

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**POTENCIAL TOXIGÊNICO DE *Aspergillus flavus* TESTADO EM  
DIFERENTES MEIOS E CONDIÇÕES**

Ana Carolina Ritter  
Bióloga-URI

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, ênfase em Microbiologia de Alimentos.

**Porto Alegre, RS, Brasil  
Março, 2007**

Dedico essa conquista a Deus e a todas as pessoas iluminadas que pelo meu caminho passaram, oferecendo-me a força que necessitava nos momentos difíceis.

### **Em especial**

Aos meus pais amados, **Ivo e Lili Ritter**, pelo amor incondicional, pela base e exemplos que são para mim.

Ao meu irmão **Marcelo Ritter**, pelo amor, amizade, e força diária e, minha irmã **Juliana Ritter**, pelo apoio e carinho, mesmo distante.

À minha orientadora **Isa Beatriz Noll**, que sempre levou alegria e compreensão ao meu encontro.

A todos que fazem da minha vida um aprendizado constante, profissional e pessoal, contribuindo, cada um à sua maneira, em minha evolução.

## AGRADECIMENTOS

Ao **Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq), pela bolsa de mestrado concedida.

Ao programa de **Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente** (PPGMAA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Ao **Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos** (ICTA), pelo apoio, infraestrutura e hospitalidade.

Ao professor **Dr. Eduardo César Tondo**, por ter inicialmente me recebido nesta instituição, oferecendo apoio inicial e amizade durante os dois anos de mestrado.

Aos colegas **Daniel Joner Daroit, Daniele Misturini, Tais Marcon Machado, Luíza Lux, Fernanda Britto Velho e Sabrina Bartz**, pela companhia sempre agradável, pelas gargalhadas e profunda amizade dentro e fora da sala de aula.

Agradeço ainda ao funcionário do ICTA, **Roberval Bitterncourt**, por toda amizade e ajuda com algumas análises feitas neste trabalho e, à funcionária **Luiza Souza**, por todos os “bom dias” com um largo sorriso e palavras de conforto nas horas difíceis.

Ao Dr. **Horácio Alberto Dattori**, do Instituto de Física/UFRGS, pela excepcional ajuda nos experimentos com Fotometria Fotográfica.

A todos os componentes do Laboratório de Toxicologia, em especial **Msc. Michele Hoeltz** e, às bolsistas **Carolina Simom, Thamara Duarte e Daniele Castro**, pela colaboração neste trabalho.

À **Msc. Letícia Beatriz Matter**, minha primeira orientadora, amiga do peito e responsável por eu estar no caminho da pesquisa.

À **Msc. Fernanda Arboite de Oliveira**, amiga, colega e vizinha, companheira de muitas lutas e momentos agradáveis.

Aos amigos **Msc. Cíntia De David, Marília Maggioni, Marcelo Chagas e Dra. Adriane Pozzobon**, pela força e apoio diários.

Em especial, à professora **Dra. Isa Beatriz Noll**, pelo afeto e dedicação que manteve na condução deste trabalho.

## POTENCIAL TOXIGENICO DE *ASPERGILLUS FLAVUS* TESTADO EM DIFERENTES MEIOS E CONDIÇÕES<sup>1</sup>

Ana Carolina Ritter  
Isa Beatriz Noll (orientadora)

A avaliação da capacidade produtora de micotoxinas vem sendo utilizada como uma importante ferramenta na identificação de espécies conhecidamente toxigênicas. Poucos são os métodos rápidos e alternativos disponíveis para a determinação do potencial toxigênico de espécies do gênero *Aspergillus*. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade produtora de aflatoxina B1, em diferentes condições de cultivo, por três isolados de *Aspergillus flavus*, produtores de aflatoxina B1. O delineamento experimental baseou-se em um planejamento 2<sup>3</sup> completo, tendo como variáveis independentes a temperatura (20-40°C), o tempo de incubação (7-21 dias) e o pH (2,0-6,0) nos meios sintéticos (YES, CYA e Sabouraud). As melhores condições encontradas foram aplicadas em testes com meio natural (arroz) e isolados a princípio não-aflatoxigênicos. Aflatoxina B1 foi extraída diretamente dos meios sintéticos com clorofórmio e do arroz com metanol. A identificação e quantificação do composto foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada e Fotometria Fotográfica. O meio YES se mostrou o melhor para detecção do potencial toxigênico, seguidos de melhor pH 4,0 e 5,2, e temperatura de 20° e 25°C e tempo de incubação de 11 e 14 dias. O isolado A43, em temperatura de 25°, pH 5,2 e tempo de incubação de 11 dias, mostrou a maior produção de aflatoxina B1, com 206,05 ng. No arroz, os isolados revelaram produção de aflatoxina, apenas a partir do 14º dia. Dos 30 isolados a princípio não-aflatoxigênicos testados inicialmente em agar coco, 12 apresentaram resultado positivo nos meios e condições aqui apresentados.

Palavras-chave: aflatoxina B1, potencial toxigênico, meios, pH, temperatura.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (67p) Arco, 2007.

## ASPERGILLUS FLAVUS TOXIGENIC POTENTIAL TESTED IN DIFFERENT MEDIA AND CONDITIONS<sup>1</sup>

Ana Carolina Ritter  
Isa Beatriz Noll (supervisor)

Mycotoxins producing capacity evaluation has been used as an important tool, in the identification of toxigenic species. A few of them are available as alternative rapid methods for the determination of the toxigenic potential of species *Aspergillus*. The objective of this work was to evaluate the aflatoxin B1 producing capacity in different conditions of culture by three *Aspergillus flavus*. The experimental delineation was based on a 2<sup>3</sup> factorial design. To test the effect of three independent variables, the temperature (20-40°C), the incubation time (7-21 days) and pH (2,0 -6,0) in the synthetic medium (YES, CYA and Sabouraud) were applied in the program STATISCA 7.0. The best joined conditions had been applied in tests with natural medium (rice) and isolated tested as non-aflatoxigenics. Aflatoxin B1 was extracted directly from synthetic mediums by chloroform and from rice by methanol. Thin-layer chromatography (TLC) and Photometric Photography were the methods utilized for the identification and quantification of aflatoxin B1. YES was the best medium for the detection of toxigenic potential, at pH 4,0 and 5,2, temperature of 20° and 25°C and incubation time of 11 and 14 days. The isolated A43, at temperature of 25°C, pH 5,2 and incubation time of 11 days showed the biggest aflatoxin B1 production (206,05 ng). Aflatoxin production in rice occurred only after 14 days. 12 of the 30 non aflatoxigenic isolates showed aflatoxin production in the media and conditions tested.

Keywords: aflatoxin B1, potential toxigenic, medium, pH, temperature.

<sup>1</sup>Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Food Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (67p.) April, 2007

## SUMARIO

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Objetivos</b>	<b>3</b>
2.1	Objetivo geral	3
2.2	Objetivos específicos	3
<b>3</b>	<b>Revisão Bibliográfica</b>	<b>4</b>
3.1.	Fungos	4
3.2.	Micotoxinas	5
3.3.	Fungos toxigênicos	6
3.4	<i>Aspergillus flavus</i> e aflatoxina B1	7
3.5	Principais fatores que influenciam o desenvolvimento fúngico e a produção de aflatoxinas	9
3.5.1	Substrato	9
3.5.2	Umidade e atividade de água	11
3.5.3	Temperatura	12
3.5.3.1	Temperatura para o crescimento fúngico	12
3.5.3.2	Temperatura para produção de micotoxinas	13
3.5.4	pH	14
3.5.5	Tempo de Incubação	15
3.6	Identificação de fungos e determinação do potencial toxigênico	16
3.7	Quantificação por Fotometria Fotográfica	18
<b>4.</b>	<b>Materiais e Métodos</b>	<b>20</b>
4.1	Isolados Utilizados	20
4.2	Delineamento Experimental	20
4.3	Meios de cultivo	21
4.3.1	Meios sintéticos	21
4.3.1.1	Ajuste do pH dos meios sintéticos	22
4.3.2	Meio Natural	22
4.4	Análise do potencial toxigênico dos três isolados conhecidamente aflatoxigênicos (A43,A46 e A21)	22
4.4.1	Meios sintéticos	22
4.4.2	Meio Natural (arroz)	23
4.5.	Teste dos <i>Aspergillus</i> não produtores de aflatoxina B1	23
4.6	Quantificação	24
4.7	Limite de detecção com sistema fotométrico	24
<b>5</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>25</b>

<b>5.1 Resultado encontrado através da interação das variáveis independentes (pH, temperatura e tempo de incubação)</b>	<b>25</b>
<b>5. 2. Efeito da temperatura, pH e tempo de incubação</b>	<b>26</b>
5.2.1. Temperatura	26
<b>5.2.1.1. Temperatura de crescimento dos isolados <i>A.flavus</i></b>	<b>26</b>
<b>5.2.1.2. Temperatura para produção de aflatoxina B1</b>	<b>27</b>
5.2.2. pH	28
<b>5.2.2.1 pH para o crescimento fúngico</b>	<b>28</b>
<b>5.2.2.2 Produção de Aflatoxina B1 em diferentes pHs</b>	<b>29</b>
5.2.3. Tempo de incubação	29
<b>5.3. Efeito dos meios de cultura sintéticos na produção de aflatoxina B<sub>1</sub></b>	<b>31</b>
5.3.1. Análise qualitativa	31
5.3.2 Análise quantitativa	32
<b>5.4 Limite de detecção</b>	<b>36</b>
<b>5. 5 Teste dos isolados não produtores</b>	<b>37</b>
<b>5. 6. Teste feito no arroz</b>	<b>39</b>
<b>6 Conclusões</b>	<b>45</b>
<b>7 Referências Bibliográficas</b>	<b>47</b>
<b>8 Apêndice</b>	<b>53</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Isolado A43 em temperaturas de 35°C (E) e 25°C(D), em 11 dias de cultivo em meio YES _____	29
FIGURA 2 Isolado A 21 em pH de 4,0 (E) e 5,2 (D) _____	30
FIGURA 3 Isolado A43, inoculado no meio CYA, com pH 5.2, em 11 dias de incubação_____	32
TABELA 4 Isolado A46 em meio YES, CYA e Sabouraud, com tempo de incubação de 6 dias e pH 4.0 _____	42
FIGURA 5 Placa cromatográfica evidenciando com a seta, a mancha que representa 2µl de padrão de aflatoxina B <sub>1</sub> _____	43
FIGURA 6 Isolada A21 inoculado no arroz com 11 dias de incubação_____	44
FIGURA 7 Isolado A43 inculado no arroz com 7 dias de incubação, a 25°C _____	44

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Algumas espécies fúngicas e micotoxinas que podem ser produzidas pelas mesmas _____	7
TABELA 2 Algumas micotoxinas produzidas pelas espécies de <i>Aspergillus</i> _____	8
TABELA 3 Produção de diferentes aflatoxinas por <i>Aspergillus flavus</i> a diferentes temperaturas _____	14
TABELA 4 Valores codificados e reais das variáveis independentes _____	22
TABELA 5 Produção de aflatoxina B1 por três diferentes isolados (A43, A46, A21) de <i>Aspergillus flavus</i> em diferentes combinações de temperatura, pH e tempo de incubação _____	28
TABELA 6 Resultado quantitativo encontrado para as variáveis independentes.	35
TABELA 7 Teste dos isolados a principio não produtores nas melhores condições e meios encontrados _____	39
TABELA 8 teste dos isolados não aflatoxigenicos no agar coco _____	41
TABELA 9 Teste dos isolados produtores de aflatoxina retirados dos pré-inoculos (CYA e YES) inoculados no arroz _____	42

## 1 Introdução

Os fungos constituem um grupo de microrganismos amplamente encontrados nos vários ambientes terrestres, ar, água e solo. Fungos filamentosos são parte destacada desse grupo, por serem pluricelulares e por disseminarem-se facilmente através de suas estruturas reprodutivas chamadas esporos.

Esses microrganismos toleram uma ampla faixa de condições para seu crescimento, sendo, às principais relacionadas com a umidade, pH, temperatura e nutrientes disponíveis no substrato. Por esse motivo, podem adaptar-se facilmente em alimentos.

Os fungos mais comuns encontrados em alimentos e produtos estocados pertencem ao gênero *Aspergillus*. Esses fungos, nem sempre desejáveis nos alimentos, são capazes de produzir uma grande quantidade de enzimas que provocam sua deterioração. Além disso, algumas espécies podem produzir toxinas (micotoxinas) por significativas perdas econômicas e sérios problemas de saúde humana e animal.

As circunstâncias que promovem a produção de micotoxinas são geralmente mais restritas do que aquelas para o crescimento fúngico. O meio ótimo para a produção de metabólitos secundários depende do tipo de metabólito, da espécie e do isolado fúngico. O substrato, em combinação com a temperatura,

pH do meio, umidade relativa e umidade tem um efeito profundo na produção das micotoxinas.

As aflatoxinas, produzidas por espécies do gênero *Aspergillus*, são micotoxinas com potencial hepatotóxico, carcinogênico e teratogênico tanto em homens como em animais. Segundo a avaliação do IARC (2002), as aflatoxinas são consideradas carcinogênicas para humanos (grupo I).

A avaliação da capacidade produtora de aflatoxinas vem sendo utilizada como uma importante, rápida e alternativa ferramenta na identificação de espécies fúngicas toxigênicas. Essa avaliação também tem sido utilizada na avaliação toxicológica de produtos. Mesmo assim, ainda são escassos os trabalhos conclusivos sobre o assunto, havendo a clara necessidade de mais estudos que façam esse tipo de avaliação, a fim de detectar rapidamente esses microrganismos prejudiciais, principalmente em produtos agrícolas.

Tendo em vista os aspectos mencionados, este trabalho tem por objetivo a avaliação do potencial toxigênico de espécies de *Aspergillus* isoladas de amostras de arroz com casca, em diferentes condições de cultivo, buscando assim um método alternativo e de fácil aplicação para a detecção do potencial toxigênico deste gênero fúngico.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade de crescimento e o potencial toxigênico de *Aspergillus flavus* isolados de amostras de arroz em diferentes condições de cultivo.

### 2.2 Objetivos específicos

→ Testar diferentes condições do crescimento desses isolados tais como: meios de cultura, temperatura, pH, umidade e tempo de incubação.

→ Avaliar a capacidade de produção de aflatoxina B<sub>1</sub> dos isolados testados, nas diferentes condições, por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Fotometria Fotográfica.

→ Observar a capacidade produtora de aflatoxina B<sub>1</sub> dos isolados no substrato em que foram isolados (arroz).

→ Comparar a eficácia do método utilizado neste trabalho, com métodos já existentes e freqüentemente utilizados,

→ Buscar um método alternativo e de fácil aplicação para a detecção do potencial toxigênico de *Aspergillus* spp.

### 3 Revisão Bibliográfica

#### 3.1.Fungos

Os fungos são microrganismos eucarióticos largamente distribuídos no ambiente, incluindo ar, solo e água. A estrutura básica dos bolores é formada por filamentos denominados hifas, que, em conjunto, formam o micélio. O micélio pode ter duas funções distintas: promover a fixação do bolor no substrato (micélio vegetativo) e promover a reprodução, através da produção de esporos (micélio reprodutivo). O micélio dos bolores é responsável pelo aspecto característico das colônias que formam, podendo ser cotonosos, úmidos e gelatinosos (Franco *et al.*, 1996; Gock *et al.*, 2003).

Os fungos apresentam uma grande versatilidade em crescer em substratos, que outros microrganismos não são capazes de colonizar como: (i) crescimento com atividade de água reduzida ( $a_w > 0,65$  até  $a_w < 0,99$ ), (ii) crescimento em valores de pH reduzido: 3,0 e abaixo; (iii) crescimento em uma grande variedade de temperatura: maior que 0°C a menor que 40°C; (iv) utilização de uma grande variedade de substrato, (v) capacidade de esporulação e disseminação em diferentes condições (Taniwaki, 1996; Filtenborg *et al.*, 1996; Medina *et al.*, 2006).

Estes microrganismos, nem sempre são desejáveis nos alimentos, pois são capazes de produzir uma grande quantidade de enzimas que, agindo sobre tais substratos, provocam sua deterioração, além de que, algumas espécies de fungos podem produzir toxinas (Franco *et al.*, 1996; Smedsgaard, 1997).

### **3.2. Micotoxinas**

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de fungos filamentosos, que podem ser produzidas em alimentos, como resultado do crescimento fúngico (Gonçalves *et al.*, 2001; Gqaleni *et al.*, 1997; Sweeney & Dodson, 1998).

Alguns fatores que influenciam a produção de micotoxinas são: composição do substrato, temperatura, teor de água, umidade relativa do ar, atividade de água, pH, linhagem do fungo contaminante, sendo que a temperatura, umidade e tipo de substrato são os mais importantes (Mallozzi & Corrêa, 1998). A contaminação dos alimentos pode ocorrer no campo, antes ou após a colheita, sendo que o mais comum é durante a estocagem (Mello & Macdonald, 1997; Caldas *et al.*, 2002).

A presença do fungo produtor não indica a presença da micotoxina. Portanto, o entendimento dos fatores que permitem o crescimento do fungo e a produção de micotoxinas é de grande importância para métodos de controle. Os fungos possuem uma atividade de água e temperatura máxima e mínima para seu crescimento, sendo estes valores normalmente diferentes para produção de toxina (Park & Bullerman, 1983). Sendo assim, o simples isolamento e confirmação de

fungos micotoxigênicos em alimentos não indicam a presença de micotoxinas (Hunssein & Brasel, 2001; Guitakou *et al.*, 1996).

A exposição humana a micotoxinas pelo consumo de alimentos contaminados é uma questão de saúde pública em todo mundo, além de acarretarem milhões de dólares em prejuízos anualmente, gastos com a saúde humana, animal e produtos agrícolas (Caldas *et al.*, 2002; Hussein & Brasel, 2001).

### **3.3. Fungos toxigênicos**

Os gêneros fúngicos comumente encontrados em alimentos são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Sweeney & Dobson, 1998).

Uma mesma toxina pode ser produzida por uma variedade de fungos diferentes, como, por exemplo, a patulina, produzida por *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium expansum* e *Penicillium griseofulvum*. Também se pode observar que alguns fungos são capazes de produzir várias toxinas diferentes, como *Aspergillus flavus*, que produz aflatoxinas, ácido aspergílico e ácido ciclopiazônico (Taniwaki & Silva, 2001). Alguns exemplos de espécies fúngicas e micotoxinas podem ser encontrados na Tabela 1.

**TABELA 1. Algumas espécies fúngicas e micotoxinas que podem ser produzidas pelas mesmas**

Espécies Fúngicas	Micotoxinas
<i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxinas
<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Penicillium viridicatum</i> e <i>Penicillium cyclopium</i>	Ocratoxina A
<i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium graminearum</i>	Deoxivalenol
<i>Fusarium proliferatum</i> , <i>Fusarium verticillioides</i>	Fumonisin

Fonte: D'Mello & MacDnoald (1997) apod Hussein & Brasel(2001)

Mais de 400 micotoxinas são conhecidas hoje, sendo as aflatoxinas as mais encontradas (Filtenborg *et al.*, 1996).

### 3.4 *Aspergillus flavus* e aflatoxina B1

As aflatoxinas foram descobertas em 1960, depois que sua toxicidade foi responsável pela morte de vários perus na Inglaterra, os quais ingeriram ração contaminada com este metabólito. A ração estava infectada com *Aspergillus flavus* por com um composto fluorescente azul, sob a luz ultravioleta o qual foi denominado aflatoxina (Moss, 2002).

*Aspergillus*, caracterizado pelo desenvolvimento de colônias coloridas e brilhantes, como verdes e amarelo-oliva, é provavelmente o gênero mais comumente implicado na contaminação de alimentos por micotoxinas. Mais de vinte espécies de *Aspergillus* produzem micotoxinas, porém as mais comuns são as da divisão *flavi*, que incluem três espécies: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* (Vaamonde *et al.*, 2003; Saleemullah *et al.*, 2006). Algumas das micotoxinas produzidas por espécies de *Aspergillus* podem ser observadas na Tabela 2.

**TABELA 2. Algumas das micotoxinas produzidas pelas espécies de *Aspergillus***

Espécie fúngica	Toxinas
<i>A. candidus</i>	candidulina, terfenilina, xantoxina
<i>A. carbonarius</i>	ocratoxina
<i>A. clavatus</i>	ascladiol, clavato, patulina
<i>A. flavus</i>	aflatoxinas, aflatren, ác. Aspergilico, ác. Ciclopiazônico
<i>A. fumigatus</i>	fumiclavina, fumigatina, fumitoxonas
<i>A. niger</i>	malformina, naftoquinonas
<i>A. nomius</i>	aflatoxinas
<i>A. oryzae</i>	aspergilomarasmina, orizacidina, maltorizina
<i>A. parasiticus</i>	aflatoxinas, ácido aspergilico, ác. Kójico
<i>A. sydowii</i>	esterigmatocistina, griseofulvina
<i>A. tamaris</i>	ác. ciclopiazônico, fumigaclavina A

Fonte: Taniwaki & Silva (2001).

As quatro aflatoxinas naturalmente produzidas são B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>; sendo que a B<sub>1</sub> é usualmente encontrada em grandes concentrações contaminando alimentos. A nomenclatura de B e G é derivada da fluorescência azul e verde fluorescente produzido sob a luz UV em placas cromatográficas. Aflatoxina B<sub>1</sub> é o componente mais tóxico para o fígado de animais e humanos (Sweeney & Dobson, 1998; Marklinder *et al.*, 2005; Moss, 2002; Pildain *et al.*, 2004).

Em 1993, a IARC- International Agency for Research on Câncer (WHO-IARC, 1993), considerou as aflatoxinas como carcinogênicas para humanos (grupo I). (Hussein & Brasel, 2001; IARC, 2002).

A contaminação de alimentos por aflatoxina B1 causa sérias perdas econômicas (Giray *et al.*, 2007). No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos pela legislação. Estima-se que cerca de 35% dos casos de câncer humano estejam relacionados à dieta e a presença de aflatoxinas em alimentos é considerada um fato importante na produção de câncer hepático. A diminuição da exposição da população a aflatoxinas, e conseqüentemente diminuição de riscos a saúde, somente será possível com um trabalho com os produtores de alimentos e com ações eficientes de Vigilância Sanitária (Caldas *et al.*, 2002). Exposições agudas de aflatoxinas estão sendo associadas com epidemias de hepatite em áreas da China e África com taxas de mortalidade entre 10 e 60% (Hussein & Brasel, 2001).

### **3.5 Principais fatores que influenciam o desenvolvimento fúngico e a produção de aflatoxinas**

#### **3.5.1 Substrato**

O substrato é um dos mais importantes fatores que determinam o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas (Park & Bullermann, 1983).

Vários substratos já foram testados para verificar o potencial toxigênico fúngico. Após analisarem vários substratos para examinar a habilidade do fungo em produzir micotoxinas, Kokkonem *et al.* (2004) verificaram que linhagens de *Penicillium* produziram várias micotoxinas diferentes, dependendo do meio e da linhagem. A partir deste dado, os autores concluíram que existe uma grande

necessidade de se utilizar mais de meio de cultura para verificar e identificar os metabólitos fúngicos.

Hoeltz (2005), pesquisando contaminação fúngica e de micotoxinas no arroz com casca em diferentes sistemas de secagem e armazenamento, encontrou sete isolados de *Aspergillus flavus* produtores de aflatoxinas B<sub>1</sub>, através do método descrito por Lin & Dianese (1976), porém não verificou qualquer tipo de micotoxina presente nesse substrato.

Hermanns *et al.* (2006), utilizaram milho como substrato e testaram cepas de *Fusarium* spp. O resultado, obtido através do teste ELISA-Competitivo Indireto, revelou 100% das cepas testadas possuem a capacidade de produzir fumonisinas.

Leontopolos *et al.* (2003) concluiu através de seu estudo, que o potencial de crescimento de *A. parasiticus* e a produção de aflatoxinas B<sub>1</sub> não é favorável em azeitonas.

Park & Bullerman (1983) inocularam esporos de duas espécies de *Aspergillus flavus e parasiticus*, em arroz e queijo e analisaram o efeito da variação de temperatura nestes substratos (25°C, 18°C, 5-25°C, 15°C e 5°C). Estes autores concluíram que o queijo não é um bom substrato para produção de aflatoxinas, ao contrário do arroz.

Em muitas pesquisas feitas para detecção do potencial toxigênico, os meios sintéticos mais utilizados são o CYA - Agar Extrato de Levedura Czapek (Frisvad & Filtenborg, 1983; Gqaleni, *et al.*, 1997; Kokkonen *et al.*, 2004; Filtenborg *et al.*, 1983; Abranson & Clear, 1996; Frisvard & Filtenborg, 1983; Bellí *et al.*, 2004; Vaamonde *et al.*, 2003; Brugulat *et al.*, 2001; Vaamonde *et al.*, 2003; OBrian *et al.*,

2003; Smedsgaard,1997; Ordaz *et al.*, 2003;) e o YES- Extrato de Levedura Sacarose (Gqaleni *et al.*,1997; Lin *et al.*, 1980; Lentopouulos *et al.*, 2003; Abranson & Clear,1996; Frisvard & Filtenborg, 1983; Kokkonen *et al.*, 2004; Ordaz *et al.*, 2003, Park & Bullerman,1983; Gqaleni *et al.* 1996; Brugulat *et al.*, 2001; Smedsgaard,1997; Horn *et al.*, 2000).

Lentopulous *et al.* (2003) concluíram que YES Agar é um ótimo meio para biossíntese de aflatoxina B1 e que além de ser de fácil preparação, é relativamente barato.

### **3.5.2 Umidade e atividade de água**

Segundo Scussel (1998), *Aspergillus flavus* cresce tanto em substratos com umidade entre 22-23% e UR entre 90-100%, quanto com umidade de 15% e UR de 70-90%. A faixa de umidade relativa para produção de aflatoxinas: de 80 a 85%; umidade relativa ótima para esporulação: 85%;umidade relativa máxima para a produção de aflatoxinas: 95-99%.

Segundo Pardo *et al.* (2004) a atividade de água é definida como a relação entre a pressão de vapor de água de um determinado substrato e a pressão de vapor da água pura na mesma temperatura e pressão.

O comportamento microbiano frente à atividade de água é extremante variável. Os substratos com  $a_w$  inferior a 0,60 estão assegurados quanto a contaminação microbiana. A partir de  $a_w$  0,65 começa a ocorrer proliferação de microrganismos específicos, sendo que até  $a_w$  0,75 somente algumas bactérias halofílicas, leveduras osmofílicas e fungos xerofílicos podem se desenvolver. A atividade de

água para a produção de micotoxinas varia de 0,80 a 0,99, normalmente maior do que para o desenvolvimento do fungo (Mallmann, 2002).

O *Aspergillus flavus* tem mostrado ótima produção de micotoxinas em atividade de água de 0,90 (Sweeney & Dobson, 1998). Porém para Gqaleni *et al.* (1997) a atividade de água do substrato (CYA e YES) de 0,99 foi a considerada ótima para produção de aflatoxinas. No mesmo estudo a produção de aflatoxina foi afetada por diferentes substratos, tempos de incubação e presença de outras micotoxinas produzidas por *A. flavus*.

De uma maneira geral, as aflatoxinas são produzidas a valores de  $a_w$  de 0,95 a 0,99 com um valor mínimo de 0,82 para *A. flavus* (ICMFC, 1996; Nielsen, *et al.*, 2004).

### **3.5.3 Temperatura**

A temperatura é menos restritiva do que a umidade no que diz respeito ao crescimento fúngico e a produção de micotoxinas (Taniwaki & Silva, 2001). No caso da espécie *Aspergillus flavus*, existe uma diferença na temperatura ótima para o crescimento fúngico e para produção de micotoxinas.

#### **3.5.3.1 Temperatura para o crescimento fúngico**

O gênero *Aspergillus* é considerado “tropical”, devido ao fato de ser muito encontrado em países desta natureza e que possuem uma grande variação de temperatura. A espécie *Aspergillus flavus* foi caracterizado por crescer em uma temperatura mínima de 10°C. Porém, o crescimento ótimo fica na faixa de 15 a 40°C (Dantigny *et al.*, 2005).

Gqaleni *et al.* (1997), demonstraram em seu estudo que as espécies de *Aspergillus flavus* estudadas tiveram uma ótima temperatura para colonização do substrato na faixa de 25 a 30°C.

Segundo Taniwaki & Silva (2001) o *A. flavus* apresenta temperatura mínima de crescimento por volta de 12°C, máxima próxima de 48°C e ótima entre 30 e 42°C.

### 3.5.3.2 Temperatura para produção de micotoxinas

A faixa de temperatura para formação de aflatoxinas é de 25°C a 32°C, apesar de que a temperatura de 13°C por dois ou mais dias ainda permitem a formação de aflatoxina (Osweiler, 1998).

Segundo Gqaleni *et al.* (1997) a produção de aflatoxina nos meios CYA e YES foi ótima a 30°C.

O *Aspergillus flavus* produz diferentes proporções de aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> a diferentes temperaturas (Tabela 3).

TABELA 3. Produção de diferentes aflatoxinas por *Aspergillus flavus* a diferentes temperaturas

Temperatura	Produz aflatoxinas	Na proporção de
Abaixo de 25°C	B <sub>1</sub> e G <sub>1</sub>	1/1
25°C	B <sub>1</sub> e G <sub>1</sub>	2/1
28°C	B <sub>1</sub> e G <sub>1</sub>	4/1
32°C	B <sub>1</sub> e G <sub>1</sub>	2/1

Fonte: Scussel, 1998.

Segundo Park & Bullerman (1983), a produção de aflatoxinas pode ser afetada por flutuação de temperatura. A exposição de *A. parasiticus* a temperaturas altas (entre 40 e 50°C), por um curto período de tempo, reduz o crescimento e a produção de aflatoxinas.

### 3.5.4 pH

Segundo Wheeler *et al.* (1991), *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* crescem em uma faixa de pH que vai de 2,0 a 11. Todas as espécies de *Aspergillus* crescem rapidamente em pH alcalino, porém nas espécies de *Aspergillus* analisadas, o índice de crescimento de pH 2,0 foi de apenas 25% e 30% em pH 3,0. O ótimo pH para crescimento foi de 7,5 e para esporulação 6,5. Estes autores concluem ainda que em situações de pH próximo ao neutro, fungos podem competir com bactérias por nichos, mas em níveis elevados de atividade de água, a maioria dos fungos não é competitiva em culturas mistas.

Segundo Taniwaki & Silva (2001), na faixa de 3,0 a 8,0 os fungos são muito pouco afetados pela variação do pH. Entretanto quando o pH afasta-se do ótimo (geralmente próxima a 5,0), a velocidade do seu crescimento diminui, e se houver outros fatores de inibição como, por exemplo, a temperatura e a atividade de água, seu efeito restritivo sobre a velocidade do crescimento torna-se mais acentuado.

Molina & Giamuzzi (2002) verificaram que no pH 5,9 houve uma elevação na produção de aflatoxina B<sub>1</sub>. Já com pH 5,5 pôde-se notar um decréscimo na produção de aflatoxina.

### 3.5.5 Tempo de Incubação

Gqaleni *et al.* (1996) examinou o efeito de diferentes técnicas e meio para produção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico em meio YES, no tempo de incubação de 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 dias, concluindo que aflatoxina foi produzida no segundo dia de incubação e atingiu sua máxima concentração de 130 µg/g depois de 14 dias. A maior concentração de aflatoxinas ocorreu no 15º dia. Ao chegar em 21 dias de incubação, a concentração sofreu um decréscimo para 75µ/gg.

Já Frisvad & Filtenborg. (1983), fizeram análise das culturas inoculadas no meio CYA e YES no tempo de 7, 9, 12 e 14 dias de incubação, concluindo que o tempo de 14 dias foi o melhor para produção de micotoxina.

Park & Bullerman (1983), após inocular esporos de *A.flavus* e *A. parasiticus* em queijo e arroz, analisaram a produção de aflatoxina nos tempos de 3, 7, 10, 14, 21 e 28 dias, concluído que em 14 dias de incubação, ocorreu o maior pico da produção de aflatoxina.

Para Lentopoulus *et al.* (2003), o máximo crescimento do micélio de um isolado de *Aspergillus flavus* foi ao sexto dia após a inoculação. Depois deste período, uma moderada desaceleração do crescimento do micélio foi observado. Já produção de AFB1 que foi detectada depois do 3º dia de incubação, aumentando drasticamente sua concentração a partir do 14º dia.

### **3.6 Identificação de fungos e determinação do potencial toxigênico**

A detecção dos metabólitos secundários é importante na classificação e identificação fúngica. Embora já sabido o fato de que o perfil de uma espécie fúngica produtora de micotoxina depende dos meios e das condições do crescimento, apenas alguns estudos foram publicados comparando fungos e seus perfis toxigênicos crescendo em diferentes meios, incluindo alimentos (Kokkonen *et al.*, 2004).

A taxonomia dos fungos toxigênicos que colonizam os alimentos é baseada principalmente em suas estruturas morfológicas. Para prevenção da contaminação e qualidade do produto, a identificação das espécies é de extrema importância. Em alguns gêneros importantes destes fungos, a taxonomia ainda é um problema, conduzindo a dificuldades na identificação. Isto é particularmente aplicado a espécies de *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Em comparação com bactérias, a identificação de fungos é um procedimento que consome tempo, o que requer usualmente 14 dias, incluindo isolamento e subcultura (Samson & Frisvad, 1993).

Os meios para detectar fungos toxigênicos são de interesse para todo micologista e muitos esforços estão sendo feitos para desenvolvê-los para uso na sua rotina. Atualmente, existem meios formulados para detectar cepas potencialmente toxigênicas de *Aspergillus* como o Agar Flavus Parasiticus (AAFP) que diferencia espécies de *Aspergillus flavus* e *parasiticus*. Um meio simples para seleção de *A. flavus* e *A. parasiticus*, produtores de aflatoxinas, foi desenvolvido por Lin & Dianese (1976), contendo leite de coco e agar. Após o crescimento das

colônias, as placas são observadas sob luz ultravioleta. As espécies produtoras de aflatoxinas produzem um halo azulado fluorescente em torno da colônia. É uma técnica simples e útil. Contudo alguns falsos resultados negativos podem ser obtidos (Taniwaki, 1996).

Alguns autores investigaram a possibilidade de executar identificação direta do isolado no meio, usando metabólitos secundários aplicados a thin-layer chromatography (TLC). Através da verificação destes metabólitos, a identificação e classificação dos fungos é bem mais confiável (Smedsgaard, 1997; Samson & Frisvad, 1993).

Porém, para que a identificação seja correta, meios e condições de cultura são importantes. Para uma rápida detecção das espécies produtoras de micotoxinas, meios seletivos devem ser desenvolvidos (Samson & Frisvad, 1993). Um meio de cultura usado geralmente para verificar a produção de micotoxina é o meio YES (Ordaz *et al.*, 2003).

Numerosos métodos podem ser descritos para detectar fungos toxigênicos baseados na produção em substratos naturais ou substratos sintéticos seguido de extração, purificação e detecção por TLC ou HPLC (Bragulart *et al.*, 2001). A TLC agar plugue, porém, é um dos métodos mais simples para determinação do perfil de metabólitos secundários, retirados diretamente de culturas fúngicas. Este, é baseado na umidificação de um pedaço do agar vindo de uma cultura, com aplicação de solventes orgânicos, e em seguida aplicação na placa de TLC. Uma escala muito ampla de metabólitos secundários pode ser determinada desta forma através dos pontos coloridos fluorescentes (Smedsgaard, 1997).

### **3.7 Quantificação por Fotometria Fotográfica**

Como alternativa às medidas semiquantitativas tradicionais das manchas fluorescentes realizadas a olho nu, tanto dos padrões de micotoxina, quanto de amostras positivas, pode ser utilizado um método de fotometria fotográfica com detectores CCD (Charged Coupled Device), semelhante ao utilizado modernamente em Astronomia para medir a luminosidade das estrelas e outros objetos (Walker, 2004).

As vantagens de um sistema fotométrico deste tipo é que a sensibilidade dos detectores CCD é muito maior que a do olho, além de que a sua resposta é linear, enquanto que a resposta do olho é logarítmica (lei fisiológica de Fechner). Assim sendo, o CCD permite fazer acumulação da luz, em exposições longas, e o olho não. Em consequência, num processo de contagem dos fótons acumulados pelo CCD, pode-se quantificar as medidas realizadas através dos padrões e, assim, calcular os erros inerentes às medidas. Com a realização de várias medidas os erros podem ser determinados com maior precisão (Dottori, 1998).

O aparelho utilizado para obter as fotografias CCD pode ser o mesmo que se usa para realizar a observação ocular das amostras. O mesmo consta de uma câmara escura com duas aberturas, um para colocar a lâmpada UV e a outra para observação. Na abertura destinada à observação é adaptada uma câmara fotográfica com boa resolução.

As amostras e o padrão são colocados numa linha paralela à disposição da lâmpada UV (eixo Y), numa distância de 35 cm (eixo Z). O eixo X é o perpendicular ao eixo da lâmpada (Y) e à altura do aparelho (Z). O processo de

medida consiste em tomar dez fotografias simultâneas do padrão e da amostra, cinco delas com a amostra à direita do padrão e 5 à sua esquerda. Como o maior gradiente de luz, devido à disposição da lâmpada é no sentido do eixo X, a disposição de amostra e padrão mencionada garante uma iluminação mais homogênea. De todas formas, um pequeno gradiente da ordem de 10% detectado na direção Y é compensado pela alternância espacial mencionada entre padrão e amostra. Para compensar a pequena diferença de sensibilidade entre os diversos pixels do detector(3), entre uma fotografia e a outra se desloca ligeiramente à câmara na direção X, com a finalidade de que os objetos mudem de posição no marco da foto. Este efeito não deve ser importante em fotometria de fontes intensas, como no caso das manchas (Dottori,1998)

Uma vez obtidas, as 10 imagens digitais podem ser avaliadas com um software específico de fotometria, que mede a intensidade dentro de uma área (ou diafragma) pré-determinada. Pela simetria das manchas são utilizadas aberturas circulares do tamanho das mesmas (Wallis *et al.* 1994).

## **4. Materiais e Métodos**

Este trabalho foi realizado no laboratório de Toxicologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### **4.1 Isolados Utilizados**

Para realização deste trabalho, foram utilizados três isolados de *Aspergillus flavus*, produtores de aflatoxina B<sub>1</sub>, encontrados e identificados por Hoeltz (2005) em amostras de arroz com casca.

Estes isolados foram denominados A21, A43 e A46.

### **4.2 Delineamento Experimental**

Para realização deste experimento, foi realizado um planejamento central composto 2<sup>3</sup>, com três pontos centrais e seis pontos axiais, totalizando 17 experimentos (Rodrigues, 2005). As três variáveis independentes estudadas foram temperatura (°C), pH e tempo de incubação e as variáveis dependentes foram taxa de crescimento das colônias e produção de micotoxina B<sub>1</sub> (análise qualitativa e quantitativa).

Os fatores foram codificados de acordo com

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i}$$

Onde,  $x_i$  é o valor codificado,  $X_i$  é o valor atual da variável independente,  $X_0$  é o valor atual do ponto central e  $\Delta X_i$  é o espaçamento entre as variáveis. O software Statistica 7.0 (Statsoft, USA) foi usado para a análise gráfica e de regressão dos dados. A Tabela 4 mostra os valores codificados e reais das variáveis independentes.

TABELA 4. Valores codificados e reais das variáveis independentes

Variáveis Independentes	Símbolo	Variáveis Codificadas				
		-1,68	-1	0	+1	+1,68
temperatura	$X_1$	20	25	30	35	40
pH	$X_2$	2,0	2,8	4,0	5,2	6,0
tempo	$X_3$	7	11	14	18	21

### 4.3 Meios de cultivo

#### 4.3.1 Meios sintéticos

**YES:** 20 g extrato de levedura, 150g de sacarose, 20g de agar, 0.5 de sulfato de magnésio e 100 mL de água destilada.

**CYA:** 5,0g de extrato de levedura, 30,0 g de sacarose, 15,0 de agar, 10,0/mL de Czapeck concentrado, 1,0 de  $H_2HPO_4$  e 100 mL de água destilada.

**Agar Sabouraud:** Com composição (g/L): neopeptona 10,0, dextrose 40,0 e ágar 20,0 (Merck).

#### **4.3.1.1 Ajuste do pH dos meios sintéticos**

Para os meios acima de pH 4,0, o ajuste foi feito antes de autoclavar, com ácido tartárico 10%, no ph-metro. Para os pHs iguais ou menores que 4,0, o ajuste foi feito após a esterilização.

#### **4.3.2 Meio Natural**

Arroz parboilizado, livre de micotoxina, com umidade inicial de 12,89%.

### **4.4 Análise do potencial toxigênico dos três isolados conhecidamente aflatoxigênicos (A43,A46 e A21)**

#### **4.4.1 Meios sintéticos**

Após o preparo dos meios, os fungos foram testados da seguinte maneira: i) retirada do fungo a ser testado do tubo de ensaio contendo agar sabouraud; ii) Repique para o centro de placas de Petri contendo o meio a ser testado; iii) Incubação. Ao chegar o tempo específico para cada análise de cada experimento, foi analisada a taxa de crescimento da colônia, através da medição do diâmetro, realizada no verso da mesma. Em seguida o micélio fúngico foi raspado, cortado em tiras e macerado com aproximadamente 5/mL de clorofórmio. Os extratos obtidos foram aplicados com capilares sobre placas de sílica gel 60G (Merck) e eluidos com tolueno:clorofórmio: acetato de etila:ácido fórmico (35:25:25:10). Após desenvolvimento do cromatograma as placas foram visualizadas sob luz ultravioleta de comprimento de onda longo (365nm) para detecção da fluorescência característica de aflatoxina B<sub>1</sub> (Lin & Dianese, 1976).

#### **4.4.2 Meio Natural (arroz)**

As três cepas produtoras de aflatoxina B<sub>1</sub> foram testadas em arroz parboilizado. A partir de cada cepa selecionada, uma suspensão de esporos foi preparada em Tween 80%. Os esporos foram contados em uma Câmara de Neubauer e o volume necessário para obter-se 10<sup>6</sup> esporos/ml foi inoculado em erlenmeyers com 15/g de meio estéril (arroz em grão a 73% de umidade). Estes foram tampados com algodão e incubados em estufa BOD nos períodos e temperaturas encontrados como melhor na produção de aflatoxina B<sub>1</sub>, nos testes dos meios sintéticos. Após este período, 30/mL de metanol a 80% foram adicionados aos erlenmeyers e as toxinas extraídas, sob forte agitação. Após a filtração do extrato, a detecção de aflatoxina B<sub>1</sub> foi realizada em CCD, com o mesmo solvente utilizado para a visualização nos meios sintéticos (Smedsgaard, 1997; Gqaleni *et al.*, 1996; Vaamonde *et al.*, 2003; Bellí *et al.*, 2004; Abranson & Clear, 1996; Leontopoulous *et al.*, 2003; Park & Bullerman, 1983; Guitakou *et al.*, 2006).

#### **4.5. Teste dos *Aspergillus* não produtores de aflatoxina B<sub>1</sub>**

Após serem encontradas as melhores condições de produção da aflatoxina B<sub>1</sub> nos meios sintéticos, foram realizados testes em 30 *Aspergillus* a princípio não produtores (Hoeltz, 2005), já testados em agar coco (Lin & Dianese, 1976). Os testes foram realizados conforme a mesma metodologia do item 4.4.1, e em seguida, as cepas testadas que deram resultado positivo para aflatoxina B<sub>1</sub>, foram confirmadas através da derivatização com ácido trifluoracético (Przybylski, 1975) e novamente testadas em agar coco.

#### **4.6 Quantificação**

As amostras a serem quantificadas foram aplicadas nas placas com 25, 20, 15 e 10/ng de padrão de aflatoxina B<sub>1</sub> e 80,60, 40 e 20/ $\mu$ l de cada amostra. As placas cromatográficas foram eluídas em clorofórmio-acetona (90:10) (Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz, 2005).

As manchas fluorescentes visualizadas sob luz UV foram submetidas à análise fotométrica fotográfica, utilizando uma câmera fotográfica OLYMPUS com detector CCD de 5.1 megapixel. Dez fotografias foram tiradas de cada amostra, sendo cinco com o padrão à esquerda e cinco com o padrão à direita.

Uma vez obtidas, as 10 imagens digitais foram tratadas com um software específico de fotometria, medindo a intensidade dentro de uma área (ou diafragma) pré-determinada.

Foram feitas então cerca de 18 medidas para cada uma das 10 fotografias, sendo calculadas as respectivas médias e desvios padrões (Apêndice1).

#### **4.7 Limite de detecção com sistema fotométrico**

Foi determinado o limite de detecção do padrão de aflatoxina B<sub>1</sub>, diminuindo o volume e conseqüentemente as concentrações aplicadas na placa cromatográfica até atingir um ponto no qual os mesmos não fossem mais visualizados sob luz ultravioleta.

## 5 Resultados e Discussão

### 5.1 Resultado encontrado através da interação das variáveis independentes (pH, temperatura e tempo de incubação)

Os três isolados analisados neste trabalho mostraram-se produtores de aflatoxina em condições diversas, como se pode ser observado na Tabela 5.

Através dos resultados obtidos, pode-se observar que em algumas das combinações testadas dois dos isolados comportaram-se da mesma maneira, produzindo aflatoxina B<sub>1</sub> nas mesmas condições de pH, tempo, temperatura, e meio de cultura (CYA, YES e Sabouraud), como é o caso do isolado A43 e A21, que produziram aflatoxina na temperatura de 20°C, com pH 4,0, tempo de incubação de 14 dias e em 25°C, com pH 5,2 e tempo de incubação de 18 dias. Apenas um dos isolados, o A46 não produziu toxina em nenhuma das combinações analisadas, quando inoculado no meio CYA. Este isolado foi também o que produziu aflatoxina em menor número de combinações.

TABELA 5. Produção de aflatoxina B1 por três diferentes isolados (A43, A46 e A21) de *Aspergillus flavus* em diferentes combinações de temperatura, pH e tempo de incubação.

	°C	pH	Tempo (Dias)	YES			CYA			SAB		
				A43	A46	A21	A43	A46	A21	A43	A46	A21
1	25	2,8	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	35	2,8	11	-	-	-	-	-	-	-	-	--
3	25	5,2	11	+	-	-	+	-	-	-	-	-
4	35	5,2	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	25	2,8	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	35	2,8	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	25	5,2	18	+	-	+	+	-	+	+	-	+
8	35	5,2	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	30	4,0	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	30	4,0	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	30	4,0	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	20	4,0	14	+	+	+	+	-	+	+	+	+
13	40	4,0	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	30	2,0	14	-	-	-	-	-	-	-	--	-
15	30	6,0	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	30	4,0	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	30	4,0	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## 5. 2. Efeito da temperatura, pH e tempo de incubação

### 5.2.1. Temperatura

#### 5.2.1.1. Temperatura de crescimento dos isolados *A.flavus*

O crescimento máximo dos três isolados nos três meios testados ocorreu nas temperaturas de 25°C e 30°C. Estes resultados conferem com os encontrados por Hussein & Brasel (2001), que determinaram a faixa ótima de temperaturas ótimas para colonização de *Aspergillus flavus* na faixa de 25 a 30°C. Já Bellí *et al.*, 2004 observaram o crescimento de alguns isolados de *Aspergillus* na faixa de temperatura de 10 a 37°C, obtendo um ótimo de crescimento destes isolados em 30 e 37°C. No caso deste experimento, a faixa foi de 20 a 40°C, mostrando que apenas poucos isolados cresceram a 40°C.

A maior esporulação dos isolados foi observada a 25°C, diferindo dos resultados encontrado por Ordaz *et al* (2003), que ao testarem algumas linhagens de *Aspergillus* em meio YCSD (YES + methylated B-cyclodextrin derivate plus sodium desoxychocolate), notaram uma redução na esporulação dos isolados na temperatura de 25°C. Para estes autores, a temperatura de 28 e 30 °C foi a ideal no que diz respeito à esporulação fúngica, conseqüentemente a melhor para realização dos testes de toxicidade destes isolados.

Os isolados testados, mostraram grandes diferenças morfológicas quando submetidos a faixa de temperatura testada, como pode ser observado na figura 1, que compara o mesmo isolado em temperaturas de 25 e 35°C.

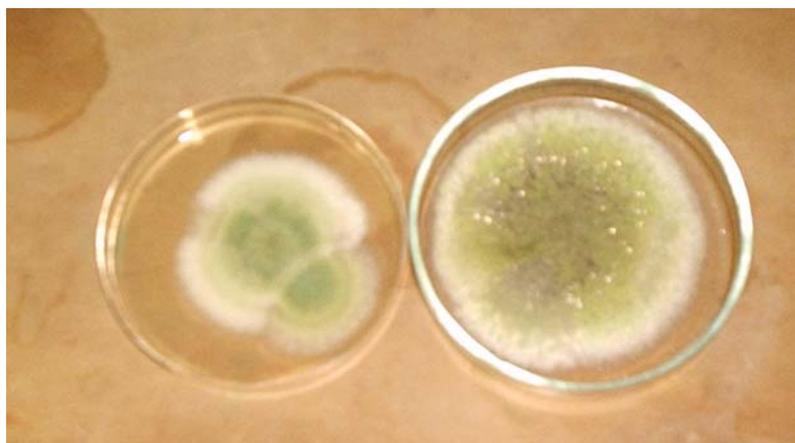


FIGURA 1. Isolado A43 em temperaturas de 35°C(E) e 25°C(D), em 11 dias de cultivo em meio YES.

#### **5.2.1.2. Temperatura para produção de aflatoxina B<sub>1</sub>**

Das cinco temperaturas analisadas (20, 25, 30, 35 e 40°C), apenas 20 e 25°C mostraram-se propícias para a produção de aflatoxina B<sub>1</sub>. Estes resultados

não conferem com a maioria dos trabalhos que estudaram temperatura para produção de aflatoxina, como é o caso de Gqaleni *et al.*, (1997) e Hussein & Brasel, (2001), que concluíram que a temperatura ótima para produção de aflatoxina foi a de 30°C.

Molina & Giamuzzi (2001) encontraram maior índice de produção de aflatoxina em superfície de agar em temperatura aproximada de 27°C.

## **5.2.2. pH**

### **5.2.2.1 pH para o crescimento fúngico**

Em pH 4,0 e 5,2, os isolados obtiveram seu maior crescimento, em qualquer um dos meios testados. Estes resultados conferem com Wheeler *et al.*, (1991), que ao testarem cepas de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, em uma faixa de pH de 2 a 11, observaram que a melhor faixa de pH para o crescimento destes isolados encontravam-se entre 4,0 e 6,0.

Em pH 2,0 e 2,8, o crescimento foi de 15 e 24%, respectivamente. Os dados mais aproximados foram ainda encontrados por Wheeler *et al.*, (1991), que observaram um índice de 25% em pH 2,0 e 30% em pH 3,0.

Do ponto de vista visual pode-se observar diferenças nas colônias de um mesmo isolado em diferentes pHs.

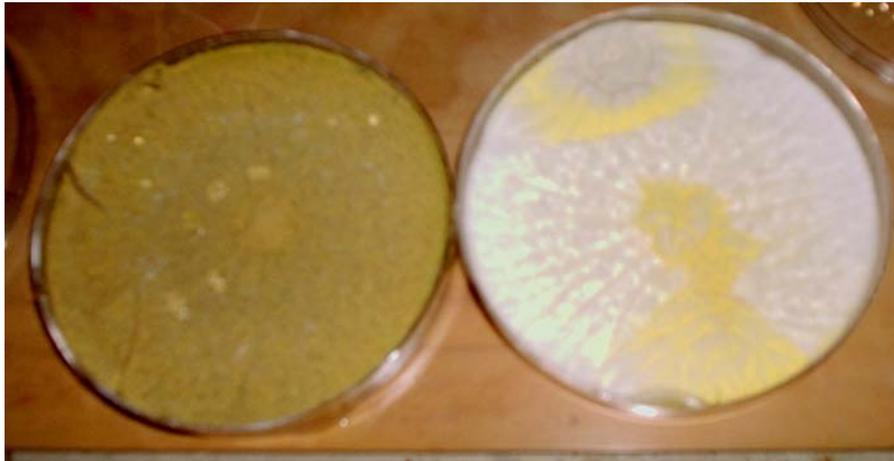


FIGURA 2: Isolado A21 em pH de 4,0(E) e 5,2(D).

#### 5.2.2.2 Produção de Aflatoxina B<sub>1</sub> em diferentes pHs

Entre os pHs testados, mostram-se propícios 4,0 e 5,2 para produção de aflatoxina B<sub>1</sub>, sendo que 5,2 foi o valor de pH mais freqüente nos experimentos. Molina & Giamuzzi (2002) ao estudarem a influência do pH na produção de aflatoxina em diferentes pHs (5,5 e 5,9), observaram que no pH 5,9 houve uma elevação na produção de aflatoxina B<sub>1</sub>.

Todos os isolados analisados, mostraram uma esporulação máxima em pH 6,0, não havendo entretanto produção de aflatoxina B<sub>1</sub> neste pH.

#### 5.2.3. Tempo de incubação

Onze dias foi o menor tempo de incubação encontrado para produção de aflatoxina B<sub>1</sub> nos experimentos testados. Quatorze e dezoito dias, porém, foram os tempos mais frequentemente encontrados. Bragulat *et al.* (2001), afirmam que sete dias de incubação foram suficientes para produção de ocratoxina (produzida por *Aspergillus parasiticus*) inoculado no meio CYA e YES.

Ordaz *et al.*, (2003), ao testarem meio YCSD (YES + methylated B-cyclodextrin derivate plus sodium desoxychocolate), chegaram a visualizar um anel fluorescente (indicador de produção de aflatoxina) em volta das colônias testadas a partir do 3º dia de incubação. Para Gqaleni *et al.* (1996) e Leontopoulos *et al.* (2003), a produção de aflatoxinas também foi observada a partir do 3º dia no meio YES.

Já Gqaleni *et al.* (1997) relataram que após 5 dias de incubação de um isolado de *Aspergillus flavus*, inoculado em meio CYA e YES, é a que foi possível à detecção de aflatoxinas, sendo que ao chegar aos 15 dias de incubação, a produção de aflatoxina obteve seu índice máximo.

Frisvard & Filtenborg (1983) relataram que muitos metabólitos secundários são detectados após 7 dias de incubação diferindo do encontrado no presente trabalho, que não obteve produção no 7º dia de incubação.

Do ponto de vista visual, o crescimento máximo dos isolados pode ser observado a partir do 11º dia de incubação, como pode-se observar na figura 3.



FIGURA 3. Isolado A43 , inoculado em meio CYA, com pH 5,2 com 11 dias de incubação.

### **5.3. Efeito dos meios de cultura sintéticos na produção de aflatoxina B<sub>1</sub>**

#### **5.3.1. Análise qualitativa**

Os três isolados testados mostraram diferenças quando inoculados nas mesmas condições, em diferentes meios. O isolado A43 que no meio YES e CYA mostrou uma produção de aflatoxina a 25°C, pH 5,2 e 11 dias, não o fez no meio Sabouraud. Neste meio, o isolado A43 necessitou de 18 dias. O isolado A46 também demonstrou uma variação, produzindo aflatoxina B<sub>1</sub> no meio YES e Sabouraud nas mesmas condições (20°C, pH 4,0 em tempo de 14 dias), não apresentando produção quando inoculado no meio CYA, o que pode sugerir uma vantagem do meio YES em relação aos demais. Smedsgaard (1997), inoculando *P. tricolor* nos meios CYA e YES, também encontraram os metabólitos secundários num tempo de incubação de 11 dias, apenas no meio YES.

Para Bragulat *et al.*, (2001) e Frisvad & Filtenborg 1983, os meios CYA e YES devem ser usados em conjunto para detecção do potencial toxigênico de fungos, por se mostrarem adequados para produção de diferentes micotoxinas.

Pode-se visualizar grandes diferenças morfológicas quando os isolados são inoculados na mesma temperatura, pH e tempo de incubação, porém em diferentes meios (Figura 4).



FIGURA 4. Isolado A46 em meio YES, CYA e Sabouraud, com tempo de incubação de 6 dias e pH 4,0.

Em um de seus estudos, Abranson & Clear (1996) ao testarem os dois meios para recuperação de micotoxinas, observaram que agar CYA foi geralmente melhor que agar YES. Isto se deve provavelmente ao fato da quantidade de sacarose contida nestes meios, (YES com 15% de sacarose e CYA com apenas 3%), podendo apresentar uma camada menos hidrofílica e mais permeável a solventes lipofílicos, permitindo uma melhor extração dos metabólitos secundários do meio CYA.

### 5.3.2 Análise quantitativa

Para a quantificação da produção de aflatoxina B<sub>1</sub> pelos 3 isolados testados, foram utilizadas as mesmas condições e o mesmo planejamento experimental tomando-se apenas as combinações que os isolados produziram toxina na análise qualitativa.

Os experimentos foram realizados em duplicata, a fim de se obter uma média (Tabela 6) e então serem aplicados no programa Statistica 7.0.

O isolado A43, em pH 5,2, temperatura de 25°C e tempo de 11 dias foi o que mostrou maior produção de aflatoxina B<sub>1</sub>, resultando numa média de 206,05

ng/UFC e no meio YES, e nas mesmas condições, quando inoculado no meio CYA, revelou uma concentração de 35,2 ng/UFC. Gqaleni *et al.* (1997) em que a maior concentração de aflatoxina produzida no meio YES, em aw de 0,95, foi de 0,226 µg/ml e 0.183 µg/ml no meio CYA. Certamente, deve-se levar em consideração, que uma das combinações analisadas neste trabalho, foi diferente da testada pelo autor em questão, que não trabalhou com pH dos meios, e sim, com atividade de água.

Em relação ao tempo de incubação, pode-se analisar que o melhor encontrado no que diz respeito a maior concentração de aflatoxina foi de 11 dias (meio YES) (206,05 ng/UFC). No meio CYA, o melhor tempo de incubação foi 18 dias (178 ng/UFC, quando o isolado A21 foi inoculado num pH de 5,2, temperatura de 25°C).

TABELA 6: Resultado quantitativo encontrado para as variáveis independentes

Isolado	°C	pH	Tempo (dias)	Diâmetro da colônia fúngica (cm)	Média da quantificação (ng)
<b>YES 43</b>	25	5,2	11	8,0	206,05
	25	5,2	18	8,0	56,65
	20	4,0	14	8,0	18,85
<b>YES 46</b>	25	5,2	11	8,0	NP*
	25	5,2	18	8,0	NP*
	20	4,0	14	8,0	Amostra não visualizada
<b>YES 21</b>	25	5,2	11	8,0	NP*
	25	5,2	18	8,0	40,0
	20	4,0	14	8,0	40,1
<b>CYA 43</b>	25	5,2	11	8,0	35,2
	25	5,2	18	8,0	68,85
	20	4,0	14	8,0	NP*
<b>CYA 46</b>	25	5,2	11	8,0	NP*
	25	5,2	18	8,0	NP*
	20	4,0	14	8,0	NP*
<b>CYA 21</b>	25	5,2	11	8,0	
	25	5,2	18	8,0	178,0
	20	4,0	14	8,0	52,58
<b>SAB 43</b>	25	5,2	11	8,0	NP*
	25	5,2	18	8,0	26,2
	20	4,0	14	8,0	73,0
<b>SAB 46</b>	25	5,2	11	8,0	NP*
	25	5,2	18	8,0	NP*
	20	4,0	14	8,0	69,3
<b>SAB 21</b>	25	5,2	11	8,0	NP*
	25	5,2	18	8,0	178,0
	20	4,0	14	8,0	38,7

NP\*: Ausência da produção nas análises qualitativas

O meio Sabouraud teve sua maior produção observada (178 ng/UFC) também pelo isolado A21, nas mesmas condições encontradas pelo meio CYA.

No meio YES, em 14 dias de incubação, a concentração de aflatoxina foi relativamente baixa em comparação com os outros dois tempos (11 e 18 dias).

No meio Sabouraud 14 dias foi o período de maior produção, enquanto que o

tempo de 18 dias, foi o que demonstrou maior concentração de aflatoxina B<sub>1</sub> pelos três isolados testados no meio CYA. Estes dados diferem dos encontrados por Gqaleni *et al.* (1996), que concluíram que a aflatoxina analisada em meio YES, foi produzida no segundo dia de incubação e atingiu sua máxima concentração de 130 µg/g depois de 15 dias; a concentração sofreu um decréscimo para 75µg/g, depois de 21 dias.

Neste trabalho as melhores temperaturas para maior produção de aflatoxina B<sub>1</sub> foram 25°C e 20°C, respectivamente. Gqaleni *et al.* (1997) concluíram que a menor concentração de aflatoxina foi produzida a 20°C e a maior concentração a 30°C, em ambos os meios.

Pode-se destacar o isolado A21, inoculado em meio CYA, com pH 5,2, temperatura de 25°C e tempo de incubação de 18 dias, como um dos exemplos no que diz respeito à diferença na quantidade de produção de aflatoxina B<sub>1</sub> para cada inóculo. Este isolado, mostrou uma relevante diferença quando analisada a duplicata separadamente. Uma das amostras mostrou uma produção de 214,9 ng e a outra 142,9 ng. O isolado A46, inoculado no meio YES mostrou produção de aflatoxina B<sub>1</sub> nas análises qualitativas, porém não produziu nas quantitativas. Estes dados acima citados, indicam que cada inóculo do mesmo isolado, produz quantidades diferentes de aflatoxina.

Todas as médias nestes experimentos, foram aplicadas no programa estatístico STATISTICA 7.0, resultando em 4 gráficos de Pareto (Apêndice 2).

O isolado A21, inoculado em meio YES e no meio CYA (Apêndice 2.1), mostrou significância positiva no que diz respeito ao pH, em que o valor de p

foi menor que 0,5. Isto revela, que com o aumento do pH nesta combinação de fatores, pode haver um aumento na produção de aflatoxina B<sub>1</sub>.

O isolado A43 e A21, inoculados no meio CYA (Tabela 8 e Figura 6), mostrou que o efeito do pH foi significativo negativamente, e o da temperatura, significativamente positivo. Isto sugere que reduzindo o pH e maior tempo de incubação, pode haver um aumento da produção de aflatoxina B<sub>1</sub>.

O restante das combinações (A43 no YES, A43 no Sabouraud, A46 no Sabouraud, A43 no Sabouraud) não apresentou efeitos significativos para quantificação de aflatoxina, indicando que as mesmas nesta faixa estudada, não afetam significativamente a resposta (Tabelas 11, 12 e 13).

#### 5.4 Limite de detecção

Foram aplicados 8/uL, 6/uL, 4/uL e 2/uL na placa cromatográfica. Foi visualizado sob luz UV até 2 uL, ou seja, 1 ng.



FIGURA 5: Placa cromatográfica evidenciando com a seta, a mancha que representa 2µl de padrão de aflatoxina B<sub>1</sub>.

### 5. 5 Teste dos isolados não produtores

Trinta isolados, a principio não produtores (Hoeltz, 2005), foram testados nas melhores condições encontradas para produção de aflatoxina B<sub>1</sub>, nos três meios estudados. Entre estes, 12 produziram aflatoxina B<sub>1</sub> (Tabela 14). Nestes testes, pode-se verificar que 10 isolados (1,3,4,5,7,9,12,8,10,11) mostraram-se produtores nas mesmas condições (20°C, pH 4,0 e 14 dias), sendo que 3 destes isolados produziram em meio CYA (8,10,11) e 4 no meio YES (5,7,9 e 12). Três isolados (1,3 e 4) mostraram-se produtores nas condições de 20°C, pH 4,0 em 14 dias, tanto no meio CYA como no meio YES (isolados 1, 3 e 4). Dois dos isolados (2 e 6), mostraram-se produtores nas condições de 25°C, pH 5,2 com tempo de 18 dias, tanto no meio CYA, quanto no meio YES, além do isolado 2, ainda ter produzido aflatoxina B<sub>1</sub> em 25°C, pH 5,2 e tempo de 11 dias de incubação no meio YES.

TABELA 7: Teste dos isolados a principio não produtores nas melhores condições e meios encontrados

Código da condição testada	meio	pH	°C	Tempo	Número dos isolados que produziram AFB <sub>1</sub>
A	YES	5,2	25	11	2
B	YES	5,2	25	18	2 e 6
C	YES	4,0	20	14	1,3,4,5,7,9,12
D	CYA	5,2	25	11	-
E	CYA	5,2	25	18	2 e 6
F	CYA	4,0	20	14	1,3,4,8,10,11
G	SAB	5,2	25	18	2
H	SAB	4,0	20	14	4

Um dado interessante, é que os isolados que se mostraram produtores em pH 4,0 e temperatura de 20°C, não se mostraram produtores quando inoculados em pH 5,2 e temperatura de 25°C.

O meio Sabouraud foi o que se revelou menos vantajoso em relação aos demais, pois apenas 2 isolados testados revelaram-se produtores de aflatoxinas (isolado 2 e isolado 4).

Estes dados revelam uma ligeira vantagem do meio YES em relação aos demais, devido ao fato deste meio mostrar um maior número de isolados que produziram aflatoxina B<sub>1</sub> quando inoculado neste meio, além de um maior número de condições encontradas (25°C, pH5,2, 11 dias; 25°C, pH 5,2, 18 dias e 20°C, pH 4,0 e 14 dias).

Ordaz *et al.* (2003), ao testarem um novo meio (CYA e YES+ 0,6% de YCSD) para detecção do potencial aflatoxigênico, verificaram que todos os isolados inicialmente toxigênicos produziram um anel fluorescente sob luz UV. Após estes resultados, vinte e oito isolados não aflatoxigênicos também foram testados neste meio, e nenhum produziu o anel fluorescente. A análise das aflatoxinas por HPLC também foram negativas.

Diferentes linhagens de *A. flavus* podem ser produtoras de aflatoxinas em diferentes proporções quando cultivadas em condições similares (Hussein *et al.*, 2002).

Segundo Vaamonde *et al.* (2003), dados de diferentes áreas geográficas demonstram grande variedade do potencial de *Aspergillus* produtores de micotoxinas.

Os isolados anteriormente cotados como não aflatoxigênicos (Hoeltz, 2005) que se mostraram produtores nos meios e condições testadas, foram novamente testados em agar coco. Oito isolados continuaram apresentando resultado negativo neste meio (Tabela 8).

TABELA 8. Teste dos não aflatoxigênicos no agar coco

Isolado produtor no CYA, YES e Sabouraud	Teste no agar coco
A12	-
A14	-
A19	-
A20	-
A24	-
A26	-
A27	-
A65	+
A36	+
A67	+
A48	-
A55	+

Estes dados conferem com Taniwaki (1996) que cita o meio agar coco desenvolvido por Lin & Dianese (1976), como um meio simples para a seleção de *A.flavus* e *A.parasiticus*, produtores de aflatoxinas, porém, alguns falsos resultados negativos podem ser obtidos.

#### 5. 6. Teste feito no arroz

As melhores condições de temperatura e tempo de incubações encontradas para produção de aflatoxina testados com os meios sintéticos foram aplicadas nos testes com arroz (25°C/11 dias, 25°/18 dias e 20°C/14 dias).

Inicialmente, os fungos produtores foram retirados de pré-inóculos feitos em agar sabouraud. De acordo com estes testes, apenas a cepa A43 mostrou-se produtora de aflatoxina B<sub>1</sub>, no tempo de 18 dias, em temperatura de 25°C. Devido a estes resultados não se mostrarem satisfatórios, foi realizado um novo teste. As cepas produtoras foram inoculadas nos meios CYA e YES, onde ficaram incubadas durante 7 dias (pré-inóculo). A contagem de esporos foi feita para uma concentração de 10<sup>6</sup> /mL e em seguida, inoculadas nos erlemeyers contendo as amostras de arroz a serem analisadas. A partir deste teste, foi verificado que todas as cepas retiradas do pré-inóculo em meio YES e inoculadas no arroz, em temperatura de 25°C/18 dias e 20°C/14 dias, mostraram-se produtoras de aflatoxina B<sub>1</sub> (Tabela 16).

TABELA 9. Teste dos isolados produtores de aflatoxina retirados dos pré-inóculos (CYA e YES) inoculados no arroz

	A43		A46		A21	
	CYA	YES	CYA	YES	CYA	YES
25°C/11 dias	-	-	-	-	-	-
20°C/14dias	-	+	-	+	-	+
25°C/18 dias	+	+	+	+	-	+

Os isolados A43 e A21 retirados do pré-inóculo CYA, se mostraram produtores, porém, em apenas uma condição de cultivo (25°C em 18 dias). O isolado A46, novamente se mostra deficiente em relação à produção de aflatoxina quando inoculado no meio CYA. Esse dado confere com Park e Bullerman (1983) que após estudarem inóculo de *Aspergillus flavus* e *parasiticus* em arroz,

concluram que a produção de AFB<sub>1</sub> depende acima de tudo da linhagem isolado fúngico.

O meio YES, novamente levou uma vantagem em relação ao meio CYA, uma vez que revelou a produção de aflatoxina B<sub>1</sub> pelos três isolados testados, além de mais de uma condição (25°/18 dias e 20°C/14 dias), quando utilizado como pré-inóculo.

O arroz se mostrou um meio utilizável para testes de potencial toxigênico devido ao fato de que todos isolados conhecidamente aflatoxigênicos utilizados neste experimento, produziram aflatoxina. De acordo com Raybaudi *et al.*(2000), em um estudo de potencial toxigênico, realizado com isolado de *Aspergillus flavus* e *parasiticus*, cerca de 37% dos isolados apresentaram produção de aflatoxinas em arroz, enquanto somente cerca de 4% dos testados produziu aflatoxinas em agar coco.

Bresler *et al.* (1995) inocularam espécies de *Aspergillus* em arroz, e constataram que 4 de 34 isolados de *A. flavus* foram produtores de aflatoxinas, e 6 de 12 *A. parasiticus* se mostraram aflatoxigênicos neste meio. Estes concluem, que fungos toxigênicos podem ser bastante encontrados, mas que a produção de micotoxinas pode aparecer somente durante uma prolongada estocagem de produtos contaminados.

As temperaturas de 20°C e 25°C mostraram-se boas para produção de aflatoxina B<sub>1</sub> nas amostras de arroz analisadas neste trabalho. Park e Bullerman (1983) observaram que a maior produção de aflatoxina produzida por *A.flavus*, foi a 15°C, com pequena diferença a 18°C e uma menor quantidade de aflatoxina em temperatura cíclica (5-25°C) e também em 25°C.

No que se refere ao crescimento fúngico no arroz analisado, podemos perceber que a partir do 2º dia de incubação em qualquer uma das temperaturas testadas, já houve um crescimento superficial destes bolores, conferindo novamente com Park e Bullerman (1983), que também notaram um crescimento de *Aspergillus flavus* a partir do segundo dia de incubação, na temperatura de 25°C.

No 11º dia, o crescimento atingiu seu máximo (Figura 10). A esporulação dos isolados foi notada a partir do 7º dia (Figura 11).



FIGURA 6: isolado A21 inoculado em arroz com 11 dias de incubação, a 25°C.



FIGURA 7: isolado A43 inoculado no arroz com 7 dias de incubação, a 25°C.

Estes resultados indicam também, a importância que o meio YES exerce sobre os isolados fúngicos em relação à esporulação fúngica. Park e Bullerman (1983), constataram que o crescimento de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* em agar BDA não foi bom, pois não houve esporulação suficiente. A partir deste resultado, antes de inocularem os esporos destes isolados em arroz, fizeram o crescimento destes isolados em meio YES, onde a esporulação foi notoriamente boa para contagem de esporos e inoculação no meio natural.

Bu'Lock, (1965) *apud* Park & Bullerman (1983), afirmam que o mecanismo de esporulação tem uma conexão com metabólitos secundários.

Ainda para Park & Bullerman (1983), o tempo requerido para iniciar o crescimento e esporulação de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* em amostras de arroz foi afetado pela temperatura, substrato e linhagem do fungo. O

início do crescimento ocorreu mais rápido a 25°C, seguido de 18°C, da temperatura cíclica (5-25°C) e 15°C. Estes autores concluíram que a temperatura foi um fator determinante para o crescimento e esporulação fúngica.

## 6 Conclusões

As melhores combinações para detecção do potencial toxigênico em meios sintéticos foram pH 4,0 e 5,2, temperatura de 20 e 25°C e o tempo de incubação de 11, 14 e 18 dias.

O meio Sabouraud foi o menos eficiente para este tipo de detecção.

O isolado A43 mostrou-se o maior produtor de aflatoxina, enfatizando a teoria de que cada cepa fúngica tem comportamento diferente nas mesmas condições de cultivo, podendo ser devido à diferença genética que cada isolado possui.

O método da camada delgada mostrou-se muito eficiente para detecção de aflatoxina B<sub>1</sub>, inclusive, podendo gerar resultados muito satisfatórios no que diz respeito a análise quantitativa dos mesmos.

A fotometria fotográfica mostrou ser uma ferramenta eficiente na análise quantitativa de metabólitos secundários fluorescentes, em especial, aflatoxina B<sub>1</sub>.

Os testes com arroz não se mostraram melhores que os testes feitos com os meios sintéticos.

A detecção do potencial toxigênico de isolados de *Aspergillus flavus* utilizando o meio agar coco, não é adequado pois algumas cepas produtoras de toxinas não foram identificadas.

O meio YES revelou-se o melhor para detecção e produção de aflatoxina B<sub>1</sub>, podendo ser utilizado como alternativa ao agar coco na detecção do potencial toxigênico de isolados de *Aspergillus flavus*.

## 7 Referências Bibliográficas

ABRANSON, D.; CLEAR, R.M. A convenient method for assessing mycotoxin production in cultures of *Aspergilli* and *Penicillia*. **Journal of Food Protection**, Boston, v.59, p.142-144,1996.

BLANK, K. A. et al. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **Journal of Stored Products Research**, Vancouver, v.41, p.513-527, 2005.

BELLÍ, N. et al. Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.96, p.19-27, 2004.

BIANCHINI,A. **Estudo Comparativo entre Manejos de Secagem e Armazenamento de Arroz na Incidência de Fungos Toxigênicos e Micotoxinas**. 2003. 103f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

BOEIRA, L.S. et al. Influence of cultural conditions on sensivity of brewing yeasts growth to *Fusarium* mycotoxins zearalenone, deoxynivalenol and fumonisin B1. **International Bioteriation & Biodegradation**, London, v.50, p. 69-81, 2002.

BRAGULAT,M.R. et al. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. **International Food of Journal Microbiology**, Amsterdam, v.71, p.139-144, 2001.

BRESLER, G. et al. Mycotoxin-production potential of fungi isolated from amaranth seeds in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.25, p. 101-108, 1995.

CALDAS, E. D. et al. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e risco para saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n.3, p. 319-323, 2002.

DANTIGNY, P. et al. Basis of predective mycology. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.100, p.187-196, 2005.

D'MELLO, J.P.F.; MACDONALD, A. M. C. Mycotoxins. **Animal Feed Science Technology**, London, v.69, p.155-166, 2002.

DOTTORI, H. A. **Curso de Astronomia**. Disponível em: <http://www.if.ufrgs.br/tiodottori>. Acesso em 25/02/2007.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.

FILTENBORG, O. et al. Simple screening method for producing intracellular mycotoxins in pure cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, Vancouver, p.581-585, 1983.

FILTENBORG, O. et al. Moulds and food spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.33, p.85-102, 1996.

FRISVARD, J.C.; FILTENBORG, O. Classification of Terverticillate Penicillia based on profiles of mycotoxin and other secondary metabolites. **Applied and Environmental Microbiology**, Vancouver, p. 1301-1310, 1983.

GIRAY, B. et al. Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey. **Food Control**, Paris, v.18, p. 23-29, 2007.

GOCK, M.A. et al. Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam v.248, p. 11-19, 2003.

GONÇALVEZ, E. et al. Análises de micotoxinas no instituto biológico de 1989 a 1999. **Biológico**, São Paulo, v. 63, p.15-19, 2001.

GUITAKOU, S. et al. Study of aflatoxin B1 and ochratoxin A production by natural microflora and *Aspergillus parasiticus* in black and green olives of Greek origin. **Food Microbiology**, London, v. 23, p. 612-621, 2006.

GQALENI, N. et al. Co-production of aflatoxin and cyclopiazonic acid in isolates of *Aspergillus flavus*. **Food Additives and Contaminants**, Sidney, v.13, p.677-685, 1996.

GQALENI, N. et al. Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface Agar culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Vancouver, v.63, p.1048-1053, 1997.

HERMANNNS, G. et al. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v.26, n.1, p.7-10, 2006.

HINOJO, M.J. et al. Fumonisin production in rice cultures of *Fusarium verticillioides* under different incubation conditions using an optimized analytical method. **Food Microbiology**, London, v. 23, p. 119-127, 2006.

HORN, B.W. et al. Inhibition of aflatoxin B1 production by *Aspergillus parasiticus* using nonaflatoxigenic strains: role of vegetative compatibility. **Biological Control**, Lyon, v.17, p.147-154, 2000.

HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxin on humans and animals. **Toxicology**, Amsterdam, v. 167, p. 101-134, 2001.

HOELTZ, M. **Estudo da Influência de Manejos Pós-Colheita na Incidência de Fungos e Micotoxinas no Arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2005. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

IARC-International Agency for Research on Câncer. **Some Naturally Occurring Substance**: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Lyon: OMS, 2002.

ICMSF- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganisms in Foods**. London: Academic Press, 1996. p.347-381.

IQBAL, A. A. et al. Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts. **Food Chemistry**, London, p.699-707, 2006.

JIMÉNEZ, M. et al. Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.29, p. 417-421, 1996.

KAAYA,A.N. et al. The effect of storage time and agroecological zone on mould incidence and aflatoxin contamination of maize from traders in Uganda. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v.110, p. 217-223, 2006.

KOKKONEN, M. et al. The effect of substrate on mycotoxin production of selected *Penicillium* strains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 56, p.67-74, 2004.

LEONTOPOULOS, D. et al. Black olives as substrate for *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B1 production. **Food Microbiology**, London, v. 20, p.119-126, 2003.

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

LIN, Y.C. et al. Influence of temperature cycling on the production of aflatoxins B1 and G1 by *Aspergillus parasiticus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Vancouver, p. 333-336, 1980.

MALLMANN, C.A. **Atividade de água**. Laboratório de análises Micotoxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria. Disponível em: <http://www.ufsm.br/lamic>. Acesso em: 05/07/2006.

MARKLINDER, I. et al. Consumer's ability to discriminate aflatoxin-contaminated Brazil nuts. **Food Additives and Contaminants**, Sidney, v. 22, p. 54-64, 2005.

MATEO, J.J. et al. Accumulation of type A trichothecenes in maize, wheat and rice by *Fusarium sporotrichioides* isolates under diverse culture conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 72, p.115-123, 2002.

MEDINA, A. et al. Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v.108, p.196-203, 2006.

MÉTODOS Físico-Químicos para Análise de Alimentos. Edição IV. Brasília : Instituto Adolfo Lutz, 2005.

MOLINA, M.; GIAMUZZI, L. Modelling of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. **Food Research International**, London, v.35, p.585-594, 2002.

MOSS, M. Mycotoxin review- *Aspergillus* e *Penicillium*. **Mycologist**, Cambridge, v16, n.3, 2002.

NIELSEN, K.F. et al. Mould growth on building materials under low water activities. Influence of humidity and temperature on fungal growth and secondary metabolism. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v.54, p. 325-336, 2004.

OBRIAN, G.R. et al. Identification of genes differentially expressed during aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Fungal Genetics and Biology**, Madrid, 39, p.118-127, 2003.

ORDAZ, J.J. et al. Development of method for direct visual determination of aflatoxin production by colonies of the *Aspergillus flavus* group. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.83, p.219-225, 2003.

PARDO, E. et al. Modeling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* as affected by water activity and temperature on barley-based medium. **Food Microbiology**, London, v. 21, p. 267-274, 2004.

PARK, K.Y.; BULLERMAN, L.B. Effect of cycling temperatures on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in rice and cheddar cheese. **Journal of Food Science**, Chicago, v.48, p.889-896, 1983.

PATERSON, R.R.M, et al. Solutions to *Penicillium* taxonomy crucial to mycotoxin research and health. **Research Microbiology**, Cambridge, v.155, p. 507-513, 2004.

PILDAIN, M.B. et al. Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.93, p. 31-40, 2004.

PRYBYLSKI, W. Formation of aflatoxin derivatives on thin layer chromatographic plates. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 58, n.1, p.163 -164, 1975.

RAYBAUDI, R. et al. Incidence of aflatoxin in corn as related to levels of *Aspergillus flavus/parasiticus* and moisture content. In: INTERNATIONAL IUPC SYMPOSIUM ON MYCOTOXIN AND PHYCOTOXINS, 10., 2000, Guarujá. [Guarujá, 2000].

RODRIGUES, M.I. **Planejamento de Experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. Campinas. SP: Casa do Pão, 2005.

RUSTON, I.Y.S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods, **Food Chemistry**, London, v.59, p. 57-67, 1997.

SALEEMULLAH, A.I. et al. Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts. **Food Chemistry**, London, v. 98, p. 699-703, 2006.

SAMSON R.A.; FRISVAD, J.C. New taxonomic Approches for identification of food-borne fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v.32, p. 99-116, 1993.

SMEDSGAARD, J. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. **Journal Of Chromatografy A**, Amsterdam, v.706, p.264-270, 1997.

SWEENEY, J.; DOBSON, A.D.W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 43, p. 141-158, 1998.

TANIWAKI, M.H. Meios de cultura para contagem de fungos em alimentos. **Boletim SBCTA**, Campinas, v.30, n.2, p.132-141, 1996.

TANIWAKI, M.H.: SILVA, N. **Fungos em Alimentos: ocorrência e detecção**. Campinas: Núcleo de Microbiologia do ITAL, 2001. 82p.

VAAMONDE, G. et al. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *flavi* from different substrates in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 88, p.79-84, 2003.

WALKER, E.N. **CCD photometry**. London: British Astronomical Association, 2004. Disponível em: [http:// www.britastro.org](http://www.britastro.org). Acesso em: 24/02/2007.

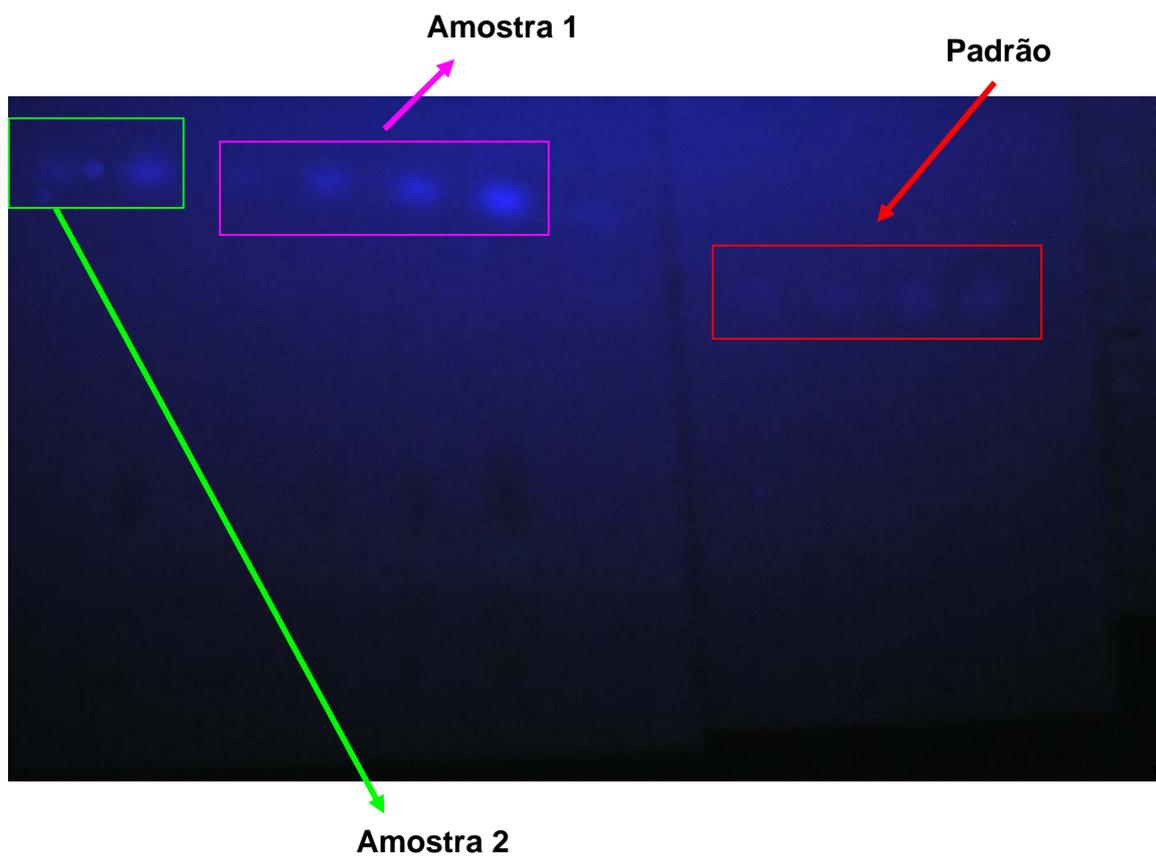
WEELER, K.A. et al. Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.12, p.141-150, 1991.

WICKLOW, D.T. et al. Use of aflatoxin-producing ability medium to distinguish aflatoxin-producing strains os *Aspergillus flavus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Amsterdam, v.33, 697-699, 1981.

## 8 Apêndice

### Apêndice 1:

Isolado A43, pH 5,2, temperatura de 25°C, tempo de incubação de 11 dias, em meio YES, aplicados em placa cromatográfica e fotografado sob luz UV.



<b>Foto 39</b>		<b>Área: 3816</b>		
<b>Padrão</b>		<b>Amostra</b>		<b>Duplicata</b>
25 µl	30	80µl	135,5	98,5
20 µl	24	60 µl	81	51,5
15 µl	17	40 µl	56	
10 µl	16	20µ l	11,5	

<b>Foto 40</b>		<b>Área: 4016</b>		
<b>Padrão</b>		<b>Amostra</b>		<b>Duplicata</b>
25 µl	28,5	80µl	130,5	90
20 µl	22,3	60 µl	74	41,5
15 µl	14,9	40 µl	52	
10 µl	14	20µ l	17,5	

**Foto 41** **Área: 45,28**

<b>Padrão</b>		<b>Amostra</b>		<b>Duplicata</b>
25 µl	44	80µl	148	158
20 µl	39,5	60 µl	122	65
15 µl	30,5	40 µl	97	
10 µl	26	20µ l	27,5	

**Foto 42** **Área: 4665**

<b>Padrão</b>		<b>Amostra</b>		<b>Duplicata</b>
25 µl	48	80µl	165,5	142
20 µl	39,5	60 µl	123	63,5
15 µl	22,5	40 µl	91,5	
10 µl	22	20µ l	23,5	

**Foto 43** **Área: 4528**

<b>Padrão</b>		<b>Amostra</b>		<b>Duplicata</b>
25 µl	45	80µl	138,5	153
20 µl	42	60 µl	114,5	164,5
15 µl	25,5	40 µl	93,5	
10 µl	23	20µ l	29,5	

Todas as áreas foram divididas pela menos área (3816) e depois de todos os valores calculados, foi feita uma média e calculado e o desvio padrão:

<b>Padrão</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Amostra</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Média da Duplicata</b>	<b>Desvio padrão</b>
25 µl	34,1	±66	80µ	126,6	±8,7	112,1	±20,5
20 µl	29,4	±5,9	60 µl	89,9	±14,5	46,7	±7,8
15 µl	19,5	±19,5	40 µl	67,7	±14,7		
10 µl	17,6	±17,6	20µ l	19,0	±5,3		

A seguir, foi feita uma curva padrão com os valores do padrão, nos quais o Coeficiente de correlação foi de 0,9885 a declividade da reta foi de 1,35 e o ponto de intercepção foi de 1,18.

Foi então realizada também as leituras da amostra na curva padrão, que revelaram deram os seguintes valores:

<b>Amostra 1</b>	<b>Valor</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Valor</b>
25 µl	92,7 ng	80 µl	82,1 ng
20 µl	65,6 ng	60 µl	33,6 ng
15 µl	49,3 ng		
10 µl	13,1 ng		

Finalmente foi realizada uma regra de três com os valores encontrados da amostra na curva padrão e a quantidade em que cada amostra foi diluída (200µl)

$$\begin{array}{l} 80 - 92,7\text{ng} \\ 200 - x \\ =231,75 \text{ ng} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} 60 - 65,6 \\ 200 - x \\ =218,7 \end{array}$$

$$\begin{array}{l} 40 - 49,3 \\ 200 - x \\ =246,5 \end{array}$$

$$\begin{array}{l} 20 - 13,1 \\ 200 - x \\ =131 \text{ ng} \end{array}$$

A média de todos esses valores foi de **206,08 ng**

\*Duplicata

$$\begin{array}{l} 80 - 82,1 \\ 200 - x \\ =\mathbf{206,0 \text{ ng}} \end{array}$$

**E finalmente o valor final foi a media dos dois valores: 206,3 ng**

## APÊNDICE 2:

### Efeito das variáveis para amostra A21

	Efeito	Erro padrão	t (7)	p
Mean/Interc.	275,671	512,3747	0,53803	0,607234
(1)tempo (L)	6,443	9,9937	0,64466	0,539688
tempo(Q)	368,478	553,4152	0,66583	0,526847
<b>(2)pH(L)</b>	<b>18,742</b>	<b>9,2657</b>	<b>2,02275</b>	<b>0,082794</b>
pH (Q)	286,860	553,3347	0,51842	0,620144
(3)tempo(L)	-6,982	12,6595	0,55154	0,598422
(3)tempo (L)	-87,842	962,0024	0,09131	0,929803
(3)tempo (L)	-8,642	9,2312	0,93615	0,380358
(3)tempo (L)	-15,694	10,9682	1,43088	0,195553
(3)tempo (L)	9,576	9,5194	1,00597	0,347929

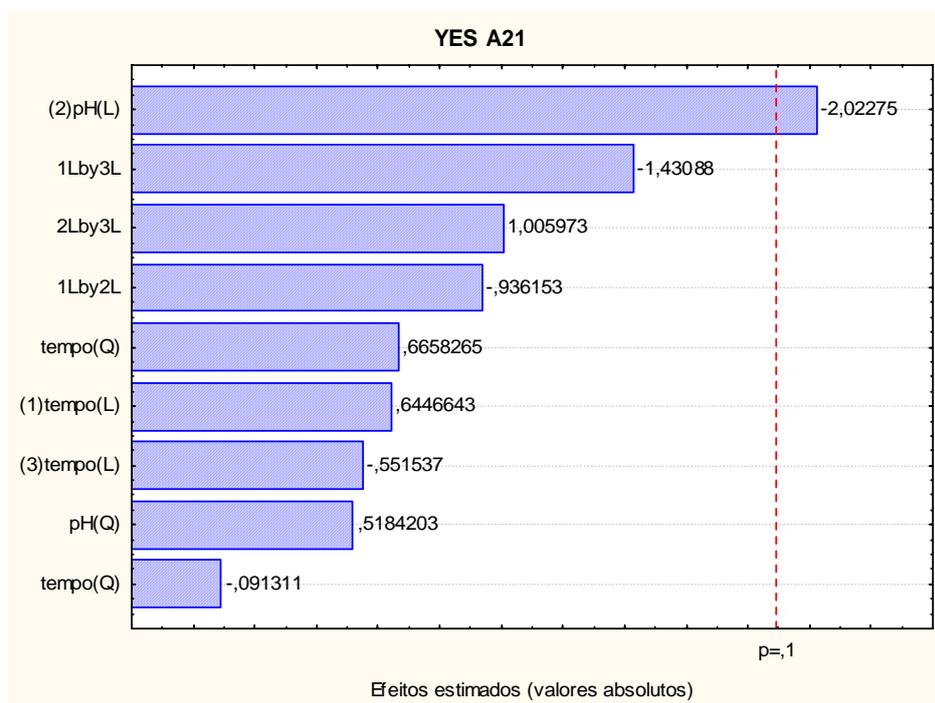


Gráfico de Pareto representado a amostra YES A21.

## Efeito das variáveis para a amostra CYA A43

	Effect	Std. Err	t (7)	P
Mean/Interc.	137,170	388,3918	0,35317	0,734355
(1)temp (L)	20,628	7,5754	2,72305	0,029635
tempo(Q)	-13,733	419,5014	-0,03274	0,974798
(2)pH(L)	-20,271	7,0236	-2,88606	0,023448
pH (Q)	76,312	419,4403	0,18194	0,860789
(3)tempo(L)	-6,753	9,5962	-0,70370	0,504349
tempo (Q)	-321,248	729,2198	-0,44054	0,672832
1L by 2L	-20,094	6,9975	-2,87154	0,023939
1L by 3L	-11,964	8,3141	-1,43901	0,193321
2 L by 3L	11,354	7,2159	1,57350	0,159601

:

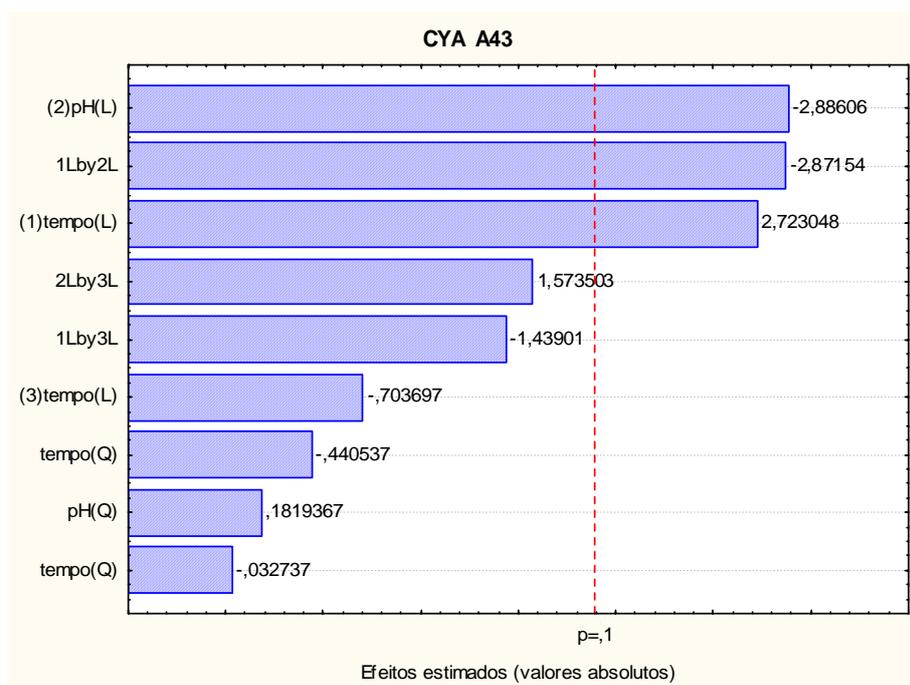


Gráfico de Pareto representado a amostra CYA A43.

## Efeitos das variáveis para amostra CYA A21

	Efeito	Std. Err	t (7)	p
Mean/Interc.	137,170	388,3918	0,35317	0,734355
(1)temp (L)	20,628	7,5754	2,72305	0,029635
tempo(Q)	-13,733	419,5014	-0,03274	0,974798
<b>(2)pH(L)</b>	<b>-20,271</b>	<b>7,0236</b>	<b>-2,88606</b>	<b>0,023448</b>
pH (Q)	76,312	419,4403	0,18194	0,860789
(3)tempo(L)	-6,753	9,5962	-0,70370	0,504349
tempo (Q)	-321,248	729,2198	-0,44054	0,672832
1L by 2L	-20,094	6,9975	-2,87154	0,023939
1L by 3L	-11,964	8,3141	-1,43901	0,193321
2 L by 3L	11,354	7,2159	1,57350	0,159601

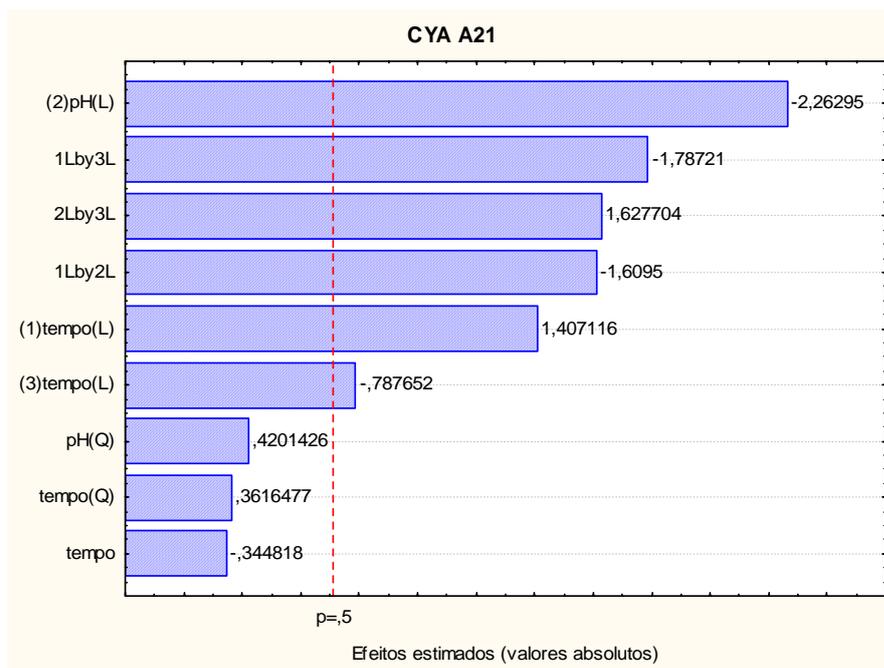


Gráfico de Pareto representado a amostra CYA 21.

## Efeito das variáveis para amostra SAB A 21

	Efeito	Std. Err	t (7)	p
Mean/Interc.	55,640	1079,323	0,05155	0,960327
(1)temp (L)	33,969	21,052	1,61359	0,150650
tempo(Q)	311,776	1165,775	0,26744	0,796838
<b>(2)pH(L)</b>	<b>-44,983</b>	<b>19,518</b>	<b>-2,30467</b>	<b>0,054614</b>
pH (Q)	449,710	1165,606	0,38582	0,711090
(3)tempo(L)	-22,589	26,667	-0,84708	0,424960
tempo (Q)	-841,079	2026,469	-0,41505	0,690533
1L by 2L	-34,752	19,446	-1,78714	0,117066
1L by 3L	-43,188	23,105	-1,86922	0,103796
2 L by 3L	35,893	20,053	1,78992	0,116592

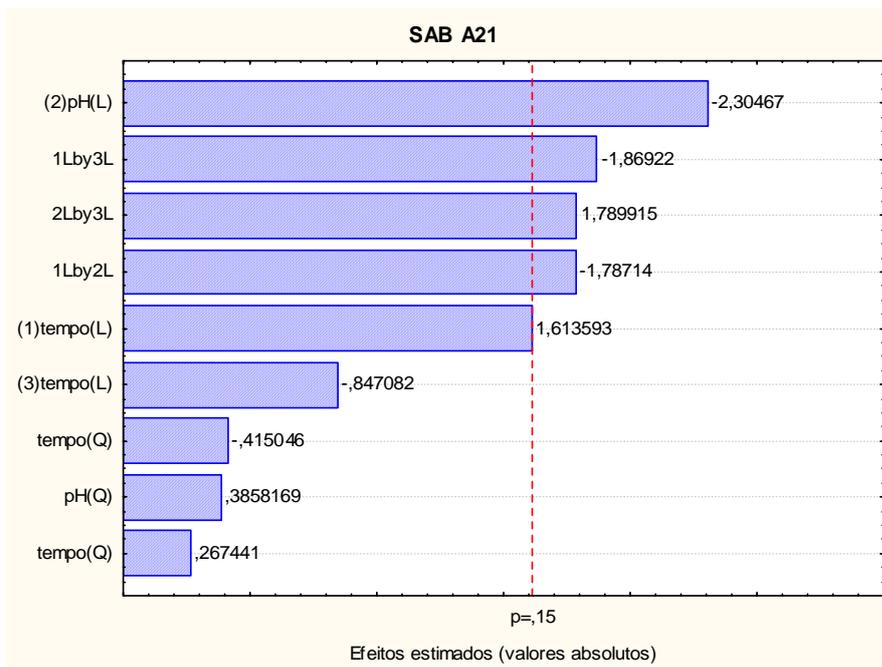


Gráfico de Pareto representado a amostra SAB 21.

## Efeitos das variáveis para amostra YES A43

	Efeito	Std. Err	t (7)	p
Mean/Interc.	-329,993	1643,358	-0,20080	0,846562
(1)temp (L)	37,222	32,053	1,16127	0,283598
tempo(Q)	229,555	1774,989	0,12933	0,900736
(2)pH(L)	-43,580	29,718	-1,46644	0,185960
pH (Q)	42,375	1774,731	0,02388	0,981617
(3)tempo(L)	6,629	40,603	0,16326	0,874923
tempo (Q)	437,169	3085,466	0,14169	0,891319
1L by 2L	-39,303	29,608	-1,32748	0,226006
1L by 3L	10,051	35,179	0,28571	0,783373
2 L by 3L	-12,159	30,532	-0,39824	0,702322

## Efeitos das variáveis para a amostra SAB A46

	Efeito	Std. Err	t (7)	p
Mean/Interc.	-724,241	621,213	-1,16585	0,281858
(1)temp (L)	-7,457	12,117	-0,61548	0,557713
tempo(Q)	701,103	670,971	1,04491	0,330801
(2)pH(L)	-15,525	11,234	-1,38199	0,209467
pH (Q)	402,704	670,874	0,60027	0,567244
(3)tempo(L)	-1,752	15,349	-0,11416	0,912318
tempo (Q)	362,956	1166,350	0,31119	0,764719
1L by 2L	2,528	11,192	0,22586	0,827766
1L by 3L	-9,184	13,298	-0,69063	0,512039
2 L by 3L	-0,992	11,542	-0,08593	0,933927

