.
- CAMPBELL, G. D. Mycotoxicosis: humankind's greatest affliction? **Nutrition and Health**, Berkhamsted, v. 10, n. 4, p. 323–329, 1996.

CARDOSO FILHO, F. C. **Monitoramento de fungos toxigênicos e aflatoxinas em rações utilizadas na piscicultura em Teresina, Piauí, Brasil.** 2012. 47 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2012.

CHOI, Y. E. et al. Gene Encoding a putative GTPase-activating protein, regulates bikaverin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. **Mycologia**, Lancaster, v.100, n. 5, p.701-709, Sept./Oct. 2008.

COVARELLIA, L. et al. A review on the occurrence and control of ochratoxigenic fungal species and ochratoxin A in dehydrated grapes, non-fortified dessert wines and dried vine fruit in the Mediterranean area. **Food Control**, Guildford, v. 26, n. 2, p. 347–356, Aug. 2012.

CRESPO-SEMPERE, A. et al. VeA e LaeA transcriptional factors regulate ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 166, n. 3, p. 479-486, Sept. 2013.

DORNER, J. W.; COLE, R. J.; DIENER, U. L. The relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 87, n. 2, p. 13-15, Aug.1984.

DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 2, p. 187-198, Apr. 2010.

EZEKIEL, C. N. et al. Incidence and consumer awareness of toxigenic *Aspergillus* section Flavi and aflatoxin B1 in peanut cake from Nigeria. **Food Control**, Guildford, v. 30, n. 2, p. 596-601, Abr. 2013.

FANELLI, C. et al. **Aflatoxins and ochratoxins in cereal grains: an open challenge: volume 1.** New York: CABI Head, 2004.

FERREIRA, G. F. Fungi associated with coffee beans (*Coffea arabica* L.) benefited in the southwest of Bahia, Brazil. **Summa Phytopathology**, Botucatu, v. 37, n. 3, p. 98-102, Sept. 2011.

FERROCHIO, L. et al. Evaluation of ability of ferulic acid to control growth and fumonisin production of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on maize based media. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 167, n. 2, p. 215–220, Oct. 2013.

FRENICH, A. G. et al. Multi-mycotoxin analysis in eggs using a QuEChERS-based extraction procedure and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 1218, n. 28, p. 4349–4356, July 2011.

GARCÍA-CELA, E. et al. Ecophysiological characterization of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger* isolated from grapes in Spanish vineyards. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 173, p. 89-98, Mar. 2014.

GILBERT, J.; ANKLAN, E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 21, n. 6-7, p. 468- 486, June 2002.

GNIADEK, A. Cytotoxicity of *Aspergillus* fungi as a potential infectious threat. In: ROY, P. K.; RIJEKA, C. (Ed.). **Insight and control of infectious disease in global scenario**. London: Priti Kumar Roy, 2012. p. 231–248.

GOTO, T.; WICKLOW. D. T.; ITO, Y. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing *Aspergillus tamarii* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, Amsterdam, v. 62, n. 11, p. 4036-4038, Nov. 1996.

GRESSLER, M. et al. Multifactorial induction of an orphan PKS-NRPS gene cluster in *Aspergillus terreus*. **Chemistry & Biology**, Cambridge, v. 18, n. 2, p.198–209, Feb. 2011.

HARRIS, J. P.; MANTLE, P. G. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. **Phytochemistry**, New York, v. 58, n. 5, p. 709–716, July 2001.

HEPERKAN, D. et al. Toxigenic fungi and mycotoxin associated with figs in the Mediterranean area. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 51, n. 1, p. 119-130, 2012.

HORNOK, L. **Major trends in mycotoxin research**. Hungary: OECD, 2011. Disponível em: <<http://www.oecd.org/agriculture/crp/42583083.pdf>>. Acesso em: 03 jan. 2014.

HOSSEINI, S. S.; BAGHERI, R. Studies on contamination level of ochratoxin a in dried fruits and nuts. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 963, n. 1, p. 259-264, 2012.

HSUW, Y.; CHAN, W.; YU, J. Ochratoxin A inhibits mouse embryonic development by activating a mitochondrion-dependent apoptotic signaling pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, n. 1, p. 935-953, Jan. 2013.

HUE, N. T. et al. Detection of toxic *Aspergillus* species in food by a multiplex PCR. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOMEDICAL ENGINEERING IN VIETNAM, 4., 2013, v.40, 2013, Pernang. **Proceedings...** Pernang: IFMBE, 2013. p. 184-189.

JIMÍNEZ, M. et al. *Penicillium* in pre-harvest corn from Valencia (Spain). I. influence of different factors on the contamination. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 92, n. 1, p. 53-57, Oct. 1985.

JORGENSEN, K. Occurrence of ochratoxin A in commodities and processed food: a review of EU occurrence data. **Food Additives & Contaminants**, London, v. 22, suppl. 1, p. 26-30, 2005.

KAUSHIK, A. et al. Recent advances in detection of ochratoxin-A. **Open Journal of Applied Biosensor**, Flórida, n. 2, p. 1-11, Feb. 2013.

KHALESİ, M.; KHATİB, N. The effects of different ecophysiological factors on ochratoxin A production. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 113-121, June 2011.

KOBAYASTI, L.; PIRES, A. P. Levantamento de fungos em sementes de trigo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 4, p. 572-578, 2011.

KOHUT, G. et al. N-starvation stress induced FUM gene expression and fumonisin production is mediated via the HOG-type MAPK pathway in *Fusarium proliferatum*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 130, n. 1, p. 65-69, Mar. 2009.

KUHN, D. M.; GHANNOUM, M. A. Toxigenic fungi, and stachybotrys chartarum: infectious disease perspective. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 1, p. 144-172, Jan. 2003.

KUMAR, S. et al. Genomic characterization of drought tolerance-related traits in spring wheat. **Euphytica**, Wageningen, v. 186, n. 1, p. 265-276, July 2012.

LASRAM, S. et al. Water activity and temperature effects on fungal growth and ochratoxin a production by ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* isolated from Tunisian grapes. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 75, n. 2, p. 56-89, Mar. 2010.

LAWLOR, P. G.; LYNCH, P. B. Mycotoxins in pig feeds 2: clinical aspect. **Irish Veterinary Journal**, Dublin, v. 54, n. 4, p. 170-175, Mar. 2001.

LEVI, C. P.; TRENK, H. L.; MOHR, H. K. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 57, n. 4, p. 866–870, July 1974.

LIU, Y. L. et al. Effect of three mycotoxin adsorbents on growth performance, nutrient retention and meat quality in broilers fed on mould-contaminated feed. **British Poultry Science**, London, v. 52, n. 2, p. 255-263, Apr. 2011.

MAGAN, N. et al. Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 7, p. 723–730, Sept. 2003.

MAGNOLI, C. E.; ASTORECA, A. L.; CHIACCHIERA, S. M. Occurrence of ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. **Mycopathology**, Den Haag, v. 163, n. 5, p. 249-260, May 2007.

MARIN, F. Z. La ocratoxina A: um problema emergente. **Enólogos**, Madrid, v. 34, p. 21-24, 2005.

MARTINS, H. M.; MARTINS, M. L. Qualidade micológica de rações para bovino. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 96, n. 538, p. 85-88, 2001.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 12, n. 1, p. 89-99, 2010.

MERHOFF, G. C.; PORTER, J. M. Ergot Intoxication: historical review and description of unusual clinical manifestations. **Annals of Surgery**, Philadelphia, v. 180, n. 15, p. 773–779, Nov. 1974.

MOLIN, R. **Simpósio sobre micotoxinas em grãos**. Rio de Janeiro: Fundação Cargill, 1999.

MUTURE, B. N.; OGANNA, G. Aflatoxin levels in maize and maize products during the 2004 food poisoning outbreak in Eastern Province of Kenya. **East African Medical Journal**, Kenya, v. 82, n. 6, p. 275-279, June 2005.

NIELSEN, K. F. Chemical identification of fungi - metabolite profiling and metabolomics. In: ARORA, D. K. (Ed.). **Fungal biotechnology in agricultural, food and environmental applications**. New York: Marcel Dekker, 2003. p. 19-35.

O'CALLAGHAN, J.; CADDICK, M. X.; DOBSON, A. D. W. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. **Microbiology**, Reading, v. 149, n. 12, p. 3485-3491, Dec. 2003.

OBANOS, A. P. de; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; CERAIN, A. L. de. Influence of roasting and brew preparation on the ochratoxin A content in coffee infusion. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 22, n. 5, p. 463-471, May 2005.

OLIVEIRA, G. **Efeitos de diferentes pontos de torração e tipos de granulometria na concentração de ocratoxina "A" em grão de café**. 2012. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

OLSEN, M. et al. *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts? **World Mycotoxin Journal**, Netherlands, v. 1, n. 2, p. 123-126, May 2008.

OUETHRANIA, M. et al. Metabolic fate of ochratoxin A as a coffee contaminant in a dynamic simulator of the human colon. **Food Chemistry**, London, v.141, n. 4, p. 3291-3300, Dec. 2013.

PARDO, E. et al. Impact of relative humidity and temperature on visible fungal growth and OTA production of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* isolates on grapes. **Food Microbiology**, London, v. 22, n. 6, p. 383-389, Oct. 2005.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. How will climate change affect mycotoxins in food? **Food Research International**, v. 43, n. 7, p. 1902-1914, Ago. 2010.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. How will climate change affect mycotoxins in food? **Food Research International**, Barking, v. 43, n. 7, p. 1902-1914, Aug. 2010.

PENA, G. A. et al. *Aspergillus fumigatus* toxicity and gliotoxin levels in feedstuff for domestic animals and pets in Argentina. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 50, n. 1, p. 77–81, Jan. 2010.

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

PERRONE, G. et al. Population structure and aflatoxin production by *Aspergillus* section *flavi* from maize in Nigeria and Ghana. **Food Microbiology**, London, v. 41, n. 1, p. 52-59, 2014.

PINTO, V. F.; PATRIARCA, A.; POSE, G. Mycotoxins associated to fusarium species that caused fusarium head blight in wheat in Latin-America. In: ALCONADA, T. M.; CHUIZE, S. N. (Ed.). **Fusarium head blight in Latin America**: volume 1. Amsterdam: Springer, 2013. p. 59-73.

PITT, J. I. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. **Applied and Environmental Microbiology**, Amsterdam, v. 53, n. 2, p. 266-269, Feb. 1987.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important? **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 17-22, Apr. 2000.

PITT, J. L.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2. ed. London: Blackie Academic, 1997.

PUEL, O.; GALTIER, P.; OSWALD, I. P. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. **Toxins**, New York, v. 2, n. 4, p. 613-631, Apr. 2010.

RAIOLA, A. et al. Study of thermal resistance and in vitro bioaccessibility of patulin from artificially contaminated apple products. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, n. 9, p. 3068–3072, Sept. 2012.

REVERBERI, M. et al. Lipoperoxidation affects ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus* and its interaction with wheat seeds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 85, n. 6, p. 1935–1946, Feb. 2010.

REVERBERI, M. et al. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 87, n. 3, p. 899–911, July 2010.

REZENDE, E. F. et al. Ochratoxigenic fungi associated with green coffee beans (*Coffea arabica* L.) in conventional and organic cultivation in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 377-384, Oct. 2013.

ROMANI, S. et al. Screening and occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 8, p. 3616–3619, Aug. 2000.

SAGARAM, U. S.; KOLOMIETS, M. V.; SHIM, W. B. Regulation of fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*: maize system. **The Plant Pathology Journal**, Washington, v. 22, n. 3, p. 203-210, 2006.

SANTOS, C. C. M.; LOPES, M. R.V.; KOSSEKI, S. Y. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José do Rio Preto/SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 153-157, 2001.

SARTORI, D. et al. PCR methods for the detection of ochratoxin producing fungal species in coffee beans. **Research in Microbiology**, Paris, v. 157, n. 4, p. 350-354, Sept. 2006.

SCUDAMORE, K. A.; BANKS, J. N.; GUY, R. C. E. Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grain during extrusion. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 21, n. 5, p. 488–497, May 2004.

SCUDAMORE, K. A.; BANKS, J.; MACDONALD, S. J. Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grains during milling and bread production. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 20, n. 12, p. 1153–1163, Dec. 2003.

SCUDAMORE, K. A.; PATEL, S. Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 17, n. 5, p. 407–416, May 2000.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998.

SIGNORINIA, M. L. et al. Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, n. 2, p. 250-257, Feb. 2012.

SINGH, C. B. et al. Near-infrared spectroscopy: applications in the grain industry. **The Canadian Society for Bioengineering**, Michigan, n. 6, p. 1-10, 2006.

SMITH, J. E. et al. Role of mycotoxins in human and animal nutrition and health. **Natural Toxins**, New York, v. 3, n. 4, p. 92-187, May 2006.

SNINI, S. P. et al. The gene PatG involved in the biosynthesis pathway of patulin, a food-borne mycotoxin, encodes a 6-methylsalicylic acid decarboxylase. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 171, p. 77-83, Feb. 2014.

SOARES, C.; CALADO, T.; VENÂNCIO, A. Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate strains isolated from harvested maize in three Portuguese regions. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Barcelona, v. 30, n. 1, p. 9-13, Jan. 2013.

STEVENS, A. J. et al. Investigations into "diseases" of turkey poult. **Veterinary Record**, London, v. 72 n. 31, p. 627-628, 1960.

TAMANO, K. et al. Increased production of fatty acids and triglycerides in *Aspergillus oryzae* by enhancing expressions of fatty acid synthesis-related genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, n. 1, p. 269–281, Jan. 2013.

TANIWAKI, M. H. et al. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 173–179, Apr. 2003.

TEIXEIRA, M. F. S. et al. Amazonian biodiversity: pigments from *Aspergillus* and *Penicillium*-characterizations, antibacterial activities and their toxicities. **Current Trends in Biotechnology & Pharmacy**, Washington, v. 6, n. 3, p. 300-311, July 2012.

TEIXEIRA, M. L. et al. Ochratoxin-a determination by hplc with fluorescence detection (hplc-fl): a new standardization method for wheat samples. **Revista Chilena de Nutrição**, Santiago, v. 37, n. 2, p. 184-191, June 2010.

TERRA, M. F. et al. Detection of ochratoxin A in tropical wine and grape juice from Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 93, n. 4, p. 890–894, Mar. 2013.

TÓTH, B. et al. Common resistance of wheat to members of the *Fusarium graminearum* species complex and *F. culmorum*. **Plant Breeding**, Berlin, v. 27, n. 1, p. 1-8, Feb. 2008.

TROMBETE, F. M. et al. Trichothecenes and aflatoxins contamination in wheat and wheat products: occurrence and methods of determination. **Revista Chilena de Nutrición**, Santiago, v. 40, n. 2, p. 181-188, June 2013.

URBANO, G.R. et al. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 64, n. 8, p. 1226–1230, Aug. 2001.

VALENTA, H. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 815, n. 1, p. 75-92, July 1998.

VAN DER MERWE, K. J. et al. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, London, v. 205, p. 1112-1113, Mar. 1965.

VELMOUROUGANE, K.; BHAT, R.; GOPINANDHAN, T. N. Coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*): a vector for toxigenic molds and ochratoxin A contamination in coffee beans. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 7, n. 10, p. 1279-1284, Oct. 2010.

VERSILOVSKIS, A.; SAEGER, S. Sterigmatocystin: occurrence in foodstuffs and analytical methods: an over view. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 54, n. 1, p. 136–147, Jan. 2010.

WINDELS, C. E. Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: changing farms and rural communities in the northern great plains. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 1, p. 17-21, Jan. 2000.

WU, F. Mycotoxin reduction in Bt corn: potential economic, health, and regulatory impacts. **Transgenic Research**, London, v. 15, n. 3, p. 277–289, June 2006.

YANG, J. et al. Natural occurrence, analysis, and prevention of mycotoxins in fruits and their processed products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 54, n. 1, p. 64-83, 2014.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 129-144, Apr. 2011.

CAPÍTULO 2 Crescimento de *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* e produção de ocratoxina a em diferentes meios de cultura

RESUMO

A ocratoxina A (OTA) tem sido frequentemente encontrada como contaminante de alimentos, como café e cereais, sendo considerada uma das micotoxinas mais prejudiciais para a saúde humana. Nesse contexto, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o crescimento micelial e produção de ocratoxina A de três isolados de *A. carbonarius* e três isolados de *A. ochraceus* em quatro meios de cultura e em diferentes condições de temperatura e tempo de incubação. Os seis isolados foram inoculados em meio de cultura à base de grãos de café beneficiados, trigo e fubá e no meio sintético YES e incubados a 15 °C e 25 °C. As medições dos diâmetros das colônias foram feitas a cada 48 horas para descrição da taxa de crescimento. O screening inicial de produção de OTA foi feito pela Cromatografia de Camada Delgada (CCD). A quantificação de OTA foi feita pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), durante três dias diferentes (5° 15° e 25° dia). As medidas de pH foram feitas com fitas de papel quantitativo. *A. carbonarius* abaixou drasticamente os valores de pH dos meios testados, chegando ao valor ácido de 2. Todos isolados apresentaram maior taxa de crescimento no meio YES a 25 °C, entretanto houve crescimento em todos os meios de cultura nas duas temperaturas testadas. O meio de cultura que levou a uma menor taxa de crescimento foi o meio à base de fubá. O meio que mais induziu a produção de OTA foi YES. Em meios de cultura à base de alimentos, os isolados de *A. ochraceus* produziram baixas quantidades de OTA, chegando ao máximo de 0,39µg/g. Entretanto, os isolados de *A. carbonarius*, produziram quantidades bem maiores, destacando-se os isolados CDCA0126 que produziram 29,83µg/g a 15° em YES, 13,06 em meio à base de trigo a 15 °C e o isolado CDCA0169 produziu 8,3µg/g em meio de café a 15 °C. E o isolado CDCA0126 produziu 5,07 µg/g em meio de café a 25 °C. Portanto, foi possível conhecer dentre as condições testadas, quais aquelas mais e menos favoráveis para a produção de OTA.

Palavras-chave: Micotoxina. Fungos. Alimentos.

ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA) has often been found as a contaminant of food, such as coffee and cereals and is considered one of the most harmful mycotoxins to human health. In this context, this study was conducted to evaluate the mycelial growth and production of ochratoxin A from three isolates of *A.carbonarius* and three isolates of *A.ochraceus* in four culture media and under different temperature and incubation time conditions. The six strains were inoculated in culture based on processed coffee beans, wheat and corn meal, and a synthetic medium, YES, and incubated at 15 and 25 °C. The measurements of the diameters of the colonies were made every 48 hours for the growth rate description. The initial screening of OTA production was done through Layer Chromatography (TLC). OTA quantification was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) at three different days (5th, 15th and 25th day). The pH measurements were performed by quantitative test strip paper. *A. carbonarius* dramatically lowered the pH of the media tested, reaching the acid value of 2. All isolates showed a higher growth rate in YES medium at 25 °C, however, there was growth in all culture media at both temperatures. The culture medium that led to the lowest growth rate was the cornmeal based medium. The medium that most induced the OTA production was YES. In food based culture media the *A. ochraceus* isolates produced low amounts of OTA, reaching a maximum of 0.39 mg/g. However, *A. carbonarius* isolates produced much higher amounts, highlighting the CDCA0126 isolates that produced 29.83 mg/g at 15° in YES, 13.06 in the wheat based at 15° C and isolate CDCA0169, that produced 8,3µg/g in the coffee medium at 15 °C. The CDCA0126 isolate produced 5.07 mg/g in the coffee medium at 25 °C. Therefore, it was possible to know which, among the tested conditions, were more and less favorable for OTA production.

Keywords: Mycotoxin. Fungi. Food.

1 INTRODUÇÃO

A incidência de fungos filamentos toxigênicos em alimentos está diretamente relacionada a intoxicações agudas graves, mas, na maioria das vezes, com efeitos crônicos, o que exige uma atenção maior com a qualidade de alimentos e bebidas, principalmente aquelas com alto potencial de contaminação como, por exemplo, cereais e café.

As micotoxinas são, em grande maioria, citotóxicas, resultando na ruptura de membranas celulares e outras estruturas, ou interferindo em processos vitais como síntese proteica, de RNA ou DNA. São muito estáveis ao calor, entretanto sensíveis aos raios UV.

Ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina sintetizada, principalmente, por espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Além de sua marcada nefrotoxicidade, a ocratoxina A demonstra propriedades hepatotóxicas, teratogênicas, carcinogênicas e imunossupressoras.

Em grãos de café, a contaminação ocorre, principalmente, na fase de colheita e secagem dos grãos, onde o contato prolongado com o solo favorece a contaminação fúngica e a produção de OTA. Entretanto, outros fatores podem influenciar a síntese de OTA como, por exemplo, fatores intrínsecos como, a atividade de água. Milho e trigo são grãos comumente contaminados durante o armazenamento, quando as condições são de alta umidade.

O uso de boas técnicas agrícolas de cultivo e manejo no campo que possam minimizar o crescimento fúngico nos alimentos é um fator importante na fase de pré-colheita, assim como o armazenamento correto com temperatura, umidade e outros parâmetros que possam ser controlados para inviabilizar a contaminação na pós-colheita.

No Brasil, há necessidade de mais estudos sobre as condições específicas do desenvolvimento de fungos toxigênicos capazes de produzir

OTA, levando em consideração a gama de substratos passíveis de contaminação e a grande diversidade climática das áreas agrícolas. Desse modo, no presente estudo, objetivou-se avaliar as condições necessárias para a síntese de OTA por *Aspergillus carbonarius* e *Aspegillus ochraceus* e também sua concentração em diferentes meios de cultura à base de alimentos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de estudo

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Micotoxina e Micologia de Alimentos- DCA, situado no Campus da Universidade Federal de Lavras – UFPA, Lavras, MG.

2.2 Obtenção de microrganismos

Seis isolados fúngicos foram utilizados no estudo (Tabela 1), cedidos pela Coleção de Cultura do Departamento de Ciências dos Alimentos (CCDCA), os quais se encontravam armazenados pelo método de congelamento em freezer -80 °C. Os fungos foram isolados recentes de uva e café. As descrições do isolados encontram-se a seguir:

Tabela 1 Relação de microrganismos utilizados para avaliação da produção de ocratoxina A

| Código | Origem | Espécie |
|---------------|---------------|--------------------------------|
| CDCA0169 | Uva | <i>Aspergillus carbonarius</i> |
| CDCA0170 | Uva | <i>Aspergillus carbonarius</i> |
| CDCA0126 | Uva | <i>Aspergillus carbonarius</i> |
| CDCA0151 | Café | <i>Aspergillus ochraceus</i> |
| CDCA0153 | Café | <i>Aspergillus ochraceus</i> |
| CDCA0162 | Café | <i>Aspergillus ochraceus</i> |

2.3 Screening do potencial ocratoxigênico dos isolados

Todos os isolados foram testados quanto ao potencial de produção de OTA, pelo método Plug Agar, conforme descrito por Filtenborg e Frisvad (1980). Os isolados foram inoculados no meio de cultura Czapek Yeast Agar (CYA), sendo incubados por 7 dias a 25 °C e, então, levados para análise cromatográfica. Foram utilizados: Ocratoxina A padrão (Sigma- Aldrich), placas de cromatografia em camada fina (sílica-gel Merck 60, 20 x 20) como fase móvel, TEF-Tolueno Acetato de Etila e Ácido Fórmico 90% (50:40:10). Depois do processo de preparação, as placas foram secas por fluxo de ar. Foram analisadas as amostras em placas, além do padrão e do controle. Sendo que o padrão sempre será localizado no ponto central, o controle imediatamente do lado esquerdo do padrão e os demais tratamentos distribuídos nos pontos restantes. A produção de micotoxinas foi confirmada em luz ultravioleta com λ 366nm, em cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Foram considerados como produtores de OTA, os isolados que apresentarem um RF (fator de retenção) e um ponto (spot) de fluorescência semelhante ao do padrão da Ocratoxina A. Todos os isolados de cada espécie foram quantificados quanto à produção de OTA.

2.4 Meio de cultura padrão

YES meio de ágar com extrato de levedura com sacarose: 20 g de extrato de levedura, 150 g de sacarose, 20 g de ágar 1 l de água destilada (Bragulat et al.,1998)

2.5 Meios de cultura à base de alimentos

Os meios de cultura CMEA, WMEA e CMA foram confeccionados seguindo metodologia de Pardo et al. (2005), Muñoz et al. (2011) e Ramos et al. (1998), respectivamente, com algumas modificações.

CMEA (Ágar Extrato de farinha de café): 175 g de café verde moído, 20 g de ágar, 1 l de água destilada.

WMEA (Ágar extrato de farinha de trigo): 175 g de farinha de trigo integral, 20 g de ágar, 1 l de água destilada.

CMA (Ágar farinha de milho): 30 g de farelo de milho, 20 g de ágar, 1 L de água destilada.

Os três meios de cultura à base de alimentos foram preparados da seguinte forma: os alimentos foram colocados em um pano limpo em forma de saco, mergulhado em 1 litro de água fervente e cozidos em fogo brando por 60 minutos, sempre completando o volume da água quando necessário. Em seguida, o pano foi torcido, e o líquido filtrado em gaze hidrofílica, por fim completou-se o volume para um litro de água e adicionou-se o ágar. Esterilizaram-se os meios de cultura a 121 °C, 15 minutos em autoclave.

2.6 Medição da atividade de água

Após esterilização, os meios de cultura foram medidos quanto a sua atividade de água no primeiro dia antes da inoculação e após 24 dias de inoculação, em aparelho específico Aqualab, modelo -2T (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, EUA).

2.7 Preparação e inoculação de esporos para avaliação do crescimento fúngico e para quantificação de OTA

Para a análise da taxa de crescimento e quantificação de OTA, cada isolado foi inoculado em placa de petri médias, contendo extrato de malte ágar (MEA) e incubados a 25 °C, por sete dias. Após crescimento dos fungos, foram adicionados 40 ml de água destilada a 0,1% de tween 80, e com auxílio de alça de Drigalsky fez-se a raspagem dos esporos. Essas suspensões foram filtradas em gaze e contados os esporos para a obtenção da concentração de 10^7 UFC/ml, utilizando Câmara de Neubauer..

Para a avaliação da taxa de crescimento, uma alíquota de 10 µl da suspensão de esporos, foi inoculada em um único ponto central em cada um dos quatro meios de cultura, e levadas para incubação a 15 °C e 25 °C em B.O.D. Os diâmetros de colônias foram medidos a cada 48 horas, durante 25 dias. As medidas foram feitas em duas direções em ângulos retos entre si. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Para preparo das amostras a serem quantificadas, em relação à produção de OTA, também foi adicionado ao centro de cada placa 10 µl da suspensão de esporos, entretanto, no 5°, 15° e 25° dias, 3 tampões (plugs) de ágar (diâmetro 1 cm) foram retirados da extremidade, ao centro, e a meio caminho entre a borda e a centro de cada colônia crescidas em cada meio de cultura e em duplicata. Esses, então, foram pesados e acondicionados em tubos de vidro com rosca, protegidos da luz e congeladas até o momento da extração de OTA.

2.8 Medição do pH

Os valores de pH foram medidos nos meios esterilizados, momentos antes das inoculações e também ao final dos 25 dias de incubação do fungos, por meio de fita de papel medidoras de pH (Neutralit e Acilit , Merck).

2.9 Análises de OTA

As análises de OTA por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas no Laboratório de Análises Físico-Químicas do Departamento de Química - Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.

2.10 Extração

A extração de OTA foi realizada segundo metodologia de Bragulat, Abarca e Cabanes (2001) com modificações, na qual indica a adição de 1 ml de metanol em cada tubo de vidro contendo os plugs ágar, em seguida, homogeneizados vigorosamente por 5 segundos e mantidos a 25 °C por 60 minutos. Após o tempo de extração, a amostra foi filtrada através de seringa de vidro de 20 ml de vidro acoplada a unidades filtrantes de PTFE (0.22 µm) (Millipore). O extrato foi armazenado no escuro em tubos cilíndricos de vidro com rosca e septo central, específico para a CLAE

2.11 Quantificações por CLAE

O equipamento utilizado foi um HPLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo SPD-M20A, degaseificador modelo DGU 20A₃, interface modelo CBM-20A injetor automático modelo SIL-10AF e detector de

fluorescência RF-10 A_{XL}. A coluna usada foi a Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5µm) conectada a uma pré-coluna Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 4-Pack (4,6 x 12,5mm, 5µm).

Foram seguidas as condições cromatográficas de comprimentos de onda: excitação de 332 nm e emissão de 476 nm. O fluxo utilizado em toda a análise foi de 0,8 mL min⁻¹ e o volume injetado das amostras e do padrão foi de 20 µL. A eluição foi realizada em sistema isocrático de 35 : 35 : 29 : 1 (Metanol: Acetonitrila: Água: Ácido Acético). O tempo de retenção médio obtido para OTA foi de 11 ± 0,1 min (Figura 1). A quantificação da OTA nas amostras foi realizada por meio da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear ($y = 1,11756 \times 10^7 x - 2592,1485$; onde, y = área do pico e x = concentração de OTA), correlacionando a área do pico versus à concentração da respectiva solução padrão, sendo que o coeficiente de determinação (r^2) obtido foi de 0,9999. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados por meio dos parâmetros obtidos para a curva analítica construída, sendo calculados pelas respectivas relações matemáticas: LD = 3DP/m e LQ = 10DP/m (onde, DP = estimativa do desvio padrão da linha de regressão e m = coeficiente angular da linha de calibração. Para estes, foram encontrados os valores de 0,0004 e 0,0016 µg/g, respectivamente. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, enquanto as soluções padrão de OTA foram injetadas em triplicata.

2.12 Análises estatísticas

As análises estatísticas para a determinação de OTA e valores de pH foram obtidas utilizando o programa computacional SISVAR desenvolvido por Ferreira (2000), considerando as parcelas subdivididas como cada isolado avaliado. Os dados da produção de OTA foram analisados, considerando-se o

tempo (5, 15 e 25 dias), meio de cultura (YES, café, trigo e milho) e a temperatura (15 °C e 25 °C). O mesmo para os valores de pH, apenas a fonte de variação tempo foi em duas épocas (1 e 24 dias). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott Knott (1974), a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS

3.1 Potencial ocratoxigênico dos isolados

Os seis isolados analisados neste trabalho mostraram-se potencialmente produtores de ocratoxina A (OTA) quando inoculados no meio de cultura Czapek Yeast Agar (CYA), e submetidos a Cromatografia de Camada Delgada (CCD). As bandas de coloração azulada correspondem à presença de OTA (Figura 2).

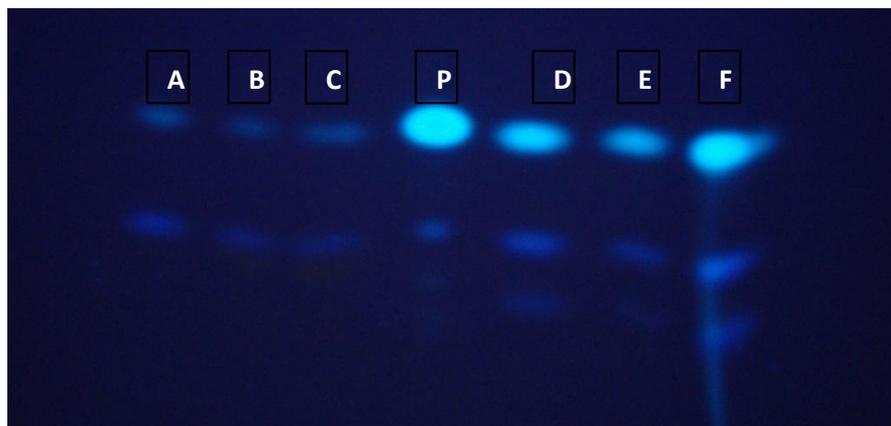


Figura 1 Placa de CCD, com seis isolados (A) CDCA0169, (B) CDCA0170, (C) CDCA01261 (*A.carbonarius*) e (D) CDCA0151, (E) CDCA0153, (F) CDCA0162 (*A.ochraceus*); (P) padrão de OTA, visualizada sob luz UV a 366 nm, após sete dias de incubação em CYA

3.2 Medição da atividade de água

A atividade de água foi medida em cada meio de cultura antes das inoculações, e todos os meios apresentaram $0,99_{aw}$.

3.3 Medição do pH

Os valores de pH foram medidos em dois tempos diferentes, a primeira medição foi realizada no primeiro dia de incubação e a segunda, após 24 dias de incubação dos isolados. Os resultados estão demonstrados nos gráficos a seguir:

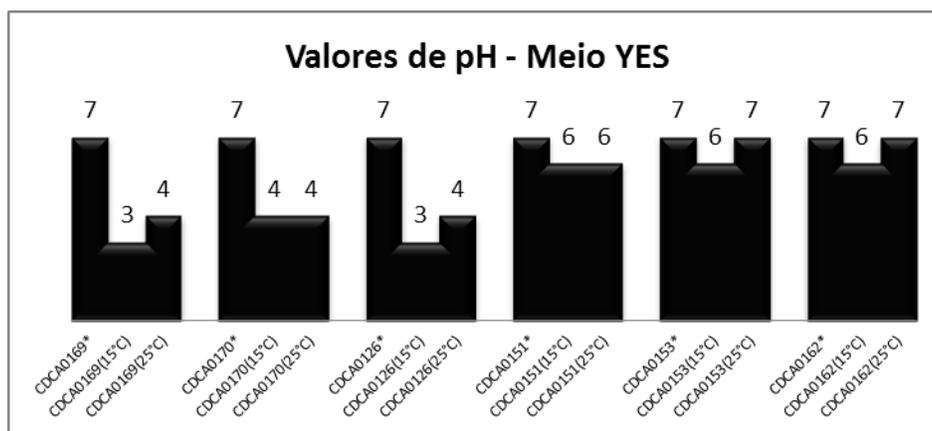


Gráfico 1 Valores de pH dos seis isolados: CDCA0169, CDCA0170, CDCA0126 (*A.carbonarius*) e CDCA0151, CDCA0153, CDCA0162 (*A.ochraceus*), cultivados em meio YES a 15 °C e 25 °C no 25º dia

Nota: *Valor de pH no primeiro dia de incubação

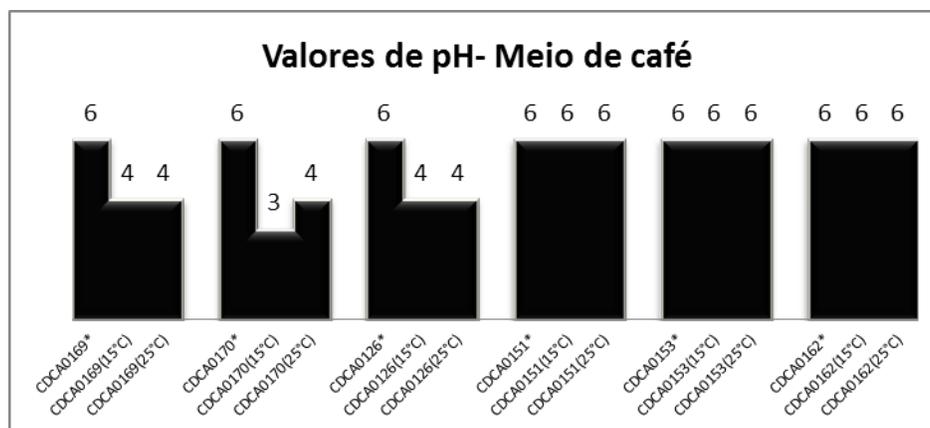


Gráfico 2 Valores de pH dos seis isolados: CDCA0169, CDCA0170, CDCA0126 (*A.carbonarius*) e CDCA0151, CDCA0153, CDCA0162 (*A.ochraceus*), cultivados em meio de café a 15 °C e 25 °C no 25º dia

Nota: *Valor de pH no primeiro dia de incubação.

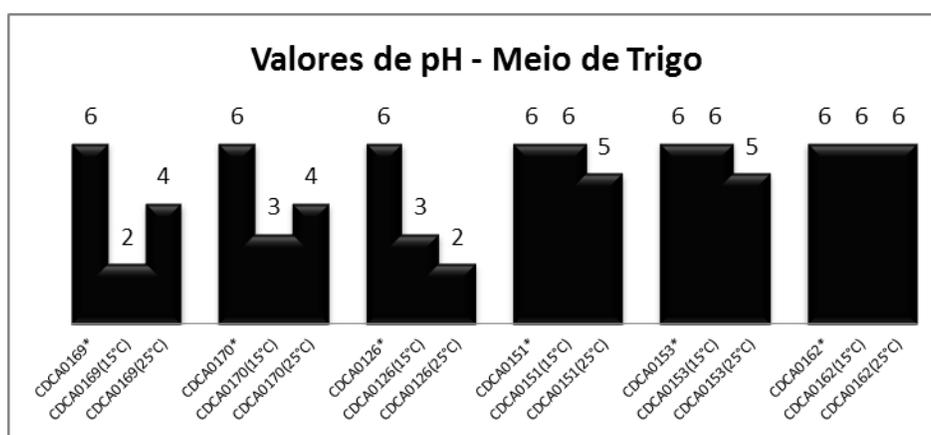


Gráfico 3 Valores de pH dos seis isolados: CDCA0169, CDCA0170, CDCA0126 (*A.carbonarius*) e CDCA0151, CDCA0153, CDCA0162 (*A.ochraceus*), cultivados em meio de trigo a 15 °C e 25 °C no 25º dia

Nota: *Valor de pH no primeiro dia de incubação.

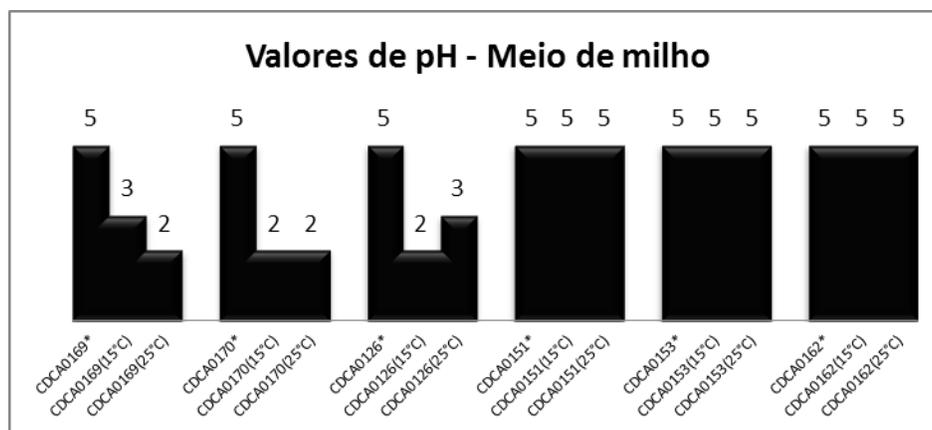


Gráfico 4 Valores de pH dos seis isolados: CDCA0169, CDCA0170, CDCA0126 (*A.carbonarius*) e CDCA0151, CDCA0153, CDCA0162 (*A.ochraceus*), cultivados em meio de milho a 15 °C e 25 °C no 25º dia

Nota: *Valor de pH no primeiro dia de incubação.

3.4 Curva de crescimento em diferentes condições de tempo, temperatura e substrato

Os seis isolados apresentaram diferentes taxas de crescimento nos diferentes tratamentos como exemplificado nos gráficos a seguir:

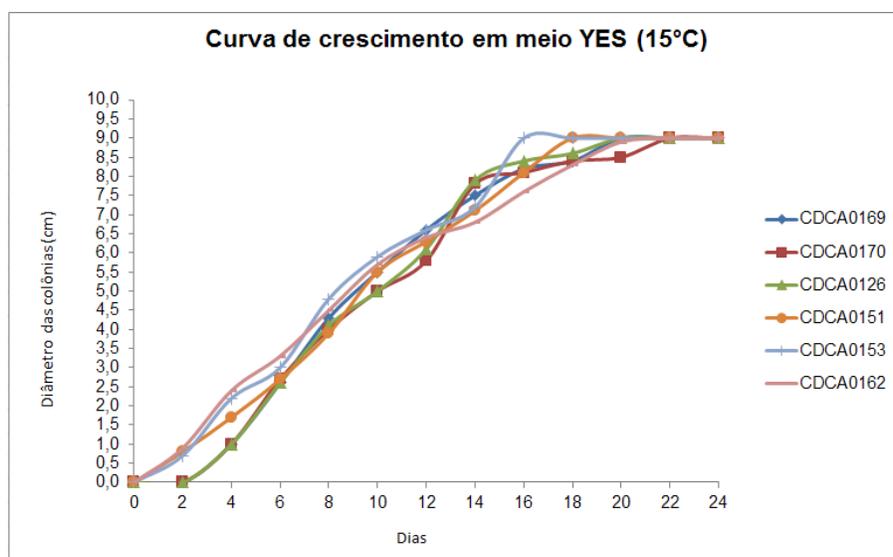


Gráfico 5 Curva de crescimento dos seis isolados: CDCA0169, CDCA0170, CDCA0126 (*A.carbonarius*) e CDCA0151, CDCA0153, CDCA0162 (*A.ochraceus*), cultivados em meio YES a 15 °C durante 24 dias

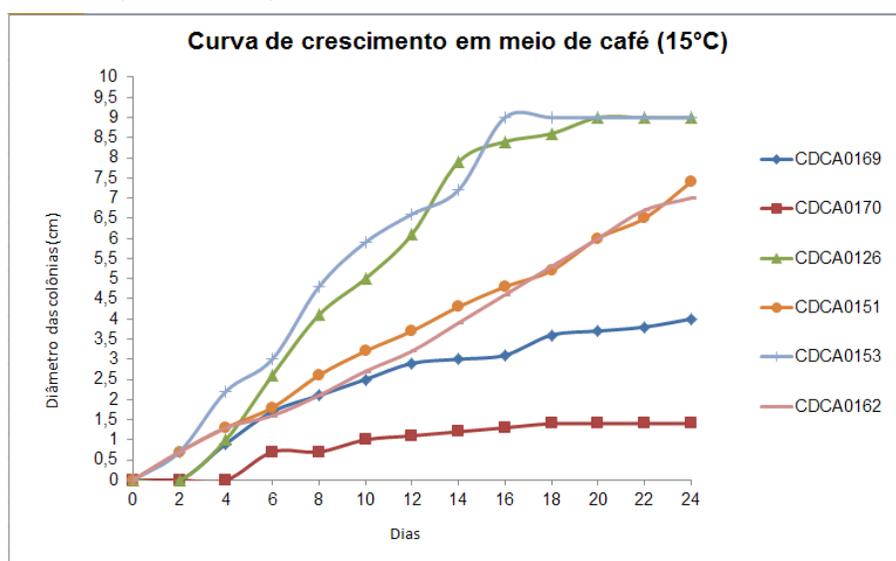


Gráfico 6 Curva de crescimento dos seis isolados: CDCA0169, CDCA0170, CDCA0126 (*A.carbonarius*) e CDCA0151, CDCA0153, CDCA0162 (*A.ochraceus*), cultivados em meio de café a 15 °C durante 24 dias

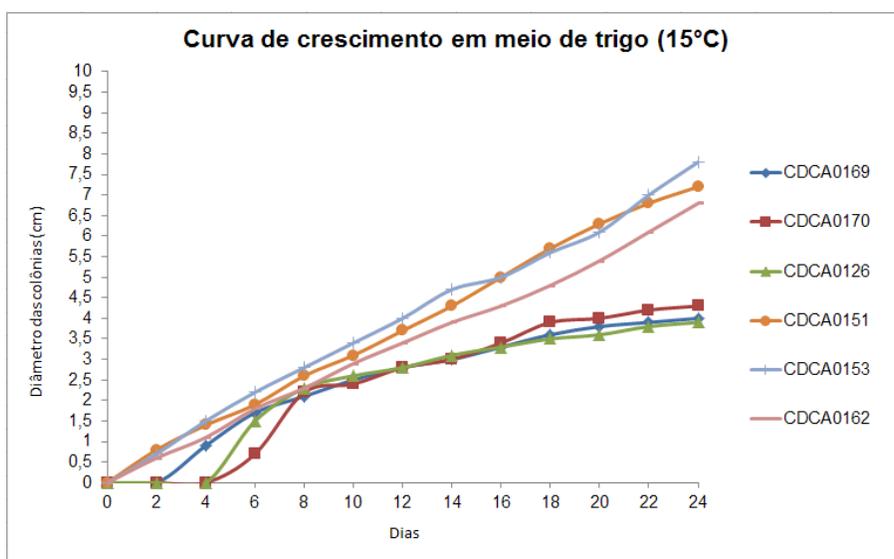


Gráfico 7 Curva de crescimento dos seis isolados: CDCA0169, CDCA0170, CDCA0126 (*A.carbonarius*) e CDCA0151, CDCA0153, CDCA0162 (*A.ochraceus*), cultivados em meio de trigo a 15 °C durante 24 dias

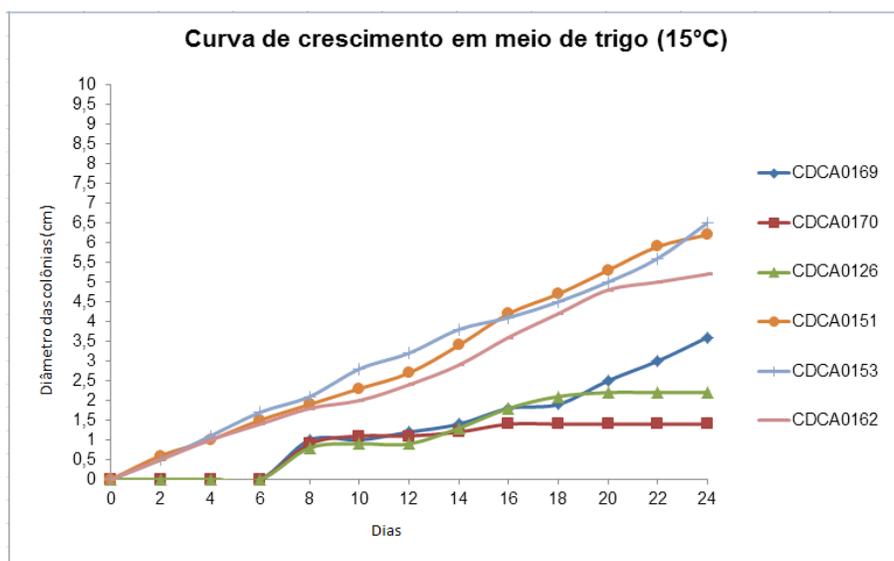


Gráfico 8 Curva de crescimento dos seis isolados: CDCA0169, CDCA0170, CDCA0126 (*A.carbonarius*) e CDCA0151, CDCA0153, CDCA0162 (*A.ochraceus*), cultivados em meio de milho a 15 °C durante 24 dias

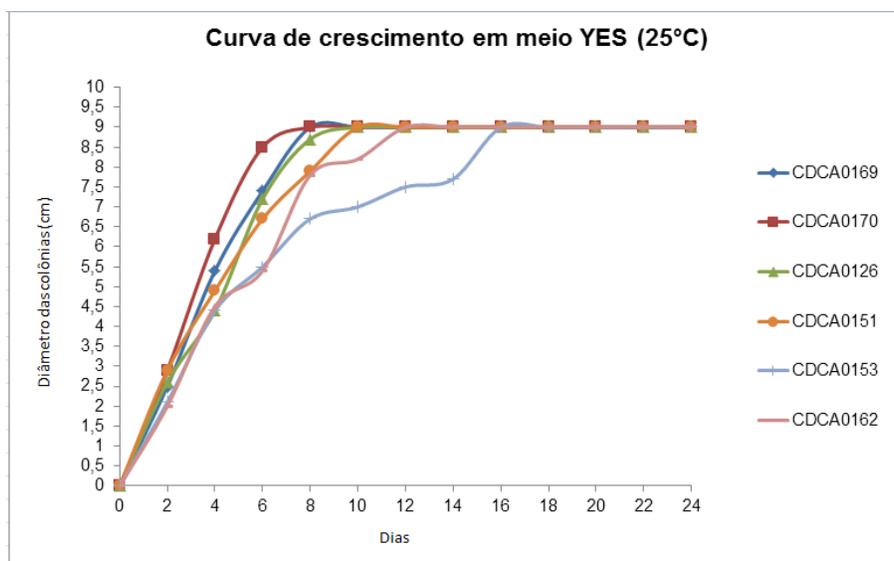


Gráfico 9 Curva de crescimento dos seis isolados: CDCA0169, CDCA0170, CDCA0126 (*A.carbonarius*) e CDCA0151, CDCA0153, CDCA0162 (*A.ochraceus*), cultivados em meio YES a 25 °C durante 24 dias

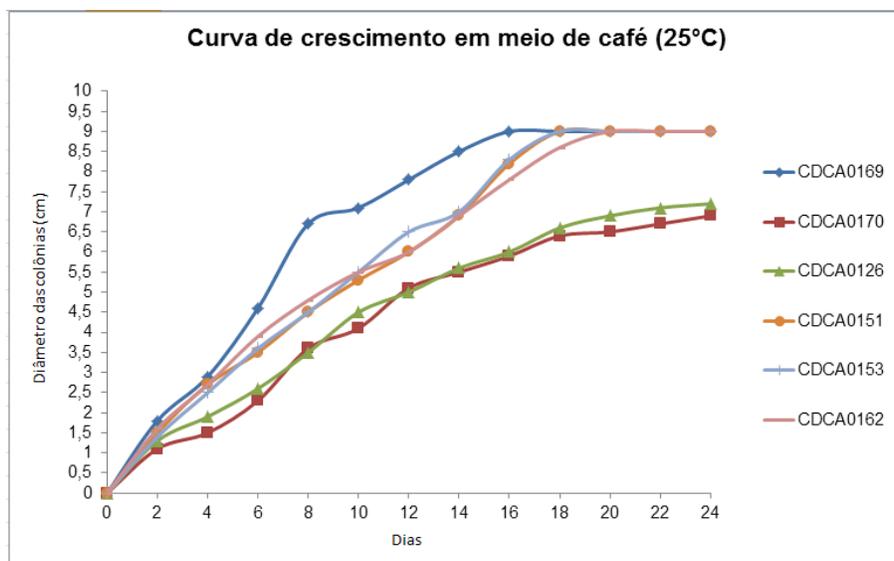


Gráfico 10 Curva de crescimento dos seis isolados: CDCA0169, CDCA0170, CDCA0126 (*A.carbonarius*) e CDCA0151, CDCA0153, CDCA0162 (*A.ochraceus*), cultivados em meio de café a 25 °C durante 24 dias

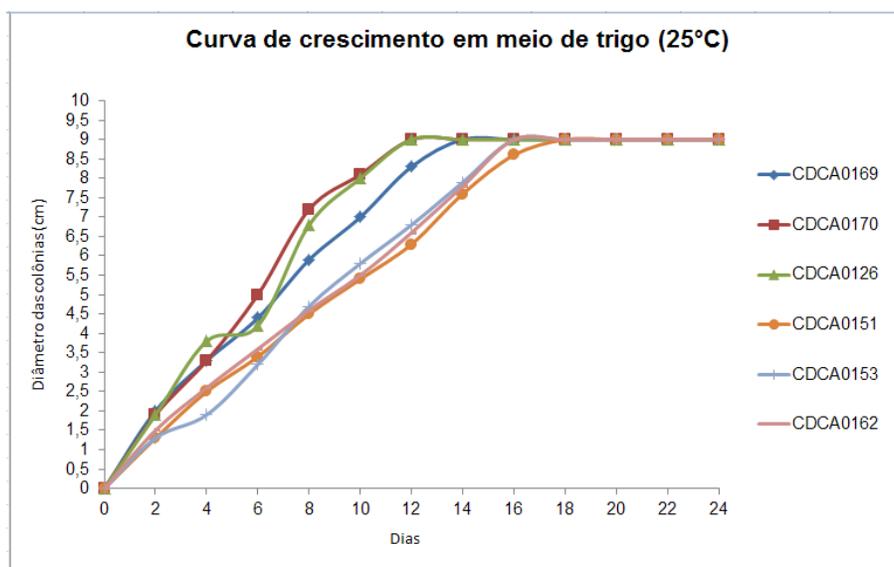


Gráfico 11 Curva de crescimento dos seis isolados: CDCA0169, CDCA0170, CDCA0126 (*A.carbonarius*) e CDCA0151, CDCA0153, CDCA0162 (*A.ochraceus*), cultivados em meio de trigo a 25 °C durante 24 dias

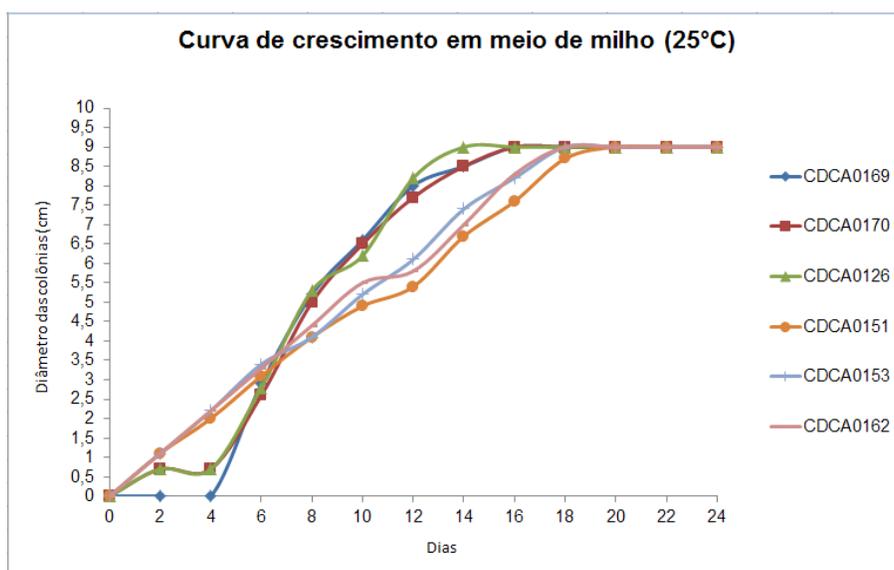


Gráfico 12 Curva de crescimento dos seis isolados: CDCA0169, CDCA0170, CDCA0126 (*A.carbonarius*) e CDCA0151, CDCA0153, CDCA0162 (*A.ochraceus*), cultivados em meio de milho a 25 °C durante 24 dias

No meio YES, a 15 °C, todos os isolados apresentaram crescimentos semelhantes, chegando ao máximo na placa por volta do 18º dia. O mesmo meio em temperatura de 25 °C também apresentou crescimento máximo para todos os isolados, mas esse índice foi alcançado por volta do 10º dia.

Para o meio de café, os crescimentos foram variados, na temperatura de 15 °C os isolados CDCA0169 e CDCA0153, *A.carbonarius* e *A.ochraceus* respectivamente, apresentaram as taxas mais elevadas de crescimentos para esse tratamento, com crescimento máximo no 17º dia. No entanto, o isolado CDCA0170 (*A.carbonarius*) apresentou crescimento muito lento, não passando de 2cm de diâmetro ao final de 24 dias. Nos tratamentos, a 25 °C, o isolado CDCA0170 também apresentou uma taxa de crescimento menor que os outros fungos, chegando ao crescimento máximo de 7 cm de diâmetro.

O crescimento dos isolados em meios baseados em milho e trigo a 15 °C foram semelhantes, os isolados de *A.ochraceus* cresceram, relativamente, mais rápido do que comparado aos isolados de *A. carbonarius*. Entretanto, nenhum isolado chegou ao crescimento total da placa. Os isolados de *A.carbonarius* chegaram ao crescimento total da placa no 11º dia em meio de trigo a 25 °C, os *A. ochraceus* no 16º dia. Já, o crescimento em meio de milho a 25 °C todos os isolados chegaram ao crescimento máximo entre o 15º e 18º dia. Os resultados mostram que, em geral, o crescimento a 15 °C, independente do meio e do isolado, foi mais lento. Entretanto, o meio YES foi nitidamente mais favorável ao desenvolvimento fúngico nas duas temperaturas.

Além disso, *A. carbonarius* apresentaram as características morfológicas tradicionais, como micélio branco e esporos negros, embora cada meio tenha interferido em alguns aspectos das colônias. *A. ochraceus* também apresentou suas características comuns como esporos amarelados, no entanto, também foram observadas variações em cada meio de cultura (figura 2).

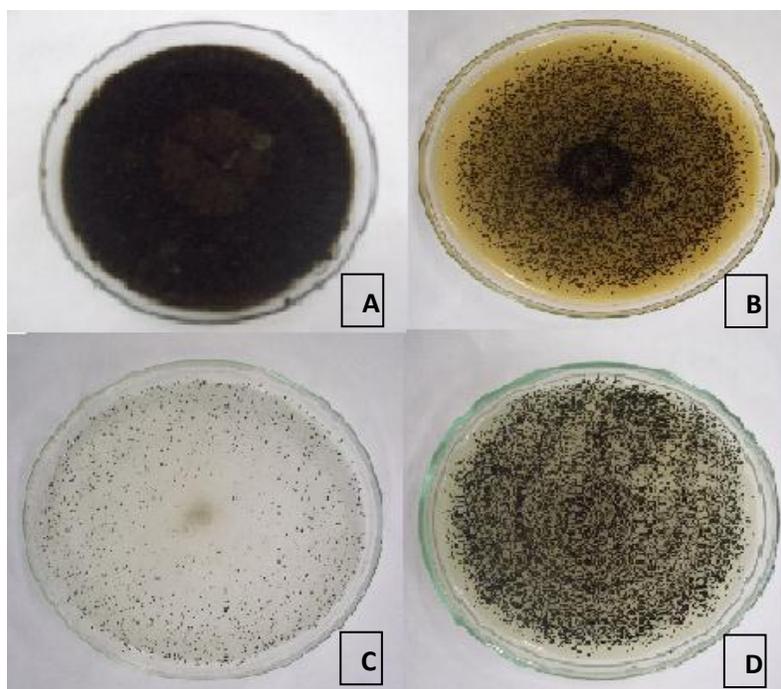


Figura 2 Imagens das colônias do isolado CDCA0126 (*A. carbonarius*) em diferentes meios de cultura a 25 °C; (A) Meio YES; (B) Meio de café; (C) Meio de milho e (D) Meio de trigo

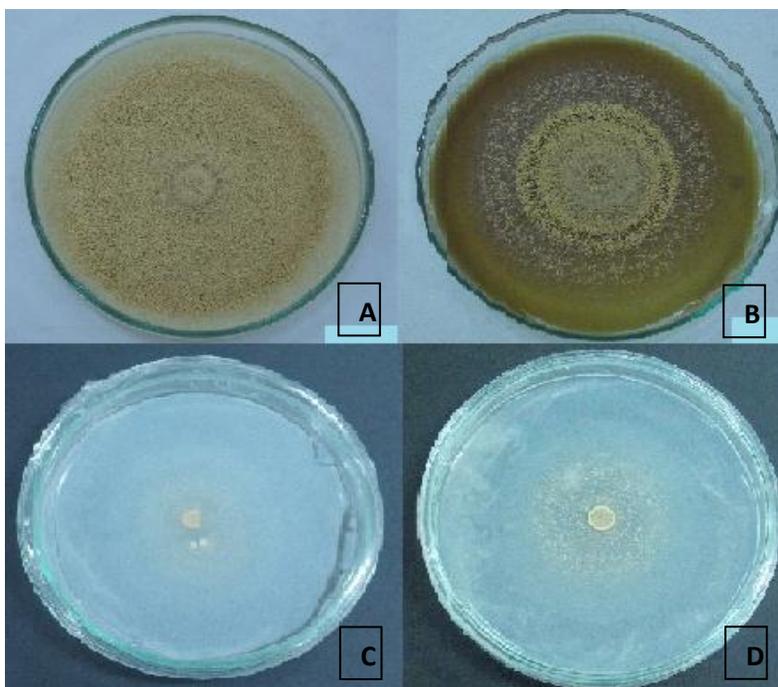


Figura 3 Imagens das colônias do isolado CDCA0626 (*A. ochraceus*) em diferentes meios de cultura a 25 °C; (A) meio YES; (B) meio de café; (C) meio de milho e (D) meio de trigo

3.5 Quantificações de OTA por CLAE

Os valores de concentração de OTA variaram de 0,0 até 30,42 µg/g. Em uma análise descritiva é possível identificar o meio YES como melhor substrato para produção de OTA em todos os tratamentos (Figura 4).

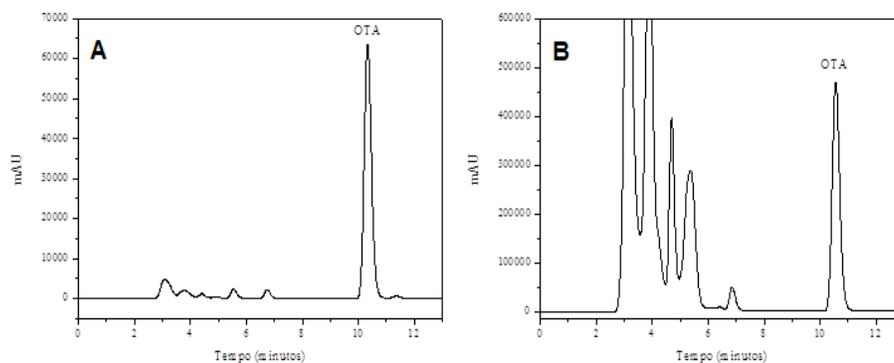


Figura 4 Cromatogramas dos tratamentos em diferentes combinações de fatores. (A) CDCA0126 em meio YES no 15º dia a 15 °C; (B) CDCA0162 em meio YES no 25º dia a 25 °C

Por meio dos testes estatísticos foi possível inferir que todas as interações foram significativas ao nível de confiança de 5%, inclusive a interação tripla que contempla todas as variáveis (Tabela 2).

Na Tabela 3 e 4, estão dispostos os resultados do teste Scott Knott para *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius*, respectivamente.

Tabela 2 Resumo da análise de variância das médias e coeficientes de variação referente à concentração de ocratoxina A em isolados de *A. carbonarius* e *A. ochraceus* submetidos a diferentes meios de cultura, temperaturas e tempos de avaliação

| FV | GL | Quadrado médio | | | | | |
|----------------------------|----|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | CDCA0169 | CDCA0170 | CDCA0126 | CDCA0151 | CDCA0153 | CDCA0162 |
| Meio | 3 | 21,48* | 6,75* | 142,22* | 50,96* | 18,64* | 190,06* |
| Temperatura | 1 | 2,04* | 17,11* | 125,60* | 33,99* | 3,23* | 55,64* |
| Meio x Temperatura | 3 | 18,75* | 6,99* | 142,13* | 33,74* | 2,72 * | 52,50* |
| Erro 1 | 8 | 0,04 | 0,02 | 0,03 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Tempo | 2 | 18,03* | 0,70* | 96,53* | 4,07* | 1,61* | 55,90* |
| Tempo x Meio | 6 | 11,15* | 4,25* | 82,95* | 4,01* | 1,93 * | 56,39* |
| Tempo x Temperatura | 2 | 3,89* | 0,10* | 84,22* | 2,90* | 2,94 * | 13,57* |
| Tempo x Meio x Temperatura | 6 | 5,66* | 4,02* | 64,06* | 3,04* | 3,21* | 14,03* |
| Erro 2 | 16 | 0,05 | 0,02 | 0,03 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| CV1 (%) | | 11,71 | 21,30 | 4,52 | 0,47 | 3,44 | 0,88 |
| CV2 (%) | | 12,12 | 20,36 | 4,87 | 1,05 | 3,15 | 0,93 |

*significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de F

Tabela 3 Concentração de ocratoxina A produzida por três isolados de *A. ochraceus* em diferentes meios de cultura, temperatura e tempo de incubação

| Fungo | Meio | Concentração de OTA ($\mu\text{g g}^{-1}$) | | | | | |
|----------|-------|--|----------|----------|----------|----------|-----------|
| | | 15 °C | | | 25 °C | | |
| | | 5dias | 15dias | 25dias | 5dias | 15dias | 25dias |
| CDCA0151 | YES | 1,28 a A | 0,53 a B | 0,63 a C | 9,95 a A | 3,24 a C | 9,40 a B |
| | CAFÉ | 0,22 b A | 0,05 b B | 0,04 b B | 0,12 b A | 0,14 b A | 0,06 b B |
| | TRIGO | 0,03 c A | 0,05 b A | 0,02 c A | 0,00 c A | 0,02 c B | 0,04 c B |
| | MILHO | 0,01 c A | 0,00 c A | 0,01 c A | 0,01 c A | 0,03 c A | 0,07 b B |
| CDCA0153 | YES | 7,05 a A | 2,37 a B | 1,17 a C | 1,20 a A | 1,33 a B | 2,23 a C |
| | CAFÉ | 0,10 b A | 0,06 b A | 0,39 b B | 0,05 b A | 0,06 c A | 0,07 b A |
| | TRIGO | 0,04 c A | 0,01 c A | 0,18 c B | 0,01 b A | 0,12 b B | 0,05 b A |
| | MILHO | 0,00 c A | 0,00 c A | 0,03 d A | 0,01 b A | 0,00 d A | 0,04 b A |
| CDCA0162 | YES | 0,17 a A | 2,83 a B | 8,44 a C | 7,19 a A | 4,61 a B | 24,01 a C |
| | CAFÉ | 0,10 b A | 0,08 b A | 0,10 b A | 0,23 b A | 0,33 b B | 0,05 c C |
| | TRIGO | 0,01 c A | 0,04 c A | 0,01 c A | 0,01 c A | 0,07 c B | 0,14 b C |
| | MILHO | 0,00 c A | 0,00 c A | 0,02 c A | 0,02 c A | 0,02 d A | 0,04 c A |

Médias seguidas de mesma letra maiúsculas e minúsculas, não diferem entre si, respectivamente na linha e na coluna pelo teste de Scott Knott ao nível de significância de 5%.

Tabela 4 Concentração de ocratoxina A produzida por três isolados de *A. carbonarius* em diferentes meios de cultura, temperatura e tempo de incubação

| Fungo | Meio | Concentração de OTA ($\mu\text{g g}^{-1}$) | | | | | |
|----------|-------|--|-----------|-----------|----------|----------|----------|
| | | 15 °C | | | 25 °C | | |
| | | 5dias | 15dias | 25dias | 5dias | 15dias | 25dias |
| CDCA0169 | YES | 0,00 a A | 3,61b B | 1,00 b C | 2,96 a A | 1,05 c B | 0,12 c C |
| | CAFÉ | 0,05 a A | 8,30 a B | 3,21 a C | 0,03 c A | 2,33 b B | 2,50 b B |
| | TRIGO | 0,02 a A | 0,02 c A | 3,65 a B | 2,33 b A | 5,22 a B | 7,52 a C |
| | MILHO | 0,00 a A | 0,10 c A | 0,06 b A | 0,00 c A | 0,87 c A | 0,03 c B |
| CDCA0170 | YES | 0,02 a A | 0,70 b B | 0,67 b B | 1,01 a A | 0,22 c A | 0,11 c B |
| | CAFÉ | 0,00 a A | 0,06 a A | 0,11 a A | 0,75 c A | 0,53 b B | 0,26 b B |
| | TRIGO | 0,00 a A | 0,24 c A | 0,33 a A | 0,07 b A | 4,50 a B | 6,24 a C |
| | MILHO | 0,00 a A | 0,01 c A | 0,05 b A | 2,66 c A | 0,09 c A | 0,07 c B |
| CDCA0126 | YES | 0,00 a A | 29,83 a B | 14,45 a C | 1,95 b A | 1,27 b B | 0,52 b B |
| | CAFÉ | 0,00 a A | 4,05 b B | 3,15 c C | 5,07 a A | 0,53 c A | 0,15 c B |
| | TRIGO | 0,00 a A | 0,39 c A | 13,06 b B | 0,86 c A | 6,12 a B | 9,87 a C |
| | MILHO | 0,00 a A | 0,06 c A | 0,41 d A | 0,07 d A | 0,12 d A | 0,01 c A |

Médias seguidas de mesma letra maiúsculas e minúsculas, não diferem entre si, respectivamente na linha e na coluna pelo teste de Scott Knott ao nível de significância de 5%.

Em relação às duas espécies analisadas, *A.carbonarius* produziu maior quantidade de OTA do que *A. ochraceus*, dando destaque ao isolado ao CDCA0126 que apresentou os mais altos níveis de OTA: 29,83 µg/g em meio YES a 15 °C e 13,06 µg/g em meio de trigo a 15 °C. O isolado CDCA0169 apresentou concentração de 8,3 µg/g em meio de café a 15 °C. E o isolado CDCA0126 produziu 5,07 µg/g em meio de café a 25 °C.

Os tratamentos nos quais não foi possível detectar nenhuma quantidade de OTA, chegaram a 12,5%. Desses tratamentos não detectados, 61,1% correspondem aos meios à base de milho.

As maiores concentrações produzidas por *A.ochraceus* foram no meio YES. O meio de cultivo à base de milho, em todos os tratamentos, apresentou baixa ou nenhuma concentração de OTA.

Os isolados de *A. ochraceus* produziram quantidades bem menores em meio de cultura à base de alimentos se comparados aos *A.carbonarius*, com máxima de produção de 0,39 em café a 25 °C pelo isolado CDCA0153.

Dentre todos os tratamentos, foi possível determinar o meio YES como o melhor substrato para produção de OTA. Sendo o tratamento mais produtivo o (CDCA0126; YES; 15 °C; 15° dia). Em relação aos meios de cultura à base de alimentos destaca-se o tratamento (CDCA0126; meio de trigo; 15 °C; 25° dia) e também o tratamento (CDCA0169; meio de café; 15 °C; 15° dia).

4 DISCUSSÃO

Fatores ecológicos, tais como atividade de água, temperatura e pH, têm demonstrado que afetam fortemente a produção de OTA por *A. ochraceus* e *A. carbonarius* (PARDO et al., 2004; KAPETANAKOU et al., 2011).

Os isolados de *Aspergillus carbonarius* foram capazes de reduzir o pH dos meios de cultura testados após os 24 dias de incubação. O pH decaiu de 7 até 2, provavelmente pela produção de ácidos como acontece com diferentes espécies de gênero *Aspergillus* (VAN DER STRAAT et al., 2014; LI et al., 2013).

A produção de OTA pode ser afetada pela variação do pH, em geral, quanto menor o valor do pH, mais alta é a síntese de toxina como a aflatoxina, por exemplo (KLICH, 2007). Em *Aspergillus*, não só biossíntese de toxina pode ser afetada por valores de pH, mas também esporulação (CALVO et al., 2002).

O crescimento de *Aspergillus carbonarius* foi mais rápido na temperatura de 25 °C, em todos os meios testados. Diversos estudos demonstram que uma maior faixa de temperatura permite crescimento *A. carbonarius*, como proposto em estudos semelhantes ao crescimento ótimo entre 15 e 37 °C. Em geral, o crescimento a temperaturas inferiores 15 °C não é comum e isso só é possível em altos níveis de atividade de água (BELLÍ et al., 2004). Outros estudos sugerem que a temperatura ótima para o crescimento de *A. carbonarius* está entre 25 e 30 °C (LEONG; HOCKING; PITT, 2004) ou entre 25 e 35°C, dependendo do isolado e do substrato utilizado para o crescimento (MITCHELL; ALDRED; MAGAN, 2003).

Aspergillus ochraceus cresceu mais rapidamente no meio de cultura YES a 25 °C. Estudos realizados por Palacios-Cabrera et al. (2005) demonstraram que temperaturas entre 25 e 30 °C favoreceram o crescimento de

diâmetro das colônia para *A. ochraceus*. Por outro lado, o crescimento mais lento pôde ser observado a 35 °C e inibição total a 41 °C em todos os meios de cultura testado.

Os tipos de substratos afetam diretamente o desenvolvimento fúngico. O meio de cultivo YES é geralmente considerado como um meio muito favorável para a biossíntese de OTA (SKRINJAR; DIMIC, 1992; BRAGULAT; ABARCA; CABANES, 2001). YES é rico em sacarose, um dissacarídeo rico em energia, e de metabolização rápida, fato que pode explicar a alta taxa de crescimento dos seis isolados testados.

Segundo Chalfoun et al. (2000), houve a inibição da produção de OTA e diminuição do crescimento e esporulação por *A. ochraceus* em meio de cultura YES adicionados de diferentes concentrações de cafeína.

Cada tipo de meio de cultura pode apresentar diferentes composições, havendo assim, variação nas taxas de crescimento. Para *A. ochraceus*, por exemplo, as maiores taxas de crescimento encontrados em ótimas condições foram diferentes entre os meios de cultura em diferentes estudos: *A. ochraceus* cultivados em ágar extrato de milho foram 3-4 mm/dia (MARÍN et al., 1998), em meio à base de cevada eram 4-5 mm/dia, até 6 mm/dia, em meio de ágar com extrato de café (PARDO et al., 2005), enquanto no presente trabalho, a taxa de crescimento foi de 15mm/dia em meio YES (25 °C), 10mm/dia em meio de café (25°), 10mm/dia em meio de trigo (25 °C) e 5mm/dia em meio de milho.

Os meios de cultivo à base de alimentos, são fontes baratas, e seus resultados de taxa de crescimento semelhantes àquelas em cultivos diretos. No entanto, os resultados obtidos em meios de cultura não podem, necessariamente, ser extrapolados para sistemas naturais e padrões de colonização podem ser modificados dependendo do ecossistema (GARCIA et al., 2009).

A combinação de fatores que apresentou o maior nível de OTA foi CDCA0169 no meio de YES a 15 °C, e esses dados corroboram com resultados

de Mitchell et al. (2004), Bellí et al. (2004) e Leong, Hocking e Pitt (2004), que estudaram diferentes isolados de *A. carbonarius* em diferentes interações, como o efeito da temperatura, atividade de água e tempo de incubação na produção de OTA.

O desenvolvimento das colônias não acompanha os mesmos padrões de produção de OTA, por exemplo, no 5º dia de incubação as colônias 25 °C já apresentavam quase a extensão inteira da placa, enquanto os isolados incubados a 15 °C se desenvolviam mais lentamente, entretanto a produção de OTA, em geral, foi maior a 15 °C. Segundo Leong et al., (2006), a produção OTA por *A. carbonarius* e *A. niger* não estava relacionada à extensão do crescimento, os tamanhos das colônias foram fortemente governados por temperatura, sendo a toxina reduzida quando a cultura era mantida 30 ° C. Além disso, a produção máxima OTA pode estar ligada a um momento específico após a inoculação, decorrente do forte efeito da temperatura sobre a germinação.

Fatores nutricionais estão intimamente ligados à ativação dos genes responsáveis pela produção de OTA. Estudos realizados em 2009, por Abbas e colaboradores avaliaram o efeito de uma grande variedade de fatores bióticos baseados em diferenças nutricionais sobre a produção de OTA e OTB. Diferentes fontes de carbono incluindo glicose, sacarose, maltose, galactose, xilose e glicerol pareceram reprimir a produção de OTA. Em contraste, lactose parece induzir à produção de OTA, com a adição de lactose e galactose ao meio restritivo (PDC), resultou em um aumentos acentuados nos níveis de OTA.

Em alguns tratamentos, houve um decréscimo na detecção de OTA a partir do 15º dia, esse fato pode ocorrer já que alguns fungos ocratoxigênicos podem utilizar a OTA produzida no meio de cultura como substrato, após algum tempo de cultivo, quando os nutrientes tornam-se escassos (VARGA; RIGO; TEREN, 2000). Segundo Abrunhosa, Serra e Venancio (2002), a maior parte das estirpes testadas em seu estudo foram capazes de degradar ocratoxina A,

enquanto cresciam em meio de cultura, 51 cepas (67 % de estirpes testadas) foram capazes de degradar mais que 80 % de ocratoxina A adicionada ao meio YES. E os isolados dos gêneros *Aspergillus* (*Aspergillus niger*, *A. clavatus*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*, e *A. wentii*) destacaram-se degradando mais de 95 % da ocratoxina A.

Os níveis mais baixos de OTA foram encontrados nos tratamentos com meio de cultura à base de fubá, para ambas as espécies em estudo, e esses valores não excederam ao limite proposto para alimentos à base de cereais (10 mg/Kg) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA, 2011), embora não seja possível extrapolar para os alimentos os valores encontrados nos testes com meios de cultura. Esses resultados concordam com outros autores, que não detectaram níveis significativos de OTA em silagem de milho (RICHARD et al., 2009; EL-SHANAWANY; MOSTAFA; BARAKAT, 2005).

Aspergillus ochraceus é o maior produtor de ocratoxina A em café, e desenvolve-se em temperatura entre 8 °C e 37 °C (temperatura ótima 24-31 °C) e pH entre 3-10 (PITT; HOCKING, 1997). Entretanto, neste estudo, os três isolados de *A. ochraceus* não ultrapassaram 0,3 ug /g no meio de cultura à base de café.

Aspergillus não são comumente associados com a produção de quantidades importantes de OTA no trigo em temperatura mais baixa (MAGAN; ALDRED, 2007). No entanto, os isolados de *A. ochraceus* CDCA0151, CDCA0153 e CDCA0162 produziram OTA a 25 °C em meio de trigo, resultado que corrobora com estudo de Muñoz et al. (2011) que apresentou altos de OTA (> 50 ug /g de ágar) a 25 °C em meio de cultivo baseado em trigo.

5 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo com as seis cepas ocratoxigênicas do gênero *Aspergillus* demonstraram uma produção significativa de OTA no meio de cultura YES, mas também produziram quantidades menores em meios de cultura à base de trigo e café, sob as condições de temperatura e tempo de incubação testados neste estudo. O isolado CDCA0126 (*A. carbonarius*) no meio de YES a 15 °C apresentou os maiores níveis de OTA. A taxa de crescimento para todos isolados foi maior no meio YES a 25 °C e o crescimento mais lento ocorreu no meio de milho a 15 °C. Portanto, por meio deste trabalho, é possível determinar, dentre as variáveis analisadas, quais as melhores condições para evitar ou minimizar a produção de OTA por *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus carbonarius* em grãos de café beneficiado, fubá e trigo.

REFERÊNCIAS

ABRUNHOSA, L.; SERRA, R.; VENANCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 25, p. 7493–7496, Dec. 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n. 7, de 18 de fevereiro de 2011**. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília: ANVISA, 2011. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 15 jan.2011.

BELLI, N. et al. *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, n. 4, p. 839–844, Aug. 2004.

BELLÍ, N. et al. Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from grapes. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.38, n. 1, p. 72–77, 2004.

BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; CABANES, F. J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 71, n. 2-3, p. 139–144, Dec. 2001.

CALVO, A. M. et al. Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Nebraska, v. 66, n. 3, p. 447–459, Jan. 2002.

CHALFOUN, S. M. et al. Efeito da cafeína (1,3,7-trimetilxantina) sobre o crescimento micelial de fungos associados ao café. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, n. 1, p. 50-53, 2000.

EL-SHANAWANY, A. A.; MOSTAFA, E. M.; BARAKAT, A. Fungal populations and mycotoxins in silage in Assiut and Sohag governorates in Egypt, with a special reference to characteristic *Aspergillus* toxins. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 159, n. 2, p. 281-289, Feb. 2005.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados**. Lavras: Editora da UFLA, 2000.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel Wissenschaft Technologie**, London, v. 13, n. 3, p. 128-130, Feb. 1980.

GARCIA, D. et al. Predicting mycotoxins in foods: a review. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 26, n. 8, p. 757–769, Dec. 2009.

KAPETANAKOU, A. E. et al. Development of a model describing the effect of temperature, water activity and (gel) structure on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in vitro and evaluation in food matrices of different viscosity. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 28, n. 4, p. 727-735, June 2011.

KLICH, M. A. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Mycoscience**, Tokyo, v. 48, n. 2, p. 71–80, Apr. 2007.

LEONG, S. L.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Occurrence of fruit rot fungi (*Aspergillus* section *Nigri*) on some drying varieties of irrigated grapes. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 10, n. 1, p. 83–88, 2004.

LI, A. et al. Reduced by-product formation and modified oxygen availability improve itaconic acid production in *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 9, n. 9, p. 3901–3911, May 2013.

MAGAN, N. et al. Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 7, p. 723–730, Sept. 2003.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1-2, p. 131–139, Oct. 2007.

MARIN, S. et al. Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from maize grain. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, n. 1, p. 25–36, Jan. 1998.

MITCHELL, D. et al. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 2, p. 439–445, 2004.

MITCHELL, D.; ALDRED, D.; MAGAN, N. Impact of ecological factors on the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* from different regions of Europe. **Aspects of Applied Biology**, Amsterdam, v. 68, p. 109–116, 2003.

MUÑOZ, K. et al. Mycotoxin production by different ochratoxigenic *Aspergillus* and *Penicillium* species on coffee- and wheat-based media. **Mycotoxin Research**, Marinz, v. 27, n. 4, p. 239–247, Nov. 2011.

PALACIOS-CABRERA, H. et al. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 24–28, Jan./Mar. 2005.

PARDO, E. et al. Modelling of effects of water activity and temperature on germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* on a green coffee-based médium. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 1–9, Jan. 2005.

PARDO, E. et al. Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* on irradiated barley grains influenced by temperature and water activity. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 15, n. 95, p. 79–88, Aug. 2004.

PITT, J. L.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2. ed. London: Blackie Academic, 1997.

RAMOS, A. J. et al. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 44, n. 2, p. 133–140, Aug. 1998.

RICHARD, E. et al. Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 148, n. 2–4, p. 309–320, Jan. 2009.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. Accouter analysis methods for grouping means in the analysis of variants. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507–512, Sept. 1974.

SKRINJAR, M.; DIMIC, G. Ochratoxigenicity of *Aspergillus ochraceus* group and *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* strains on various media. **Acta Microbiologica Hungarica**, Budapest, v. 39, n. 3-4, p. 257–261, 1992.

VAN DER STRAAT, L. et al. Expression of the *Aspergillus terreus* itaconic acid biosynthesis cluster in *Aspergillus niger*. **Microbial Cell Factories**, London, v. 13, p. 11, Jan. 2014.

VARGA, J.; RIGO, K.; TEREN, J. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 59, n. 1-2, p. 1-7, July 2000.