



MARIANA LINO DE SOUZA

**BIOCONTROLE *IN VITRO* DE FUNGOS
TOXIGÊNICOS UTILIZANDO LEVEDURAS
ISOLADAS DO CAFÉ E DO CACAU**

LAVRAS – MG

2014

MARIANA LINO DE SOUZA

**BIOCONTROLE *IN VITRO* DE FUNGOS TOXIGÊNICOS
UTILIZANDO LEVEDURAS
ISOLADAS DO CAFÉ E DO CACAU**

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.

Orientadora

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista

Coorientadores

Dr. Luís Roberto Batista

Dr. Whasley Ferreira Duarte

LAVRAS – MG

2014

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

Souza, Mariana Lino de.

Biocontrole *in vitro* de fungos toxigênicos utilizando leveduras isoladas do café e cacau/ Mariana Lino de Souza. – Lavras : UFLA, 2014.

123 p. : il.

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

Orientador: Cristina Ferreira Silva e Batista.

Bibliografia.

1. Biocontrole. 2. Fungos toxigênicos. 3. Ocratoxina A. 4. *Aspergillus*. 5. *Pichia*. 6. *Debaryomyces*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.96

MARIANA LINO DE SOUZA

**BIOCONTROLE *IN VITRO* DE FUNGOS TOXIGÊNICOS
UTILIZANDO LEVEDURAS
ISOLADAS DO CAFÉ E DO CACAU**

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.

Dr. Luís Roberto Batista	UFLA
Dr. Whasley Ferreira Duarte	UFLA
Dr. Giuliano Elias Pereira	EMBRAPA

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista
Orientadora

**LAVRAS – MG
2014**

*Aos meus pais, João e Angela;
As minhas irmãs, Roseli, Marli e Eliana;
Ao meu grande amor e companheiro, Brayan,
Pela compreensão, dedicação, incentivo, e imenso amor...*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, João e Angela, que sempre se sacrificaram e proporcionaram a suas filhas a possibilidade de obter uma educação mais aprimorada. Pessoas que me incentivaram, acreditaram e apoiaram minhas decisões e estiveram presentes em minha vida. Obrigada pelo imenso amor. Vocês são exemplos de vida.

As minhas irmãs, Roseli, Marli e Eliana, por todo incentivo, estímulo, carinho e por estar sempre ao meu lado, sendo fonte de inspiração para muitas das minhas decisões.

A todos os meus familiares, obrigada pelo carinho e apoio.

Ao Brayan, pelo companheirismo, paciência, conselhos. Obrigada por sempre apoiar minhas decisões e estar ao meu lado mesmo havendo certa distância física.

A Sirlei Souza, minha grande amiga, pela ajuda, força e conselhos.

A Maria Luiza, pela ajuda e acompanhamento em algumas etapas do experimento.

À professora Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista, agradeço pela confiança e pelos ensinamentos. Por ter me proporcionado percorrer novos caminhos, com valiosas experiências, que levarei comigo por onde passar. Agradeço pela dedicação em me orientar, pela paciência em todos os momentos, por transmitir seus conhecimentos e pelo exemplo que passa como professora e pesquisadora.

Ao professor Dr. Luís Roberto, pelos ensinamentos transmitidos e conselhos.

Ao Dr. Whasley, pela atenção, incentivo e disponibilidade.

À Dra. Carla Ávila, pela ajuda na interpretação dos dados estatísticos.

À Dra. Cristina, ao Dr. Luís Roberto, ao Dr. Whasley e ao Dr. Giuliano, pelos conhecimentos transmitidos, pela atenção e pela participação na banca avaliadora.

À Universidade Federal de Lavras e aos Departamentos de Biologia e Ciências dos Alimentos que permitiram a utilização de materiais, reagentes e equipamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e seus professores, que de forma direta ou indireta me auxiliaram e permitiram a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro, durante parte do curso.

A todos os funcionários do Departamento de Biologia da UFLA, pela amizade, em especial a Ivani, Cidinha e Rose, pelos serviços prestados.

Aos grupos de estudos, NEFER e NETAX, pelas possibilidades de aprendizado e engrandecimento.

A todos que, direta ou indiretamente contribuíram, agradeço intensamente e dedico o resultado deste trabalho.

Obrigada!

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende”

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

Produtos agrícolas, com expressão para a economia brasileira, como frutos, grãos de café, uvas, dentre outros podem ser contaminados por fungos filamentosos produtores de Ocratoxina A (OTA) desde a lavoura até o armazenamento. Essa micotoxina é considerada uma das mais prejudiciais para a saúde humana devido a sua toxicidade. O uso excessivo de fungicidas e os riscos à saúde humana têm levado a pesquisas sobre formas alternativas como o controle biológico. Neste contexto, objetivou-se avaliar o potencial antagonístico de 32 cepas de leveduras pertencentes aos gêneros *Debaryomyces*, *Pichia* e *Saccharomyces*, isoladas de frutos do café e do cacau, em cocultivo com *Aspergillus ochraceus* e *A. carbonarius*. As leveduras foram inoculadas (10^4 e 10^7 células/mL) com três isolados de fungos filamentosos, *A. carbonarius* (isolado 2 e 8CSP3-25), isolados da uva e *A. ochraceus* (SCM 1.9), isolado do café (10^5 esporos/mL). Realizou-se avaliação do crescimento micelial e contagem de esporos, ambos em meio MEA, e produção de OTA, meios CYA e YES, em 0,98, 0,96 e 0,94 de a_w , através da Cromatografia de Camada Delgada (CCD), sendo todas os fatores avaliados após 7 dias de incubação a 28 °C. As leveduras em ambas as concentrações (10^4 e 10^7 células/mL) apresentaram maior efeito inibitório (53% em relação ao controle) do crescimento micelial para o isolado de *A.ochraceus*. Em relação à produção de esporos, *Aspergillus carbonarius* 2 apresentou 38% de produção de esporos superior quando comparado com o isolado *A. carbonarius* 8CSP 3-25. Leveduras do gênero *Pichia* apresentaram maior efeito inibitório na produção de esporos. Em relação à inibição da produção da OTA, *Debaryomyces hansenii* UFLA CF693 coincidiu entre os três isolados de *Aspergillus*. Sendo que a maior inibição da produção de OTA ocorreu nos meios com 0,94 de a_w . Concluiu-se que leveduras em cocultivo com fungos filamentosos são capazes de inibir o crescimento micelial, produção de esporos e de OTA, e assim potencialmente diminuir a disseminação destes fungos no processamento de qualquer tipo de produto agrícola e consequentemente a contaminação dos alimentos com micotoxinas, como a Ocratoxina A.

Palavras-chave: Biocontrole. Fungos toxigênicos. Ocratoxina A. *Aspergillus*. *Pichia*. *Debaryomyces*.

ABSTRACT

Agricultural products such as coffee fruit and beans, grapes among others which are important for Brazilian economy may be contaminated by filamentous fungi producing ochratoxin A (OTA) from the field to storage. This mycotoxin is considered to be one of the most harmful to human health due to its toxicity. The excessive application of fungicides and the hazards to human health has led to researches into alternatives forms such as biological control. In this context, we aimed to evaluate the antagonistic potential of 32 yeast strains belonging to the genera *Debaryomyces*, *Pichia* and *Saccharomyces* isolated from coffee and cocoa fruit, co-cultivated with *Aspergillus ochraceus* and *A. carbonarius*. Yeasts were inoculated (10^4 and 10^7 cell/mL) with three isolates of filamentous fungi, *A. carbonarius* (isolated 2 and 8CSP3-25) from grape and *A. ochraceus* (SCM 1.9) from coffee (10^5 spores/mL). The mycelial growth evaluation and spores scoring both in MEA medium, and OTA production in CYA and YES media at 0.98, 0.96 and 0.94 a_w was performed by Layer Chromatography (LTC) and all factors evaluated after 7 days of incubation at 28°C. Yeasts in both concentrations (10^4 and 10^7 cell/mL) have shown higher inhibitory effect to mycelial growth (53% in comparison to control) for *A. ochraceus* isolate. As for spore production, *Aspergillus carbonarius* 2 had 38% higher spore production in comparison with *A. carbonarius* 8CSP 3-25. Yeasts belonging to the genus *Pichia* have screened a higher inhibitory effect on sporulation. Regarding inhibition of OTA production, *Debaryomyces hansenii* UFLA CF693, were in agreement with the three isolates of *Aspergillus* and the highest inhibition of OTA production took place at the 0.94 a_w media. Therefore, it was possible to conclude that yeasts co-cultivated with filamentous fungi are able to inhibit mycelial growth, sporulation and OTA production. Thus, they are able to decrease the spread of these fungi during any agricultural products processing and thereafter food contamination with mycotoxin such as Ochratoxin A.

Keywords: Biocontrol. Toxigenic fungi. Ochratoxin A. *Aspergillus*. *Pichia*. *Debaryomyces*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estruturas de Ocratoxina A (OTA), Ocratoxina B (OTB), Ocratoxina C (OTC), 4-hidroxiocratoxina A (4-OH OTA) e Ocratoxina α (Ota).....	30
Figura 2	a) Fungo do gênero <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> em meio de cultura CYA;b) Estrutura microscópica do fungo do gênero <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i>	36
Figura 3	a) <i>Aspergillus ochraceus</i> em meio de cultura CYA; b) Estrutura microscópica de <i>Aspergillus ochraceus</i>	37
Figura 4	Fotografias dos cocultivos com 7 dias de incubação	64
Figura 5	A- Levedura - <i>Pichia sydowiorum</i> UFLA CF732 em cocultivo com o fungo <i>A. ochraceus</i> SCM1.9, evidenciando a esporulação do fungo; B- Campo de visão através de uma lupa, sendo possível observar a presença de esporos.....	78
Figura 6	Fotografia da CCD evidenciando a presença e ausência de OTA nos diversos tratamentos.....	91
Figura 7	Fotografia a esquerda cocultivo de <i>Aspergillus carbonarius</i> 2 (10^5 esporos/ mL) e <i>Pichia burtonii</i> UFLA CF605(10^4 células/mL) pH 2; a direita cocultivo de <i>Aspergillus carbonarius</i> 2 (10^5 esporos/ mL) e <i>Pichia burtonii</i> UFLA CF605 (10^7 células/mL) pH 4	100
Figura 8	Competição <i>in vitro</i> entre <i>Aspergillus carbonarius</i> 2 (uva) e <i>Debaromyces hansenii</i> UFLA CF 693 (café arábica), aumento de 40x.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Isolados de leveduras utilizadas como biocontrole e suas respectivas origens	51
Tabela 2	Isolados de fungos filamentosos do gênero <i>Aspergillus</i> , suas origens e regiões de coletas.....	52
Tabela 3	Meios de cultivo CYA e YES ajustados em diferentes valores de atividade de água pela adição de glicerina	54
Tabela 4	Média e % de inibição dos diâmetros das colônias dos três isolados de <i>Aspergillus</i> em cocultivo com 32 cepas de leveduras isoladas de frutos do café e cacau, nas concentrações de 10^4 e 10^7 células/mL após 7 dias de cultivo	59
Tabela 5	Análise de variância para a comparação do diâmetro da colônia de fungo com diferentes fontes de variação: levedura, concentração, isolado de fungo.....	66
Tabela 6	Média dos diâmetros das colônias dos três isolados de <i>Aspergillus</i> em cocultivo com 32 isolados de leveduras isoladas de frutos do café e cacau	67
Tabela 7	Média dos diâmetros das colônias de <i>Aspergillus</i> em relação às duas concentrações de células de leveduras (10^4 e 10^7 células /mL)	67
Tabela 8	Análise de variância para a comparação do diâmetro da colônia de cada isolado de fungo em relação ao agrupamento das 32 leveduras testadas	68
Tabela 9	Média geral e média dos diâmetros das colônias dos três isolados de <i>Aspergillus</i> em cocultivo com 32 isolados de leveduras isoladas de frutos do café e cacau.....	69

Tabela 10	Análise de variância com a comparação das 32 leveduras testadas em relação as duas concentrações testadas (10^4 e 10^7 células/mL)	72
Tabela 11	Média dos diâmetros nas concentrações (10^4 e 10^7 células/mL) utilizando os 32 isolados de leveduras isoladas de frutos do café e cacau.....	73
Tabela 12	Somatório do número de esporos em log/mL e % de inibição da produção de esporos dos isolados de <i>A. carbonarius</i> (2 e 8CSP3-25), em relação as 32 cepas de leveduras isoladas de frutos do café e do cacau, nas concentrações de 10^4 e 10^7 células /mL.....	79
Tabela 13	Análise de variância para a produção de esporos considerando-se o isolado e concentração de células de leveduras testadas e a espécie fúngica.....	84
Tabela 14	Média geral do número de esporos em log/mL em relação aos dois isolados de <i>A. carbonarius</i> (isolado 2 e 8CSP 3-25).....	84
Tabela 15	Média geral do número de esporos (log esporos /mL) em relação as 32 leveduras testadas nas concentrações 10^4 e 10^7 células /mL.....	85
Tabela 16	% de inibição da produção de esporos dos isolados de <i>A. carbonarius</i> com as 32 testadas nas duas concentrações celulares.....	86
Tabela 17	Avaliação da produção de OTA pelo isolado <i>A. carbonarius</i> 8CSP 3-25 em cocultivo com diferentes isolados de leveduras (10^4 e 10^7 células /mL) cultivados em meio CYA com diferentes teores de atividade de água (a_w).....	93

Tabela 18	Avaliação da produção de OTA pelo isolado <i>A. carbonarius</i> 2 em cocultivo com diferentes isolados de leveduras (10^4 e 10^7 células/mL) cultivados em meio CYA com diferentes teores de atividade de água (a_w).....	94
Tabela 19	Avaliação da produção de OTA pelo isolado <i>A. ochraceus</i> SCM 1.9 em cocultivo com diferentes isolados de leveduras (10^4 e 10^7 células/mL) cultivados em meio YES com diferentes teores de atividade de água (a_w)	98

LISTA DE SIGLAS

AFL	Aflatoxina
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
a_w	Atividade de água
BPA	Boas Práticas Agrícolas
BPF	Boas Práticas de Fabricação
β-ZEL	β- zearalenol
CAST	<i>Council of Agricultural Science and Technology</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CYA	Czapek Yest Agar
DBC	Delineamento em Blocos Casualizados
DON	Desoxinivalenol
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
MEA	Malt Extract Agar
OTA	Ocratoxina A
OTB	Ocratoxina B
OTC	Ocratoxina C
4-OH OTA	4-hidroxiocratoxina A
Ota	Ocratoxina α
TEF	Tolueno, Acetato de Etila e Ácido Fórmico
UV	Ultravioleta
YEPG	Yeast Extract Peptone Glucose
YES	Yeast Extract Sucrose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	Produtos alimentícios que são contaminados por fungos	20
2.2	Micotoxinas	26
2.2.1	Ocratoxina A (OTA)	29
2.3	Fatores relacionados com o crescimento e produção de OTA por fungos	32
2.4	Gêneros <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> e Seção <i>Circumdati</i>	35
2.5	Formas de controle	37
2.5.1	Métodos de descontaminação	38
2.5.1.1	Métodos Físicos	39
2.5.1.2	Métodos Químicos	40
2.5.1.3	Métodos Biológicos	41
2.5.2	Controle biológico	43
2.5.2.1	Fungos	43
2.5.2.2	Leveduras	44
3	MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1	Microrganismos	50
3.2	Ensaio <i>in vitro</i>	52
3.3	Avaliação do crescimento vegetativo	53
3.4	Avaliação da produção de esporos dos fungos do gênero <i>Aspergillus</i>	53
3.5	Padronização da atividade de água, dos meios CYA e YES, favoráveis ao desenvolvimento e à produção de OTA pelas espécies de <i>Aspergillus</i>	53
3.6	Determinação da OTA produzida por fungos pelo método Plug Agar	55
3.7	Aferição do pH	56
3.8	Observação microscópica de levedura em cocultivo com fungo toxigênico	56
3.9	Delineamentos experimentais e análise estatística	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1	Avaliação do crescimento vegetativo	58
4.2	Avaliação da produção de esporos	77
4.3	Determinação da presença de ocratoxina A pelo método Plug Agar em meio sintético com diferentes níveis de atividade de água (a_w)	90
4.4	Aferição do pH	99

4.5	Acompanhamento por microscopia óptica da germinação de esporos de <i>Aspergillus carbonarius</i> 2 cocultivado com <i>Debaromyces hansenii</i> UFLA CF693.....	101
5	CONCLUSÕES	104
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	106
	REFERÊNCIAS	107

1 INTRODUÇÃO

No Brasil a biodiversidade existente ainda é pouco conhecida e utilizada em relação aos animais e às plantas, e em menor quantidade ainda quando se considera os microrganismos. Alguns microrganismos são estudados por serem capazes de inibir o desenvolvimento e a produção de toxinas por fungos filamentosos frequentemente isolados de produtos agrícolas, especialmente os alimentos.

O Brasil possui microrganismos com ampla potencialidade de aplicação biotecnológica nas áreas, principalmente, da indústria e da agricultura. Mas por apresentar um clima tropical úmido, contém assim fatores ambientais que são favoráveis para o crescimento de fungos produtores de micotoxinas, substâncias tóxicas, sendo um dos fatores que acarretam prejuízos tanto sociais quanto econômicos, devido à contaminação de alimentos por esses fungos indesejáveis.

Essa contaminação dos alimentos, por esses fungos que são potenciais produtores de toxinas, pode acontecer em várias etapas, desde quando a planta ainda se encontra no campo, como também antes e após a colheita. Outras etapas muito susceptíveis são durante o transporte e o armazenamento destes alimentos e dos seus produtos derivados. Isso já ocorre em relação à cultura do café, que consiste num dos alimentos que o Brasil mais produz e também exporta.

Essas substâncias tóxicas já foram encontradas e caracterizadas como metabólitos produzidos em contaminações naturais de grãos, como no café, e presentes também em frutas, como nas bagas de uvas, além de estar presente em outros alimentos, como nos cereais.

Algumas das espécies toxigênicas que foram isoladas em cereais, no Brasil, encontram-se dentro do gênero *Aspergillus*. Sendo que algumas dessas espécies são conhecidas por produzir substâncias tóxicas, tais como *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, produtores de aflatoxinas e de Ocratoxina A

(OTA), tendo como principal produtor o *Aspergillus ochraceus*. As espécies *Aspergillus niger* e o *Aspergillus carbonarius* foram consideradas importantes por apresentarem produção de toxinas nas regiões tropicais e subtropicais. *Aspergillus carbonarius* é considerada a maior fonte de OTA para uva, derivados da uva e vinho, em função dos níveis desta toxina produzidos e do número de isolados ocratoxigênicos.

Estudos sobre a microbiologia dos grãos de café têm mostrado que os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são considerados fungos toxigênicos, contaminantes naturais de café e estão presentes desde o campo até o local onde são armazenados. Sabe-se que os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* estão entre os de maior importância na economia mundial, sendo esses utilizados para a obtenção de alimentos, enzimas, ácidos orgânicos e antibióticos.

Devido às suas propriedades hepatóxica, nefrotóxica, carcinogênica e imunossupressiva para animais, e possivelmente, para humanos, vários países têm elaborado legislações que determinam a concentração máxima de Ocratoxina A em produtos agrícolas e derivados. Estes limites têm por finalidade assegurar a integridade da saúde da população destes países, não expondo assim os consumidores aos efeitos tóxicos causados pela Ocratoxina A.

A presença de fungos do gênero *Aspergillus* é comum e conseqüentemente há contaminação dos grãos desde a lavoura até o consumo final. Então a decisão mais sensata parece ser o máximo de controle sobre os fatores que favorecem o desenvolvimento desses fungos, como temperatura, umidade e pH. Entretanto, as condições climáticas nem sempre permitem um controle eficiente. Uma das ferramentas que poderia minimizar ou até mesmo acabar com a contaminação seria realizar o controle biológico.

Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar se algumas leveduras isoladas de frutos do café e do cacau seriam capazes de controlar o

crescimento, esporulação e produção de toxina de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* que podem contaminar diversos produtos agrícolas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Produtos alimentícios que são contaminados por fungos

O crescimento fúngico e a produção de micotoxinas são dependentes de uma série de fatores, dentre eles podem se destacar: temperatura, umidade, tempo para o crescimento fúngico, composição do substrato, lesões à integridade dos grãos causados por insetos ou dano mecânico/térmico, grau de contaminação, bem como a interação/competição entre as linhagens fúngicas. Todos esses fatores demonstram que o controle de fungos, no sentido de prevenção, muitas vezes se torna muito difícil devido às condições climáticas. Por exemplo, as condições climáticas brasileiras no período de colheita dos cereais, em função do regime pluviométrico, não favorecem a secagem dos grãos, especialmente do milho (MALLMANN et al., 2007).

Outros pontos relevantes são os métodos pelos quais o café é processado; pois esses estão diretamente relacionados a permitir a ocorrência de fungos produtores de micotoxinas, dentre elas a Ocratoxina A (OTA). Batista et al. (2009) verificaram a existência de OTA, nos grãos de café que haviam sido processados através de diferentes métodos e avaliaram assim que as frações varrição e boia contiveram mais elevados níveis de contaminação por fungos toxigênicos e OTA, principalmente quando esses grãos eram secos em terreiro de terra. Com o estudo realizado foi possível demonstrar que a colheita e também as operações de pré-processamento originam produtos que apresentam características e riscos diferentes de exposição a esta contaminação. O maior risco de exposição à contaminação do café foi caracterizado pelo contato do fruto com o solo, constituído pelo café de varrição e por manejo pós-colheita inadequado, durante a secagem em terreiro de terra.

A diversidade microbiana presente em frutos depende de fatores ambientais da região onde esses se encontram como umidade, temperatura e população do solo (THOMAS; SOLY, 2009). Os fungos toxigênicos podem estar presentes nas várias etapas da produção dos alimentos: durante o cultivo, colheita, armazenamento, transporte e processamento. Não é possível descrever um único conjunto de condições que favoreçam o crescimento dos fungos e a produção de micotoxinas, porque os fungos toxigênicos diferem nas suas características ecológicas, bioquímicas e nichos ecológicos (SERRA, 2005). Portanto, é difícil generalizar estratégias de controle, dada à diversidade de fungos produtores de micotoxinas em diversas culturas antes e depois da colheita. Assim, a compreensão dos fatores relevantes na produção de micotoxinas por uma determinada espécie de fungo, numa dada *commodity* agrícola, permite a definição de estratégias para combater o problema. Apesar dos fenômenos de contaminação pré e pós-colheita serem ecologicamente distintos, a produção de micotoxinas em alimentos é frequentemente um processo aditivo iniciado no campo e aumentado durante a colheita e armazenamento (SERRA, 2005).

Em frutos de café e grãos, a diversidade microbiana depende do método de processamento, e também dos fatores climáticos da região onde a planta é cultivada tais como a temperatura, umidade, além da população de microrganismos presente no solo (BATISTA et al., 2009).

Várias espécies de fungos são encontradas associadas a grãos e frutos de café durante o ciclo produtivo e pode, em condições específicas, causar perda de qualidade, produzindo não só o mau cheiro como também um sabor desagradável. Eles podem, por vezes, produzir metabólicos tóxicos (micotoxinas) e, desta maneira, comprometer a segurança do produto final (CHALFOUN, 2010).

Fungos produtores de micotoxinas estão presentes nos ambientes das lavouras, nas etapas do preparo e do armazenamento do café e dessa maneira a sua relação com a qualidade e a segurança do produto final depende não apenas das condições ambientais, como também do manejo da cultura e do processamento pós-colheita (BATISTA et al., 2003).

Pesquisas realizadas demonstraram que em todas as etapas do processamento do café são encontrados uma diversidade de microrganismos como bactérias Gram-negativas (44,5%) e Gram-positivas (46,5%), leveduras como *Pichia* (38,9%), *Candida* (22,3%), *Arxula* (18,9%) e *Saccharomycopsis* (9,7%), e fungos filamentosos como os dos gêneros *Cladosporium* (39,7%), *Fusarium* (34,2%), *Penicillium* (28,8%) e *Aspergillus* (2,7%). (SILVA et al., 2000).

Dentre os fungos que são encontrados com maior frequência, em etapas de processamento do café, estão presentes os gêneros: *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Dependendo do local de cultivo, esses fungos conhecidos como contaminantes naturais do café, podem assim estar presentes desde o campo até o momento do armazenamento (SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008; SILVA et al., 2000).

Em estudo realizado para analisar a microbiota presente durante o método semisseco de processamento de café, coletados em diferentes etapas do beneficiamento, foram encontrados diversos microrganismos. As bactérias predominantes detectadas durante o processamento do café foram *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus cereus* e *Klebsiella pneumoniae*, já as leveduras dominantes foram *Pichia anomala*, *Torulaspota delbrueckii* e *Rhodotorula mucilaginosa*. Além disso, observou-se que dentre os isolados de fungos filamentosos o gênero mais comum foi o *Aspergillus* (VILELA et al., 2010).

Leveduras como *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces* spp., *Pichia anomala*, *Pichia Guilliermondii*, e *Saccharomyces cerevisiae*, foram testadas quanto à sua capacidade para limitar o crescimento e a produção de micotoxinas em alimentos como café, uvas, feijão, cereais, amendoim e produtos lácteos (BJÖRNBERG; SCHNURER, 1993; BLEVE et al., 2006; LIU; TSAO, 2009; MASOUD; KALTOFT, 2006; PASTER et al., 1993; PETERSSON et al., 1998; PETERSSON; SCHNÜRER, 1999; PRADO et al., 2011; SOMAI; BELEWA, 2011; VELMOUROUGANE et al., 2011). A maioria desses estudos foram realizados para avaliar a eficácia da levedura como um agente de controle biológico, mas outros estudos têm-se centrado em avaliar os efeitos antagônicos contra *Aspergillus ochraceus* e a produção da ocratoxina A (OTA) (BLEVE et al., 2006; MASOUD; JAKOBSEN, 2005; MASOUD; KALTOFT 2006; PETERSSON et al., 1998).

Diversas espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* produzem a OTA. A sua ocorrência natural é geralmente associada com alimentos de origem vegetal, principalmente cereais e produtos derivados, especiarias, cacau, café, frutos secos, amendoim e uva (BATTILANI et al., 2004).

Aspergillus flavus e *A. parasiticus* produzem aflatoxinas que são potentes agentes cancerígenos. Essas espécies já foram encontradas em amendoim, milho, algumas nozes e outras oleaginosas. A Ocratoxina A é uma toxina provavelmente carcinogênica, sendo produzida por *Penicillium verrucosum* em grãos de cereais em climas frios (CASTELLA et al., 2002), por *A. carbonarius* nas uvas e mostos utilizados em vinhos (SAGE et al., 2002) e por *A. ochraceus*, por vezes, nos grãos de café (PITT, 2000). *Aspergillus carbonarius* destaca-se como uma das maiores fontes de contaminação de OTA em alimentos como frutas secas, vinho e café (LUNARDI et al., 2006).

A Ocratoxina A ocorre em vários produtos alimentares e bebidas, incluindo uma variedade de cereais, feijão, café, cerveja, vinho, carne, cacau, frutas secas, especiarias, nozes, leite, sangue de porco e de rim e outros tecidos de origem animal (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003; WILSON; MUBATANHEMA; JURJEVIC, 2002). A contaminação dos alimentos por micotoxinas é um problema mundial. Estima-se que 25% de todos os produtos agrícolas produzidos no mundo sejam contaminados por micotoxinas (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004). Os principais produtores de OTA nos produtos alimentares e alimentos para animais são as seguintes espécies: *Aspergillus alliaceus*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. steynii*, *A. westerdijkiae*, *Penicillium nordicum* e *P. verrucosum* (FRISVAD et al., 2006). Estas estão associadas principalmente com culturas agrícolas na pré-colheita, ou em situações de armazenamento pós-colheita. *P.nordicum* também é uma espécie produtora de OTA, sendo isolado predominantemente a partir de certos queijos e carnes fermentadas. *Aspergillus niger*, que é uma espécie muito comum, é menos relevante, já que a maioria dos isolados não são ocratoxigênicos (SERRA; MENDONCA; VENÂNCIO, 2006; PITT et al., 2001).

Ocratoxina A tem sido detectada também em uma grande variedade de produtos agrícolas, produtos animais e alimentos processados, que são considerados *commodities*. No entanto, as concentrações encontradas nos produtos alimentícios finais são inferiores aos encontrados em matérias-primas uma vez que algumas etapas de processamento podem contribuir ativamente para a sua eliminação (ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2010).

Dentre as espécies de fungos constatadas em cafés brasileiros, encontram-se principalmente aqueles que pertencem aos gêneros *Aspergillus*,

Penicillium, *Cladosporium* e *Fusarium* (FERREIRA et al., 2011; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008).

Sabe-se que diversos fatores podem interferir na qualidade do café, especialmente aqueles relacionados às etapas pós-colheita de processamento e secagem. Algumas espécies de fungos podem se associar aos grãos de café durante a pós-colheita, podendo ocasionar alterações indesejáveis (FERREIRA et al., 2011).

Segundo Batista et al. (2009), o maior risco de exposição do café à contaminação por fungos toxigênicos e ocratoxina A foi caracterizado pelo contato do fruto com o solo, constituído pelo café de varrição e por manejo pós-colheita inadequado durante a secagem em terreiro de terra.

Em outro estudo, amostras de café secas em terreiro de cimento, via processamento natural, apresentaram sete diferentes espécies de *Aspergillus*, dentre elas a *A. niger* ocorreu em maior percentual (SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2003).

Ferreira et al. (2011) avaliaram a influência dos diferentes métodos de processamento em relação à incidência de fungos presentes em grãos de cafés beneficiados. Os processamentos utilizados e analisados foram via seca (natural), seco em terreiro de terra, seco em terreiro de cimento e via úmida (despolpado). Nesse trabalho, os gêneros mais encontrados foram *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, sendo que o gênero *Aspergillus* foi o de maior incidência, no qual foram identificadas oito espécies: *Aspergillus ochraceus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. foetidus*, *A. tubingensis*, *A. auricomus*, *A. sojae* e *A. oryzae*. Além disso, foi detectada a maior incidência de fungos em grãos de café que foram oriundos de processamento natural do que de processamento despolpado.

2.2 Micotoxinas

Micotoxinas correspondem a substâncias resultantes do metabolismo secundário de alguns fungos, sendo produtos naturais de baixo peso molecular. Apesar de serem de origem fúngica, nem todos os compostos tóxicos produzidos pelos fungos são considerados micotoxinas. Estudos demonstraram que uma variedade delas é encontrada nos alimentos, e a Ocratoxina A recebe destaque em consequência das suas propriedades nefrotóxica, imunossupressora, teratogênica e carcinogênica (BLEVE et al., 2006; BENNETT; KLICH, 2003). As micotoxinas consideradas mais relevantes para a saúde humana pelo CAST (*Council of Agricultural Science and Technology*) são: aflatoxinas, alcaloides do ergot, fumonisinas, tricotecenos, OTA e zearalenona (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003). Segundo Paterson e Lima (2010), as micotoxinas produzidas por fungos toxigênicos, em produtos agrícolas e processados, possuem grande potencial de risco à saúde dos consumidores.

A contaminação por micotoxinas é um problema mundial de segurança alimentar. Essas podem causar perdas econômicas significativas associadas aos efeitos adversos das micotoxinas sobre a saúde humana e animal, segurança alimentar e também relacionado ao comércio internacional. Dentre as mais de 300 micotoxinas que foram determinadas por apresentar significativo dano para a saúde e impactos econômicos negativos estão as, desoxinivalenol (DON), alcaloides da ergotamina, fumonisinas, ocratoxina A (OTA), patulina e zearalenona. A OTA é uma das mais estudadas devido aos seus efeitos tais como os embriotóxicos, teratogênicos, genotóxicos, neurotóxicos, imunossupressores, carcinogênicos e nefrotóxicos em animais (ABRUNHOSA; SANTOS; VENÂNCIO, 2002; CHIOTTA et al., 2009; DUARTE; PENA; LINO, 2010; SARTORI et al., 2006).

As micotoxinas podem ocorrer em uma grande variedade de produtos agrícolas, tais como grãos de cereais, amendoim, nozes, maçãs, outras frutas, cacau, café em grãos, oleaginosas, vinho, cerveja e especiarias. Elas também podem ser encontradas em carne, leite e ovos (TRUCKSESS; DIAZ-AMIGO, 2011).

A Ocratoxina A foi originalmente isolada como um metabólito secundário do fungo filamentosso *Aspergillus ochraceus* e, posteriormente, muitas outras espécies de *Aspergillus* (*A. niger*, *A. carbonarius*, *A. sulphureus* e *A. melleus*, entre outros) também foram descritas como produtoras de Ocratoxina A (LUNARDI et al., 2006). Atualmente, sabe-se que a OTA também pode ser produzida e excretada por *Penicillium verrucosum* e *Aspergillus carbonarius* que também podem ser fonte desta micotoxina em café (BATISTA et al., 2003). Segundo relatos feitos por Pfohl-Leszkowicz e Manderville (2007), a OTA têm efeitos mutagênicos, teratogênicos, neurotóxicos, além das propriedades hepatotóxicas e imunotóxicas.

As micotoxinas mais estudadas, dentre as sintetizadas por espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*, são as Aflatoxinas (AFL) e a Ocratoxina A. A produção de OTA tem sido estabelecida por diferentes espécies de seção *Nigri*, tais como o *A. niger* e o *A. carbonarius* (ABARCA et al., 2001; DALCERO et al., 2002).

A Ocratoxina A foi originalmente descrita como um metabólito secundário de *Aspergillus ochraceus* (MERWE; STENY; FOURIE, 1965). Atualmente, sabe-se que é produzida por várias espécies de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* (LASRAM et al., 2008) que ocorrem como contaminantes de vários alimentos antes da colheita ou, mais comumente, durante o armazenamento (SOLFRIZZO et al., 2010).

Há relatos de que o primeiro grupo de toxinas estudadas em alimentos foi o das aflatoxinas produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *A.*

parasiticus. A incidência de *Aspergillus* ou das aflatoxinas em café foi relatada por alguns autores (BATISTA; CHALFOUN; PRADO, 2001; ABDEL-HAFEZ; EL-MAGHRABY, 1992; BATISTA et al., 2003). Foi analisado que a implantação de boas práticas agrícolas na cultura do café pode restringir ou até mesmo inibir a produção da toxina. Além do mais, a presença do fungo toxigênico não indica, necessariamente, que os grãos de café estejam contaminados pela micotoxina (BATISTA; CHALFOUN; PRADO, 2001).

A expressão do potencial toxigênico positivo de alguns tipos de microrganismos depende de fatores extrínsecos tais como o próprio substrato, a temperatura, a atividade de água, a umidade relativa, e a ocorrência e desenvolvimento de uma microbiota competitiva (CHALFOUN; CORRÊA, 2002).

Vários trabalhos já foram realizados em relação à eliminação ou redução do teor de aflatoxina no grão de café através do calor obtido do processo de torrefação dos grãos, indicando que é possível a redução da toxina entre 42,2 a 55, 9% (SOLIMAN, 2002). Dessa forma, a reduzida frequência de aflatoxinas reforça a ideia de que a aflatoxina não representa perigo de micotoxicose oriunda de grãos de café (SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2003).

A degradação da OTA em escala laboratorial por meio de recursos biológicos, utilizando diferentes microrganismos, dentre eles as bactérias (HWANG; DRAUGHON, 1994), leveduras (PÉTERI; TÉREN; VÁGVÖLGY, 2007; SCHATZMAYR et al., 2003) e fungos filamentosos (VARGA et al., 2005; ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2002), ou suas enzimas tem sido relatada por vários autores. Também as bactérias lácticas têm tido sua habilidade de degradação de OTA testada em produtos lácteos (SKRINJAR; RASIC; STOJICIC, 1996).

Apesar dos muitos anos de pesquisa sobre as micotoxinas, da introdução de Boas Práticas Agrícolas (BPA), boas práticas na produção de alimentos e

estocagem, e até mesmo das Boas Práticas de Fabricação (BPF), ainda há relatos que a detecção das micotoxinas continua sendo um problema (DUARTE; PENA; LINO, 2010). Neste sentido, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) publicou o manual para aplicação do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e o Codex Alimentarius, código de práticas para prevenção e redução da contaminação de micotoxinas em cereais e outras matrizes, incluindo aflatoxinas, patulina, ocratoxina A, zearalenona, fumonisinas e tricotecenos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2012).

A presença de OTA no café é uma indicação de que podem ter ocorrido falhas graves nas práticas de colheita, no processamento, além de condições precárias na etapa de secagem e também na etapa de armazenamento dos grãos, sendo que todos esses fatores interferem e permitem a proliferação de fungos toxigênicos (PALACIOS-CABRERA et al., 2004; ESPADALÉ; LAMPURLANÉS; AUBERT, 2008; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008; ZINEDINE; MAÑES, 2009).

2.2.1 Ocratoxina A (OTA)

As ocratoxinas constituem um grupo de metabólitos secundários produzidos por fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. A este grupo pertencem a Ocratoxina A (OTA), Ocratoxina B (OTB), Ocratoxina C (OTC), 4-hidroxiocratoxina A (4-OH OTA) e Ocratoxina α (O α) (Figura 1). Essas micotoxinas são compostas basicamente de 2 grupamentos: di-hidroxiisocumarina ligada através do seu grupo 7-carboxi e a amida do grupamento L-b-fenilalanina (essa ligação é muito estável em relação à hidrólise

e temperatura), com exceção da OTA em que o grupamento fenilalanina está ausente (RINGOT et al., 2006).

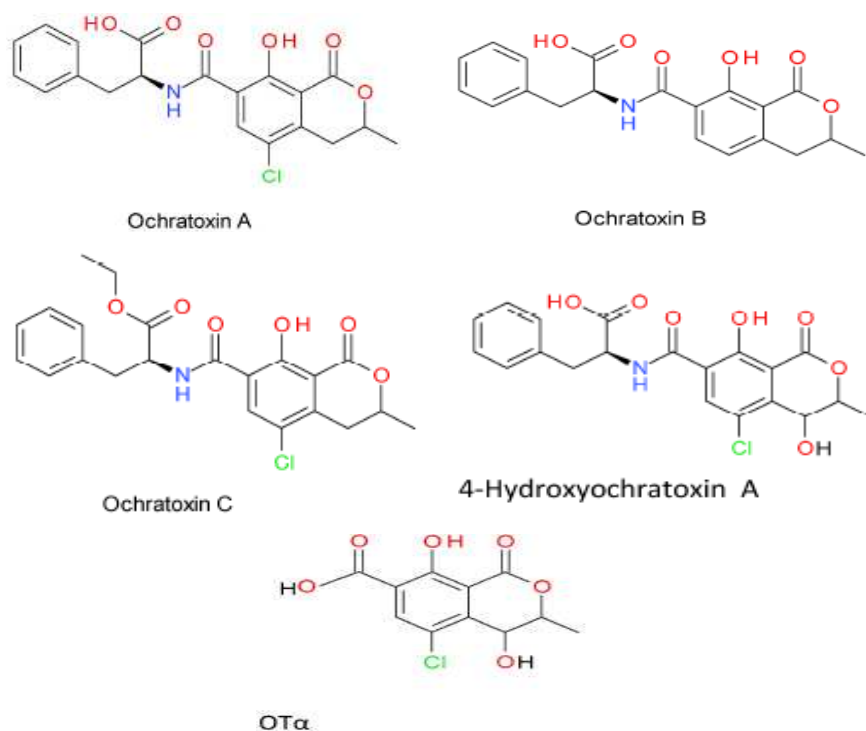


Figura 1 Estruturas de Ocratoxina A (OTA), Ocratoxina B (OTB), Ocratoxina C (OTC), 4-hidroxiocratoxina A (4-OH OTA) e Ocratoxina α (Ota)

Fonte: ANLI; ALKIS (2010)

Ocratoxina A é um composto branco cristalino cujo nome químico é R-N-[(5-clo-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopiran-7-il)carbonil] L-fenilalanina. Sabe-se que essa é pouco solúvel em água, mas solúvel em solução aquosa de bicarbonato de sódio. Sua fórmula empírica é $C_{20}H_{18}O_6NCl$ e o seu peso molecular é de $403,82 \text{ g mol}^{-1}$ (ANLI; ALKIS, 2010). O máximo de

fluorescência ocorre a 467 nm em metanol 96% e a 428 nm em etanol absoluto (RINGOT et al., 2006).

A Ocratoxina A consiste em uma molécula moderadamente estável ao calor que permanece intacta durante a maioria das operações de processamento dos alimentos e, portanto, pode aparecer em diversos produtos finais (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007).

A ocorrência natural da OTA está geralmente associada com alimentos de origem vegetal, principalmente cereais e seus produtos derivados, café, cacau e temperos (BATTILANI et al., 2004). Segundo Chalfoun e Batista (2006), os fungos produtores de OTA em café são encontrados com maior frequência na *Seção Circumdati*, especialmente a espécie *A. ochraceus*, sendo a toxina mais comum presente no café (FERRAZ et al., 2010; GIL-SERNA et al., 2011). A *Seção Nigri* também apresenta fungos produtores de OTA, podendo estar presentes em diferentes alimentos, como nos grãos de café, cereais e produtos derivados dos cereais (BATISTA et al., 2003; DUARTE ; PENA; LINO, 2010; FRISVAD et al., 2004; FRISVAD; SAMSON, 2000; PERRONE et al., 2007; URBANO et al., 2001).

A OTA está comumente presente em diferentes tipos de agroprodutos, sendo produzida pelos fungos *Aspergillus* da *Seção Circumdati* que inclui as espécies *A. ochraceus*, *A. elegans*, *A. steynii* e *A. westerdijkiae* (FRISVAD et al., 2004; GIL-SERNA et al., 2011).

Segundo Chalfoun e Batista (2006), os cafés dos tipos cereja, cereja despulpado, cereja descascado, verde e seco na planta mostraram-se contaminados com a micotoxina OTA sendo esta, em sua grande maioria, de até 5,0 µg/kg. Já as frações de café mistura, boia e, principalmente, varrição apresentam índices de contaminação por OTA acima de 5,0 µg/kg. Chalfoun e Batista (2002) afirmaram que para que o produto café possa ser comercializado como alimento este, deve apresentar algumas condições na qual se assegura a

qualidade, envolvendo características como: boa aparência, sabor, aroma, valor nutricional e segurança do ponto de vista toxicológico.

2.3 Fatores relacionados com o crescimento e produção de OTA por fungos

Os países que mais produzem alimentos e sofrem mais com a contaminação dos alimentos com micotoxinas são os desenvolvidos. O alto grau de contaminação de toxinas é devido à grande maioria dos países encontrarem-se em áreas de clima tropical com altas umidade e temperatura e, muitas vezes, nesses países, ocorrem à ausência de recursos para a detecção, controle e redução dos alimentos contaminados (PATERSON; LIMA, 2010; SHERIF; SALAMA; ABDEL, 2009; TURNER; SUBRAHMANYAM, 2009).

A produção de metabólitos secundários não é essencial para o desenvolvimento do fungo e essa produção é regulada por vários sinais ambientais (MÜHLENCOERT et al., 2004). Sendo que o estresse é frequentemente mencionado como uma causa para a síntese de micotoxinas (BIRZELE; PRANGE; KRÄMER, 2000).

O crescimento fúngico e a produção de micotoxinas dependem também de uma complexa interação entre diversos fatores, tais como, atividade de água (a_w), temperatura, fatores nutricionais, pH, tipos de produtos, tempo de armazenamento, dentre outros fatores (ANLI; ALKIS, 2010; GARCIA et al., 2011; LASRAM et al., 2010; PATERSON; LIMA, 2010). A colonização interna pelos fungos pode ser explicada por danos causados por insetos, fungos fitopatogênicos, ácaros ou condições climáticas adversas, que tornam os grãos de café mais suscetíveis à incidência fúngica (BATISTA; CHALFOUN, 2007).

A diversidade de espécies de microrganismos associados a frutos e grãos de café pode estar relacionada ao tipo de processamento despolpado e natural, além do local de cultivo e das condições higiênicas sanitárias adotadas pelos

produtores. Assim, o conhecimento das espécies é de grande importância para a definição da tecnologia para o processamento do café, através da qual se poderá prevenir a presença de microrganismos toxigênicos (SILVA et al.; 2003).

A produção de uma maior ou menor quantidade da toxina por microrganismos toxigênicos pode ser também influenciada pelo fator temperatura. Quando ocorrem variações muito discrepantes no valor deste fator em questão, pode-se ocasionar um estresse fisiológico, relacionado ao metabolismo nesses fungos toxigênicos e, dessa maneira, podendo interferir na produção, e principalmente, na quantidade de toxinas. Além disso, durante o transporte de café, há sempre um risco de aumento no teor de umidade, o que pode favorecer o desenvolvimento de fungos toxigênicos e assim possivelmente a produção da micotoxina, em especial a OTA (PALACIOS-CABREIRA et al., 2004; VARGA; SAMSON, 2008).

Em relação à atividade de água, essa pode ser um dos fatores mais críticos que influencia no crescimento, germinação e também no estabelecimento dos fungos em substratos ricos em nutrientes (BOURAS; KIM; STRELKOV, 2009).

O efeito da atividade de água (a_w) e da temperatura no crescimento e produção de OTA por espécies de *Aspergillus carbonarius* isolados de vinhedos europeus e australianos foi avaliado em diversos estudos (BELLÍ et al., 2007; CABRERA-PALACIOS et al., 2005; ESTEBAN et al., 2006; LEONG et al., 2006; OUESLATI et al., 2010; VALERO et al., 2007). Nestes estudos, observou-se, em geral, que as condições favoráveis para o crescimento desta espécie ocorrem nas faixas de 25 a 35 °C e em a_w entre 0,95 a 0,99, e a condição ótima para a produção da OTA ocorre no intervalo de 15 a 20 °C e 0,95 a 0,98 a_w .

Tassou et al. (2007) avaliaram o efeito dos fatores temperatura e atividade de água (a_w) na taxa de crescimento e produção de OTA *in vitro* de

dois isolados de *Aspergillus carbonarius*, na Grécia. Esses autores observaram que os dois isolados cresceram a 30 – 35 °C e a_w de 0,96, enquanto que a produção máxima de OTA ocorreu em condições subótimas de crescimento (15 – 20 °C e a_w entre 0,93 e 0,96). Foi observado também crescimento quando a_w foi de 0,85 e estava a 25 °C. A produção máxima de Ocratoxina A foi detectada após 25 dias de incubação a 20 °C e 0,96 a_w e esse valor foi de 3,14 e 2,67 µg/g para as cepas analisadas.

São fatores importantes para a contaminação por espécies de *Aspergillus* e a produção de OTA, além dos fatores ambientais, a presença de microbiota competitiva e a composição do substrato (KHALESIA; KHATIB, 2011; RAMOS et al., 1998).

De acordo com Lasram et al. (2012), dentre as espécies de *Aspergillus Nigri* obtidas de uvas, *A. carbonarius* foi o produtor de OTA predominante, com 99,5%, contra apenas 3,2% dos isolados de *A. niger* agregado ocratoxigênicos. De acordo com Tjamos et al. (2004), a espécie *A. ochraceus* raramente é isolada de uvas e, portanto, não é considerada uma espécie relevante em relação à produção da OTA nesta fruta.

Aspergillus ochraceus encontra-se presente em grãos de café, sendo uma espécie produtora de ocratoxina. Desenvolve-se em temperatura entre 8 °C e 37 °C, sendo que a temperatura ótima está na faixa de 24 - 31 °C, com a atividade de água mínima de 0,76 a 25 °C, sendo que a_w ótima está na faixa de 0,95 - 0,99 e pH entre 3 - 10 (PALACIOS-CABRERA et al., 2005; PITT; HOCKING, 1997). Apesar da espécie *A. ochraceus* desenvolver-se a partir de 0,76 de atividade de água, a OTA é produzida a partir de 0,85, sendo a atividade de água ótima de 0,97. Com relação ao fator temperatura na qual ocorre a produção da toxina, essa se situa entre 12 °C e 37 °C, sendo que a ótima é de 25 °C e o pH ótimo de produção encontra-se entre 5 - 6 (MOSS, 1996).

O predomínio de algumas espécies do gênero *Penicillium* e também de *Aspergillus* spp. em grãos de café acontece devido ao caráter xerofílico desses microrganismos, que possuem a capacidade de se adaptar a condições de baixa umidade dos grãos (BATISTA; CHALFOUN; PRADO, 2001). Espécies de *Aspergillus* como *A. niger*, *A. flavus* e *A. ochraceus*, também são consideradas xerofílicas, desenvolvendo-se em condições de baixa atividade de água (a_w) (PITT; HOCKING, 1997).

2.4 Gêneros *Aspergillus* Seção *Nigri* e Seção *Circumdati*

Em países de clima tropical, dentre as espécies produtoras de Ocratoxina as mais comumente detectadas no café, pertencem ao gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* e Seção *Circumdati* (GIL-SERNA et al., 2011).

As espécies de *Aspergillus* que compreendem a Seção *Nigri*, são mundialmente distribuídas, sendo assim espécies comuns de ambiente (NOONIM et al., 2008). Os fungos dessa Seção apresentam as seguintes características: i) a presença de conídios de coloração marrom-escuro a negros (Figura 2a), ii) estruturas dos conidióforos unisseriados ou bisseriados (Figura 2 b), iii) presença de vesículas esféricas e hifas hialinas ou levemente pigmentadas próximas ao ápice (BELLÍ et al., 2004).

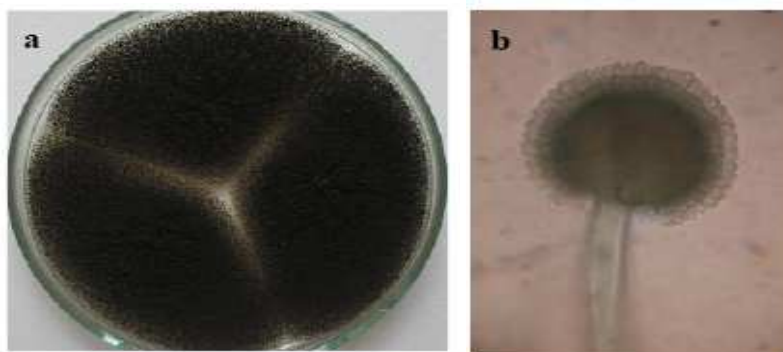


Figura 2 a) Fungo do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* em meio de cultura CYA;b) Estrutura microscópica do fungo do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*

Fonte: Rezende (2010).

Os *Aspergillus* da Seção *Nigri* fazem parte do grupo de *Aspergillus* ocratoxigênicos onde *A. carbonarius* é o mais representativo. Espécies como *A. niger* e *A. carbonarius* são encontrados, algumas vezes, em associação, sendo essas produtoras de ocratoxina A em alimentos de regiões subtropicais e também tropicais, podendo estar presentes em frutos amadurecidos, como nas uvas, frutas secas e café, e apresentam alta resistência à luz solar e luz ultravioleta (DUARTE; PENA; LINO, 2010).

As espécies de *Aspergillus* pertencentes à Seção *Circumdati* possuem diferentes características importantes, como a biotransformação de esteroides em alcaloides, além disso, os escleródios de várias espécies contêm compostos inseticidas (VARGA; SAMSON, 2008).

Dentre os fungos do gênero *Aspergillus* da Seção *Circumdati*, *A. ochraceus* (Figura 3a e 3b) é o mais comum em café e o maior produtor de OTA (BATISTA et al., 2009; ESPADALÉ; LAMPURLANÉS; AUBERT, 2008).

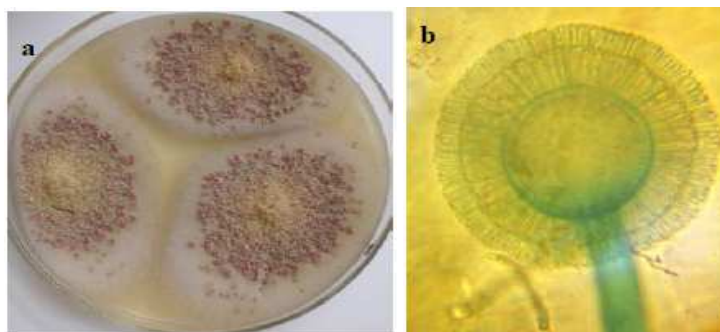


Figura 3 a) *Aspergillus ochraceus* em meio de cultura CYA; b) Estrutura microscópica de *Aspergillus ochraceus*

Fonte: Rezende (2010).

2.5 Formas de controle

Segundo Vasanthi e Bhat (1998), devem-se tomar medidas preventivas, em todas as etapas de produção, para reduzir dessa forma os riscos de contaminações por micotoxinas em produtos agrícolas. As etapas de produção englobam desde o plantio, a colheita, o transporte e o armazenamento da matéria-prima até o momento do processamento do produto final.

A contaminação dos alimentos por micotoxinas é um problema mundial e estima-se que 25% de todos os produtos agrícolas produzidos no mundo sejam contaminados por micotoxinas, sendo necessária à implementação de métodos mais seguros de descontaminação e de prevenção da produção de toxinas (CHALFOUN, 2010; FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

Logo, o uso de microrganismos pode ser um modo prático para reduzir as concentrações, além disso, há relatos que vários microrganismos podem realizar a biodegradação de OTA (CHALFOUN, 2010).

Algumas estratégias preventivas, como a utilização de agentes biocontroladores, fungicidas, antioxidantes e melhorias nas práticas agrícolas

são necessárias para controlar e também reduzir a contaminação da OTA (PONSONE et al., 2012).

O controle biológico tem assumido grande importância, principalmente em programas em que se realiza o controle de pragas, visto que a produção está engajada a uma agricultura que seja mais sustentável, algo muito discutido na atualidade. Isso se dá devido ao grande uso de agrotóxicos que está acarretando vários problemas, como por exemplo, o surgimento de microrganismos que são resistentes aos antimicrobianos, devido ao uso abusivo desses compostos que exercem pressão para o surgimento de resistência (CHALFOUN, 2010). Além do controle biológico podem ser utilizados métodos de descontaminação.

O método de descontaminação após a produção da micotoxina consiste no tratamento pós-colheita e para que esse possa ser realizado pode-se fazer o uso de alguns modos como: remover, destruir ou reduzir o efeito tóxico. Sabe-se que é complicado impedir a formação de micotoxinas tanto no campo quanto na etapa de estocagem, entretanto, se for realizado o monitoramento esse poderá impedir que as micotoxinas se tornem uma expressiva fonte de riscos à saúde, visto que o conhecimento da contaminação permitirá a adoção de medidas estratégicas para minimizar o risco (MALLMANN et al., 2006)

2.5.1 Métodos de descontaminação

Métodos para descontaminação de alimentos com OTA são classificados dentro de três principais categorias: físicos, químicos e microbiológicos. O objetivo destes métodos é reduzir ou eliminar o efeito tóxico da OTA por destruição, modificação ou adsorção desta micotoxina. Para ser um método ideal deve ser econômico, não gerador de componentes tóxicos, além disso, não devem alterar os parâmetros de qualidade dos alimentos, como por exemplo, a composição nutricional (ANLI; ALKIS, 2010).

2.5.1.1 Métodos Físicos

Os métodos físicos de descontaminação consistem na segregação, triagem, limpeza e nos processos de descasque que visam remover as frações mais contaminadas das *commodities*. Eles também podem envolver a utilização de adsorventes, como aditivos alimentares que absorvem Ocratoxina A reduzindo assim a biodisponibilidade (ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2010).

Dentre os métodos físicos, têm-se os tratamentos térmicos, porém esses não eliminam completamente a OTA (BOUDRA; LE-BARS; LE-BARS, 1995). No entanto, a OTA pode ser destruída pela aplicação de radiações gama (AMÉZQUETA et al., 2009; AZIZ; MOUSSA; FAR, 2004).

O calor é um método físico descrito por Dupuy et al. (1993) como sendo capaz de diminuir de 87 a 100% as concentrações de fumonisina B1 em grãos de milho, no entanto a temperatura deve ser em torno de 150 a 220 °C, o que pode levar a perda nutricional dos alimentos. Voss et al. (1996) escreveram que a simples lavagem dos grãos, usando água e solução de carbonato de sódio, pode reduzir as concentrações de DON, zearalenona e fumonisina no milho. Entretanto essas técnicas são de pouca aplicabilidade para grande quantidade de grãos, como ocorre nas fábricas de rações das indústrias avícolas.

Os métodos físicos assim como os químicos possuem grandes desvantagens, devido à eficácia limitada, provocam perdas de nutrientes e apresentam alto custo. A detoxificação por biodegradação é destacada como uma alternativa futura (LINO; SILVA; PENA, 2004).

2.5.1.2 Métodos Químicos

Os métodos químicos de detoxificação consistem na utilização de compostos para destruir OTA como a amonização, hidrólise alcalina, usos de bissulfetos e de ozônio (ozonização). Estes são relatados geralmente como sendo eficazes na eliminação de OTA e outras micotoxinas. No entanto, a segurança toxicológica do produto final não é sempre garantida, uma vez que alguns resíduos químicos podem permanecer nos produtos e a toxicidade dos produtos de reação formados geralmente não é estudada. Além disso, há uma redução significativa na palatabilidade e qualidade nutritiva dos produtos tratados (ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2010).

Em relação ao uso do ozônio, quando se faz o uso deste em concentrações menores que 100 ppm (partes por milhão ou mg/L) são necessários longos tempos de tratamento para controlar os insetos e fungos em grãos armazenados (MCDONOUGH et al., 2011).

Segundo Rodrigues (2013), apesar da extensa redução da carga total de fungos, foi verificado que os gêneros *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e leveduras demonstram resistência às concentrações de gás O₃ quando este foi aplicado em arroz (*Oryza sativa* L.).

O emprego da amônia possui certa eficiência na degradação das aflatoxinas. É um procedimento adotado em alguns países, especialmente na descontaminação de grãos e castanhas. No entanto, as principais desvantagens são a ineficiência contra outras micotoxinas e possíveis efeitos tóxicos à saúde animal devido ao excesso de resíduos de amônia na ração (HUIG et al., 2001).

Métodos alternativos de eliminação da contaminação, por aflatoxinas A, são utilizados, como a degradação das moléculas pela aplicação de agentes oxidantes: água oxigenada e hipoclorito de sódio. Porém, a utilização destas substâncias em alimentos é impraticável, uma vez que, certamente afetariam

suas propriedades como “flavor”, cor, textura, propriedades nutricionais e funcionais, além da possível formação de resíduos tóxicos. O custo excessivo e a dificuldade de aplicação também são outros inconvenientes (ARAÚJO, 2008).

O beneficiamento de grãos vem demonstrando ser capaz de reduzir os níveis tanto fúngicos como de micotoxina, sendo esta redução dependente da espécie fúngica e tipo de toxina. Alguns materiais químicos adsorventes como o carvão ativado, colestiramina, sódio, silicato de alumínio e cálcio, bentonita, além de fragmentos de madeira e leveduras foram testados para a desintoxicação dos alimentos com Ocratoxina A (RINGOT et al., 2006; SAMSON et al., 2004; VARGA et al., 2003).

2.5.1.3 Métodos Biológicos

Na indústria, os processos microbiológicos que atuam na redução dos níveis de OTA são, por exemplo, a maltagem e a fermentação (AMÉZQUETA et al., 2009; KOZAKIEWICZ, 1989). A OTA pode ser removida por microrganismos como consequência do seu metabolismo, ou por adsorção celular.

A melhoria das técnicas de controle biológico e da utilização de metabólitos produzidos por microrganismos para a obtenção de produtos que podem ser aplicados em vários campos tem ganhado destaque principalmente por esses metabólitos produzidos serem considerados como alternativas sustentáveis para o seguimento dos agroquímicos (CHALFOUN, 2010).

Há alguns estudos relacionados com a descontaminação, como por exemplo, em relação à ocratoxina A (OTA), em que fazem uso de alguns métodos biológicos utilizando microrganismos capazes de transformar, degradar ou até mesmo adsorver OTA para assim desintoxicar os produtos que venham a estar contaminados ou então evitar os efeitos tóxicos quando essa micotoxina for

ingerida. Essas técnicas possuem algumas vantagens, visto que são eficientes, específicas, além disso, ecologicamente corretas e preservam a qualidade nutritiva dos produtos. No entanto, é importante alertar que esses microrganismos utilizados no processo de descontaminação e os produtos que são formados durante as reações devem ser seguros para os seres vivos, ou seja, não patogênicos (ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2010).

Em experimento, observou-se que a remoção da OTA por processo de adsorção em vinho, por oito cepas de *Sacharomyces cerevisiae* de uso enológico, foi obtida com percentuais de remoção entre 52,1% e 70,13% para os vinhos tintos (CECCHINI et al., 2006).

O processo fermentativo é uma das formas de se realizar a descontaminação fazendo a utilização de microrganismos. Há relatos de que durante o processo fermentativo utilizado na fabricação de pães a partir de grãos de trigo contaminados com deoxinivalenol, foi observada a redução dos níveis dessa substância, o que foi atribuída à fermentação e também ao processo térmico ao qual o produto foi submetido. Sendo assim, esta descontaminação pode ter ocorrido devido à possibilidade da levedura adsorver as toxinas presentes, reduzindo dessa forma a contaminação (MALLMANN et al. 2006).

Visto que as frutas são importantes micro-habitats para uma variedade de espécies de leveduras na natureza, devido à alta concentração de açúcares simples, baixo pH e intensa visitação por insetos vetores (LACHANCE et al., 2001), poderia assim selecionar alguns desses microrganismos e realizar estudos com os mesmos para descobrir o potencial de controle biológico desses microrganismos sobre outros que são produtores de micotoxinas.

Experimentos de fermentação alcoólica que foram realizados utilizando a espécie *Saccharomyces cerevisiae* com mosto contaminado com zearalenona mostraram que após 7 - 9 dias de fermentação ocorreram modificações em relação à essa micotoxina. Observou-se que, do conteúdo inicial de zearalenona,

69% foram convertidos a β -zearalenol (β -ZEL), e 8,1% a α -zearalenol. A maior parte de metabolização da zearalenona ocorreu no primeiro e segundo dias de fermentação, mostrando, dessa forma, a instabilidade da toxina frente à fermentação (MALLMANN et al., 2006).

2.5.2 Controle biológico

O controle biológico é tradicionalmente definido e considerado como o controle de um microrganismo por outro microrganismo. Um microrganismo pode interagir com outros, criando condições desfavoráveis ao desenvolvimento destes, sendo essa forma de interação denominada de antagonismo (BETTIOL, 1991).

Atualmente, a melhoria das técnicas de controle biológico e da utilização de metabólitos produzidos por microrganismos para obtenção de produtos que podem ser aplicados em vários campos têm ganhado destaque, principalmente por esses metabólitos produzidos serem considerados como alternativas sustentáveis para o seguimento dos agroquímicos (ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2010).

Apesar de ter feito a utilização de produtos químicos como fungicidas para o controle de *A. carbonarius* e *A. niger* (VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006), as medidas de controle biológico, fazendo o uso de leveduras epífitas (BLEVE et al., 2006) seriam melhores, visando uma forma alternativa ao uso de produtos químicos.

2.5.2.1 Fungos

Espécies do gênero *Cladosporium* são utilizadas no controle biológico de inseto-planta. Como exemplo tem-se a espécie *Cladosporium herbarum*, que

foi eficaz no controle de moscas brancas que atacam culturas (ABDEL-BAKY; ABDEL-SALAM, 2001). Há relatos que fungo desse gênero pode degradar a OTA produzida por *Aspergillus ochraceus* e está associado a cafés de boa qualidade em várias regiões, o que despertou o interesse para o seu uso como agente antagonista aos fungos deletérios à qualidade do café (ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2002; PEREIRA, 2002). Além disso, sua patogenicidade é limitada a outras culturas e o mecanismo subjacente a estas patologias é compreendido e testável (CHALFOUN, 2010). A literatura também confirma que uma espécie marinha de *Cladosporium* sp. é capaz de produzir um antibiótico que inibe *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*, e apresenta componentes que reduzem o crescimento de *Candida albicans* (GALLO; SELDS; CABRERA, 2004).

A espécie *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries pode ser considerada, após uma análise preliminar, como um agente antagonista potencial contra fungos prejudiciais para a qualidade do café. Entre os mecanismos de ação de *Cladosporium cladosporioides*, a concorrência, referente à interação entre dois ou mais organismos que exercem a mesma ação, é o mais provável, devido à sua ampla gama de adaptação natural e também devido à sua rápida capacidade de colonizar o substrato. A utilização dos extratos obtidos a partir do fungo *Cladosporium cladosporioides* tem demonstrado controle sobre a esporulação e também sobre a germinação de esporos de alguns fungos *Aspergillus ochraceus*, *A.niger*, *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. (CHALFOUN, 2010).

2.5.2.2 Leveduras

As leveduras apresentam características que as tornam promissoras para a utilização como agentes de biocontrole, tais como: a) não produzem esporos

alergênicos e não produzem toxinas como os fungos filamentosos; b) não sintetizam antibióticos como as bactérias (DROBY; CHALUTZ, 1994); c) exigem nutrientes simples, podendo, inclusive, ser utilizados resíduos de indústrias como fonte de carbono (FREDLUND et al., 2002) e d) não apresentam riscos ao consumidor (PASSOTH et al., 2006).

Muitas leveduras isoladas de plantas e ambientes florestais como, por exemplo, o Cerrado, têm mostrado propriedades de controle biológico para microrganismos patogênicos. Algumas leveduras foram patenteadas para utilização no controle pós-colheita de doenças de frutas (AHANSAL et al., 2008).

Algumas leveduras antagonicas foram isoladas de plantas epífitas e selecionadas quanto à sua capacidade de biocontrole sobre *Aspergillus carbonarius* e *A. niger*. Dentre as 144 leveduras isoladas, cinco foram selecionadas pela sua capacidade de biocontrole sobre os fungos *A. carbonarius* e *A. niger*. Estes isolados foram identificados como *Issatchenkia orientalis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Issatchenkia terricola* e *Candida incommunis* (BLEVE et al., 2006).

Apesar das diversas descobertas da aplicação de leveduras com potencial para o biocontrole, existe a preocupação em relação à patogenicidade destes microrganismos que inviabiliza a utilização dessas em produtos alimentícios. Apenas alguns desses microrganismos encontram-se entre os que podem ser considerados seguros (SUNDH; MELIN, 2011).

Existem estudos que demonstraram a inibição de fungos através da utilização de outros microrganismos. A inibição da esporulação de fungos potencialmente toxigênicos por duas espécies de leveduras foi relatada em uma pesquisa recente. Neste trabalho, Ramos e colaboradores (2010) testaram o efeito antagonico dos isolados das espécies *Debaryomyces hansenii* (UFLACF 889 e UFLACF 847) e *Pichia anomala* (UFLACF 710 e UFLACF 951) sobre

três fungos filamentosos (*Aspergillus ochraceus*, *A. parasiticus* e *Penicillium roqueforti*). As leveduras inibiram a esporulação, mas não interferiram no crescimento micelial. Outro resultado observado foi que, utilizando diferentes concentrações celulares das leveduras, eles obtiveram diferentes graus de inibição, trazendo a ideia de que concentração celular inicial do microrganismo antagonista parece ser um dos fatores que interfere no grau de inibição (RAMOS et al., 2010).

Outro trabalho com espécies de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Sporobolomyces roseus*) com potencial ação inibitória frente a fungos filamentosos discorre sobre o fator “killer” que determinadas leveduras apresentaram. Este fator *killer* é um peptídeo tóxico capaz de inibir ou até mesmo ser letal para o crescimento de outros microrganismos (COELHO; HOFFMANN; HIROOKA, 2003).

As leveduras *Pichia anomala* e *Debaryomyces hansenii* e outras espécies dos gêneros *Saccharomyces*, *Candida* e *Zygosaccharomyces* já foram relatadas em literatura, quanto ao potencial de descontaminação de alimentos contaminados com Aflatoxina B1, por meio da adsorção destas moléculas (SHETTY; JESPERSEN, 2006; RAMOS et al., 2010).

Experimentos feitos com a levedura *Pichia guilliermondii* estirpe M8, comprovaram que quando aplicada sobre maçãs, há indução de resistência à *Botrytis cinerea*. Há outros relatos sobre a resistência induzida a patógenos, em frutos por leveduras antagonistas como resistência à *B. cinerea* em maçãs induzida por *Aureobasidium pullulans* (IPPOLITO et al., 2000; ZHANG et al., 2011).

A ação da levedura *Torulaspota globososa*, isolada da rizosfera de cana-de-açúcar, contra o fitopatógeno *Colletotrichum sublineolum*, agente causador da antracnose em sorgo, tem demonstrado que a produção de toxina *killer* controlou significativamente o crescimento do fungo. Esta atividade *killer* ainda

não havia sido determinada para esta espécie. Nesse trabalho não foi detectada a produção de compostos voláteis ou enzimas hidrolíticas, embora tenha reduzido o crescimento micelial, resultando em deformidades da hifa (ROSA et al., 2010).

Existem outras formas de ação de controle biológico por microrganismos como, por exemplo, a competição por nutrientes. Foi realizado um estudo com *Aureobasidium pullulans* para verificar sua eficácia em controlar *Penicillium expansum* em frutos armazenados. Para isto, foram realizados ensaios *in vitro* e o efeito nas porcentagens de germinação de conídios de *P. expansum* foi avaliado após 24 horas de incubação, na presença de concentrações de suco de maçã. Os resultados mostraram que, na ausência da levedura, a germinação dos conídios foi fortemente promovida pelo suco em qualquer concentração. No entanto, a germinação foi significativamente reduzida pela presença da levedura, exceto na concentração mais alta do suco (BENCHEQROUN et al., 2007).

Pichia guilliermondii Wick foi aplicada com sucesso para controlar patógenos pós-colheita em um número de frutos e vegetais, tais como *P. expansum* em maçãs e *Rhizopus nigricans* em frutos de tomate (DROBY et al., 1997; TIAN et al., 2002; SCHERM et al., 2003; e ZHAO et al., 2008). No entanto, informações sobre a ação de *P. guilliermondii* no controle do fungo em maçãs é limitada. Além disso, os modos de ação de *P. guilliermondii* contra patógenos não foram completamente elucidados (ZHANG et al., 2011).

A maioria dos agentes de biocontrole sintetizam enzimas líticas (proteases, quitinases e glucanases) que atuam de forma sinérgica na degradação da parede celular de patógenos (VITERBO et al., 2002).

As enzimas líticas, principalmente β -1,3 glucanases e quitinases, também são produzidas por microrganismos que exercem função antagônica aos fitopatógenos. Logo, atribuiu-se a essas enzimas o efeito de fungitoxicidade

sobre o patógeno e a eficácia do biocontrole de organismos antagonistas (FLEURI; SATO, 2005).

Segundo Masih e Paul (2002), *Pichia membranifaciens* estirpe FY-101, isolado da casca de uva, foi encontrado ser antagonista a *Botrytis cinerea*, agente causal da doença mofo cinzento da videira. Quando realizado o cocultivo em meio sólido e nos meios líquidos, a levedura provocou a inibição de *Botrytis cinerea*, que por sua vez perde sua capacidade de produzir os sintomas mofo cinzento nas mudas de videira. A secreção de β -1,3-glucanases por *P. membranifaciens* é um dos possíveis mecanismos relacionados com este antagonismo. As experiências *in vitro* confirmam que esta levedura pode ser utilizada como um organismo de controle biológico contra *B. cinerea*.

Segundo Reyes; Rohrbach; Paull (2004), que isolaram leveduras epifíticas de abacaxi representadas por *Cryptococcus* sp., *Cryptococcus albidus*, *Pichia guilliermondii*, *Rhodotorula minuta* e *Rhodotorula glutinis* observaram que elas foram capazes de inibir o crescimento micelial *in vitro*, de 25 a 50% de *Ceratocystis paradoxa*, agente etiológico da podridão negra em abacaxi em pós-colheita, diminuindo também a severidade da doença quando as leveduras foram misturadas e aplicadas nos frutos.

Cepas de leveduras *Aureobasidium pullulans* foram encontradas suprimindo doenças causadas por vários patógenos, incluindo espécies de *Penicillium* (ZHANG et al., 2010). Estirpes de leveduras pertencentes às espécies *Cryptococcus laurentii* e *Candida sake* reduziram significativamente a incidência do bolor verde em frutos de laranja (MEKBIB; REGNIER; KORSTEN, 2011).

Métodos de controle biológicos constituem alternativas viáveis em relação aos químicos tradicionais aplicados ainda no campo para combater a infestação fúngica, principalmente por não deixarem resíduos químicos no alimento. Assim surge a alternativa do uso de leveduras nesses processos de

redução de toxinas ou do fungo produtor.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Trinta e dois isolados de leveduras pertencentes aos gêneros *Debaryomyces*, *Pichia* e *Saccharomyces* (Tabela 1) foram utilizados. Esses foram isolados de frutos de café e cacau e encontram-se depositados na Coleção de Cultura de Microrganismos do Laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os fungos *Aspergillus carbonarius* (2 e 8CSP 3-25), isolados da uva e *Aspergillus ochraceus* (SCM 1.9), isolado do café, pertencem à Coleção de Cultura de Microrganismos do Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos do Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

As leveduras preservadas a -80 °C foram reativadas em meio YEPG contendo em g L⁻¹; 10 g de extrato de levedura, 20 g de peptona, 10 g de glicose e 15 g de ágar. As culturas foram incubadas a 28 °C por 24 horas. Após este período, foi realizada suspensão das células em diferentes concentrações celulares para serem utilizadas nos testes *in vitro*.

Os isolados dos fungos filamentosos (Tabela 2) estocados em discos de papel de filtro a -15 °C sobre meio MEA (Malt Extract Agar- g L⁻¹; 20 g de extrato de malte, 1 g de peptona bacteriológica, 10 g de glicose e 20 g de Ágar), foram reativados em MEA em inoculações pontuais, no centro da placa, e incubados a 28 °C por cinco a sete dias. Após este período, foi realizada a suspensão de esporos a serem utilizados nos testes *in vitro*.

Tabela 1 Isolados de leveduras utilizadas como biocontrole e suas respectivas origens

Códigos	Nome científico	Origem	Local
UFLA CF381; UFLA CF397 UFLA CF493	<i>Pichia guilliermondii</i>	Café	Lavras/MG
UFLA CF384; UFLA CF385; UFLA CF650	<i>Debaryomyces polymorphus</i>	Café	Lavras/MG
UFLA CF441b; UFLA CF975 b	<i>Pichia holstii</i>	Café	Lavras/MG
UFLA CF507; UFLA CF508 UFLA CF702	<i>Pichia anomala</i>	Café	Lavras/MG
UFLA CF553; UFLA CF605	<i>Pichia burtonii</i>	Café	Lavras/MG
UFLA CF567; UFLA CF768	<i>Saccharomyces kluyveri</i>	Café	Lavras/MG
UFLA CF640; UFLA CF641 UFLA CF642; UFLA CF693	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Café	Lavras/MG
UFLA CF732; UFLA CF759	<i>Pichia sydowiorum</i>	Café	Lavras/MG
UFLA CF856	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Café	Lavras/MG
UFLA CF 933	<i>Pichia jadinii</i>	Café	Lavras/MG
UFLA YCH5.5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cacau	Itajuípe/BA
UFLA YCH5.56	<i>Debaryomyces etchellsii</i>	Cacau	Itajuípe/BA
UFLA YCH16.2	<i>Pichia fermentans</i>	Cacau	Itajuípe/BA
UFLA YCH155	<i>Pichia guilliermondii</i>	Cacau	Igrapiúna/BA
UFLA YCH2.2	<i>Pichia kluyveri</i>	Cacau	Itajuípe/BA
UFLA YCH192 UFLA YCH194 UFLA YCH1204 UFLA YCH1207	<i>Pichia kluyveri</i>	Cacau	Igrapiúna/BA

Tabela 2 Isolados de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, suas origens e regiões de coletas

Códigos	Nome científico	Origem	Região de coleta
2	<i>Aspergillus carbonarius</i>	Uva	Petrolina-PE
8CSP 3-25	<i>Aspergillus carbonarius</i>	Uva	Petrolina-PE
SCM 1.9	<i>Aspergillus ochraceus</i>	Café	Lavras-MG

3.2 Ensaio *in vitro*

Foi realizada uma suspensão de células de leveduras e ajustadas as concentrações a fim de se obter de 10^4 e 10^7 células mL^{-1} . O mesmo procedimento foi realizado com os isolados de fungos filamentosos para obter a concentração de 10^5 esporos mL^{-1} . As concentrações de células de leveduras e de esporos de fungos foram determinadas a partir da contagem em Câmara de Neubauer.

Cada concentração de células de leveduras foi testada com a concentração de esporos dos fungos. Para isso, foi realizado o espalhamento de uma alíquota de 100 μL da suspensão de levedura, utilizando alça de Drigalski, em placa de Petri contendo o meio MEA e, posteriormente foram adicionados alíquotas de 10 μL de suspensão de esporos de fungos, na concentração de 10^5 esporos mL^{-1} , a serem testadas, no centro da placa. Cada ensaio foi realizado em triplicata. Essas placas foram incubadas em B.O.D. a 28 °C, por até sete dias.

O controle positivo do crescimento de cada isolado fúngico foi realizado pela inoculação da suspensão de esporos em um único ponto sobre o meio MEA mantidas nas mesmas condições de cultivo que os ensaios, porém sem a inoculação das leveduras.

3.3 Avaliação do crescimento vegetativo

Para a avaliação do crescimento vegetativo micelial foram realizadas medidas do diâmetro de cada colônia testada. Essas medidas foram realizadas aos dois, cinco e sete dias após a inoculação. A medição foi realizada utilizando um paquímetro e considerando-se o diâmetro a partir do centro do ponto de inoculação. O controle positivo de crescimento foi avaliado nos mesmos tempos amostrais. A porcentagem de inibição do crescimento foi obtida considerando como 100% ao diâmetro obtido pela mensuração do tamanho da colônia do controle positivo.

3.4 Avaliação da produção de esporos dos fungos do gênero *Aspergillus*

Os testes antagonistas que apresentaram inibição do crescimento dos fungos foram avaliados quanto à concentração de esporos. Desta forma, a contagem de esporos foi realizada após sete dias. Após este período foi adicionado solução de Tween 80 a 0,1% em toda a superfície da placa e feito a raspagem com alça de Drigalski, obtendo assim a suspensão dos esporos. Logo em seguida, foi realizada a contagem em Câmara de Neubauer. A porcentagem de inibição da produção de esporos pelos fungos testados foi obtida considerando como 100% a contagem de esporos realizada no controle positivo.

3.5 Padronização da atividade de água, dos meios CYA e YES, favoráveis ao desenvolvimento e à produção de OTA pelas espécies de *Aspergillus*

Os cocultivos que apresentaram inibição quanto ao crescimento e produção de esporos foram refeitos nos meios CYA (g L^{-1} : 1,0g de K_2HPO_4 , 1,0 mL de solução metálica, 5,0 g de extrato de levedura, 30 g de sacarose, 15,0 g de

ágar) e adicionado 10,0 mL de Czapek Concentrado (30,0 g de NaNO_3 ; 5,0 g de KCl ; 5,0 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 100 mL de água destilada estéril) e YES (g L^{-1} : 20,0 g de extrato de levedura; 150,0 g de sacarose; 20,0 g de ágar e 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e adicionado 1,0 mL de uma solução metálica (0,10 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,00 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,50 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) com diferentes atividades de água (a_w). A determinação da atividade de água foi obtida pela adição de glicerol e mensurada pela leitura no Aqualab, modelo – 2 T (Decagon devuces Inc., Pullman, WA, EUA). A composição dos meios testados e a atividade de água aferidas encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 Meios de cultivo CYA e YES ajustados em diferentes valores de atividade de água pela adição de glicerina

Quantidade de glicerina (mL) nos meios CYA e YES	Quantidade de meio (mL) CYA e YES	CYA A_w final	YES A_w final
0	100	0,992	0,987
5	95	0,984	0,976
10	90	0,977	0,964
15	85	0,960	0,945
20	80	0,939	0,903
25	75	0,928	0,897
30	70	0,903	0,860
35	65	0,885	0,837
40	60	0,847	0,807
45	55	0,809	0,762

3.6 Determinação da OTA produzida por fungos pelo método Plug Agar

A avaliação da produção de Ocratoxina A nos diferentes cocultivos foi realizada por Cromatografia de Camada Delgada pelo método de Plug Agar, conforme descrito por Filtenborg e Frisvad (1980). Para esta análise foram selecionados os cocultivos que apresentaram maior taxa de inibição do crescimento e da inibição da produção de esporos. Para isso, o controle será considerado como tendo apresentado uma taxa de crescimento de 100% e também uma produção de esporos de 100%.

Os cocultivos foram realizados utilizando-se as mesmas concentrações de células e esporos anteriormente citados. Os isolados da Seção *Circumdati* foram inoculados em meio YES com atividade de água igual a 0,98, 0,96 e 0,94 e os isolados da Seção *Nigri* em meio CYA com atividade de água igual a 0,99, 0,96 e 0,94. Todos os testes foram incubados durante sete dias a 28 °C.

Um corte circular de aproximadamente 25 mm do micélio do fungo com ágar foi colocado sobre uma placa de Cromatografia de Camada Delgada (Merck – Sílica Gel 60, 20 x 20) previamente ativada contendo 20 µL do padrão de OTA. O micélio foi retirado e após 15 minutos foi realizada a eluição em uma cuba de vidro, contendo como fase móvel TEF - Tolueno, Acetato de Etila e Ácido Fórmico 90% (60:30:10). Após a eluição, as placas foram secas em capela pelo fluxo e a confirmação feita em luz ultravioleta com λ 366 nm em cromatovisor CAMAG (UV-BETRACHTER). O isolado produtor da micotoxina (aflatoxinas ou ocratoxina) apresenta um Rf (fator de retenção) e um “spot” de fluorescência semelhante ao do padrão da micotoxina testada.

3.7 Aferição do pH

Após as placas serem incubadas por um período de sete dias a 28 °C, em todas as etapas, nos meios CYA, YES e MEA foi aferido a acidez dos meios de cultura, colocando uma tira de papel de indicador de pH, da marca FUSION Universal (pH 0-14). Logo em seguida, foi realizada a comparação da coloração obtida com a escala do respectivo papel indicador do pH. A aferição foi realizada em todas as etapas.

3.8 Observação microscópica de levedura em cocultivo com fungo toxigênico

Para observação do crescimento do isolado *Debaryomyces hansenii* UFLA CF693, isolada do café, em cocultivo com *Aspergillus carbonarius* 2, isolado da uva, foi preparado uma amostra de 3 mL de YEPG contendo 10 µL da suspensão na concentração de 10^5 esporos mL^{-1} e 50 µL da suspensão de células da levedura na concentração de 10^7 células mL^{-1} . Essa amostra foi monitorada por um período de 16 horas utilizando-se BioStation IM-Q (Nikon) que consiste em um sistema de incubadora e monitoramento celular compacto que permite realizar imagens de células vivas. Além disso, permite realizar o controle da umidade e da temperatura e, tirar fotos utilizando três eixos diferentes (XYZ), sendo possível após inúmeras fotos tiradas, num intervalo de um minuto, obter vídeos que permitem observar o desenvolvimento dos microrganismos de interesse.

3.9 Delineamentos experimentais e análise estatística

O experimento foi conduzido em Delineamento em Blocos Casualizados (DBC), com arranjo fatorial (3 x 32 x 2), sendo três isolados de fungos filamentosos, todos na mesma concentração de esporos (10^5 esporos/mL), na presença de 32 isolados de leveduras em duas concentrações (10^4 e 10^7 células/mL) com três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Scott e Knott (1974) a $p < 0,05$.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o *software* SISVAR, segundo a metodologia proposta por Ferreira (2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Trinta e dois isolados de leveduras foram testados em duas diferentes concentrações celulares (10^4 e 10^7 células/mL) a fim de se avaliar o efeito antagonista sobre o crescimento, produção de esporos e toxinas por *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus*. A avaliação do grau de inibição das leveduras sobre a produção dos esporos foi realizada somente para os isolados de *Aspergillus carbonarius* (2 e 8CSP3-25). Não foi possível utilizar esse dado de contagem de esporos para *A. ochraceus* (SCM 1.9) uma vez que na Câmara de Neubauer não foi possível distinguir entre as células de leveduras e os esporos de *Aspergillus* devido à semelhança na textura e diâmetro das células.

4.1 Avaliação do crescimento vegetativo

De um modo geral, pode-se observar que houve a inibição do crescimento micelial de todos os tratamentos em relação ao controle, quando utilizado as leveduras em ambas as concentrações 10^4 e 10^7 células mL^{-1} (Tabela 4). Os maiores valores da inibição do diâmetro se deram para *Aspergillus ochraceus* (SCM 1.9) e, de maneira geral, a inibição foi mais relevante quando utilizados as leveduras na concentração de 10^7 células/mL. Isso ocorreu também para os dois isolados de *A. carbonarius*.

Para o isolado SCM 1.9 a levedura *Pichia holstii* UFLA CF975.b na concentração de 10^7 células/mL inibiu completamente (100%) o crescimento micelial do fungo, sendo dessa maneira um bom isolado para realizar futuros estudos *in vivo*, ou seja, simulando condições encontradas no campo onde ocorrem os plátios de *commodities* agrícolas.

A grande maioria das leveduras foi capaz de inibir acima de 60% o crescimento micelial do isolados de *Aspergillus*, mostrando assim bons resultados nos testes *in vitro*.

Tabela 4 Média e % de inibição dos diâmetros das colônias dos três isolados de *Aspergillus* em cocultivo com 32 cepas de leveduras isoladas de frutos do café e cacau, nas concentrações de 10^4 e 10^7 células/mL após 7 dias de cultivo

Diâmetro (cm) das colônias de <i>A. carbonarius</i> (2 e 8CSP 3-25) e <i>A. ochraceus</i> (SCM 1.9) e % de inibição do diâmetro				
Leveduras	Cel.mL ⁻¹	2	8CSP3-25	SCM 1.9
<i>Pichia guillermondii</i> UFLA CF 381	10 ⁴	4,80 (41%)	4,83(45%)	1,50(72%)
	10 ⁷	3,03 (63%)	2,53(71%)	0,78 (85%)
<i>Debaryomyces polymorphus</i> UFLA CF 384	10 ⁴	4,67(43%)	4,53(48%)	1,13(79%)
	10 ⁷	2,87(65%)	1,62(82%)	0,83(84%)
<i>Debaryomyces polymorphus</i> UFLA CF 385	10 ⁴	3,23(60%)	3,42(61%)	1,78(67%)
	10 ⁷	2,15(74%)	2,12(76%)	0,77(86%)
<i>Pichia guillermondii</i> UFLA CF 397	10 ⁴	4,73(42%)	3,63(59%)	1,38(74%)
	10 ⁷	3,75(54%)	2,23(75%)	1,05(80%)
<i>Pichia holstii</i> UFLA CF 441 b	10 ⁴	3,57(56%)	4,15(53%)	1,18(78%)
	10 ⁷	2,60(68%)	1,62(82%)	0,77(86%)
<i>Pichia guillermondii</i> UFLA CF 493	10 ⁴	2,17(73%)	2,85(68%)	1,27(76%)
	10 ⁷	2,18(73%)	2,03(77%)	0,70(87%)
<i>Pichia anomala</i> UFLA CF 507	10 ⁴	3,05(63%)	1,78(80%)	1,00(81%)
	10 ⁷	1,77(78%)	1,17(87%)	0,87(84%)

“Tabela 4, continua”

Diâmetro (cm) das colônias de <i>A. carbonarius</i> (2 e 8CSP 3-25) e <i>A. ochraceus</i> (SCM 1.9) e % de inibição do diâmetro				
Leveduras	Cel.mL ⁻¹	2	8CSP3-25	SCM 1.9
<i>Pichia anomala</i> UFLA CF 508	10 ⁴	4,80(41%)	4,50(49%)	1,28(76%)
	10 ⁷	2,92(64%)	2,55(71%)	0,77(86%)
<i>Pichia burtonii</i> UFLA CF 553	10 ⁴	3,12(62%)	1,40(84%)	1,17(78%)
	10 ⁷	2,52(69%)	1,22(86%)	0,85(84%)
<i>Saccharomyces kluyveri</i> UFLA CF 567	10 ⁴	5,57(32%)	5,80(44%)	1,27(76%)
	10 ⁷	5,63(31%)	4,50(49%)	0,93(83%)
<i>Pichia burtonii</i> UFLA CF 605	10 ⁴	4,88(40%)	3,32(62%)	1,48(72%)
	10 ⁷	3,22(60%)	2,55(71%)	0,85(84%)
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF 640	10 ⁴	3,38(58%)	2,85(68%)	1,10(79%)
	10 ⁷	2,13(74%)	1,65(81%)	0,65(88%)
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF 641	10 ⁴	2,55(69%)	2,90(67%)	1,15(79%)
	10 ⁷	2,45(70%)	1,98(77%)	0,90(83%)
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF 642	10 ⁴	2,97(64%)	2,15(76%)	1,18(78%)
	10 ⁷	2,25(72%)	1,13(87%)	1,00(83%)
<i>Debaryomyces polymorphus</i> UFLA CF 650	10 ⁴	2,93(64%)	3,07(65%)	1,10(79%)
	10 ⁷	3,08(62%)	2,28(74%)	0,77(86%)

“Tabela 4, continua”

Diâmetro (cm) das colônias de <i>A. carbonarius</i> (2 e 8CSP 3-25) e <i>A. ochraceus</i> (SCM 1.9) e % de inibição do diâmetro				
Leveduras	Cel.mL ⁻¹	2	8CSP3-25	SCM 1.9
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF 693	10 ⁴	6,67(18%)	5,95(32%)	1,72(68%)
	10 ⁷	4,80(41%)	5,58(36%)	1,03(81%)
<i>Pichia anomala</i> UFLA CF 702	10 ⁴	1,72(79%)	1,70(80%)	1,03(81%)
	10 ⁷	1,10(86%)	0,93(89%)	0,92(83%)
<i>Pichia sydowiorum</i> UFLA CF 732	10 ⁴	2,90(64%)	1,97(78%)	1,33(75%)
	10 ⁷	2,25(72%)	1,20(86%)	1,15(79%)
<i>Pichia sydowiorum</i> UFLA CF 759	10 ⁴	5,12(37%)	3,77(57%)	1,25(77%)
	10 ⁷	2,90(64%)	2,10(76%)	0,80(85%)
<i>Saccharomyces kluyveri</i> UFLA CF 768	10 ⁴	2,77(66%)	1,78(80%)	0,90(83%)
	10 ⁷	2,48(70%)	0,98(89%)	0,60(89%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFLA CF 856	10 ⁴	1,52(81%)	1,73(80%)	0,90(83%)
	10 ⁷	1,65(80%)	1,07(88%)	0,65(88%)
<i>Pichia jadinii</i> UFLA CF 933	10 ⁴	1,92(76%)	2,25(74%)	1,02(81%)
	10 ⁷	1,85(77%)	1,08(88%)	0,72(87%)
<i>Pichia holstii</i> UFLA CF 975 b	10 ⁴	1,78(78%)	1,90(78%)	1,07(80%)
	10 ⁷	1,95(76%)	1,08(88%)	0(100%)

“Tabela 4, continua”

Diâmetro (cm) das colônias de <i>A. carbonarius</i> (2 e 8CSP 3-25) e <i>A. ochraceus</i> (SCM 1.9) e % de inibição do diâmetro				
Leveduras	Cel.mL ⁻¹	2	8CSP3-25	SCM 1.9
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 2.2	10 ⁴	1,90(77%)	1,93(78%)	0,85(84 %)
	10 ⁷	1,75(79%)	0,85(90%)	0,60(89%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFLA YCH 5.5	10 ⁴	3,87(52%)	3,82(56%)	1,22(77%)
	10 ⁷	3,08(62%)	2,55(71%)	0,72(87%)
<i>Debaryomyces etchellsii</i> UFLA YCH 5.56	10 ⁴	2,45(70%)	2,98(66%)	1,15(79%)
	10 ⁷	2,48(70%)	1,70(80%)	0,65(88%)
<i>Pichia fermentans</i> UFLA YCH 16.2	10 ⁴	1,82(70%)	1,75(80%)	0,75(86%)
	10 ⁷	2,32(71%)	1,37(84%)	0,80(85%)
<i>Pichia guilliermondii</i> UFLA YCH 155	10 ⁴	3,10(62%)	2,68(69%)	1,40(74%)
	10 ⁷	2,28(72%)	1,73(80%)	0,92(83%)
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 192	10 ⁴	3,32(59%)	2,85(68%)	0,85(84%)
	10 ⁷	2,25(72%)	1,90(77%)	0,90(83%)
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 194	10 ⁴	2,85(65%)	3,05(65%)	1,32(75%)
	10 ⁷	2,65(67%)	1,82(70%)	0,95(82%)
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 1204	10 ⁴	4,17(49%)	3,65(58%)	0,87(84%)
	10 ⁷	2,08(74%)	2,08(74%)	0,93(83%)

“Tabela 4, conclusão”

Diâmetro (cm) das colônias de <i>A. carbonarius</i> (2 e 8CSP 3-25) e <i>A. ochraceus</i> (SCM 1.9) e % de inibição do diâmetro				
Leveduras	Cel.mL⁻¹	2	8CSP3-25	SCM 1.9
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 1207	10 ⁴	3,38(58%)	2,37(73%)	1,38(74%)
	10 ⁷	2,60(68%)	2,28(74%)	0,92(83%)
Controle	10⁵	8,14	8,78	5,35

Cel. = células

Os resultados de concentração de células de levedura e crescimento vegetativo para *A. ochraceus* condizeram com os que foram relatados por Masoud e Kalsoft (2006) em seus trabalhos, em que o aumento da concentração de células de leveduras de 10⁴ para 10⁶ células/mL promoveu o aumento da inibição sobre o crescimento de *A. ochraceus*, em testes *in vitro*.

Na figura 4, têm-se alguns tratamentos que se destacaram pela inibição do crescimento do fungo.

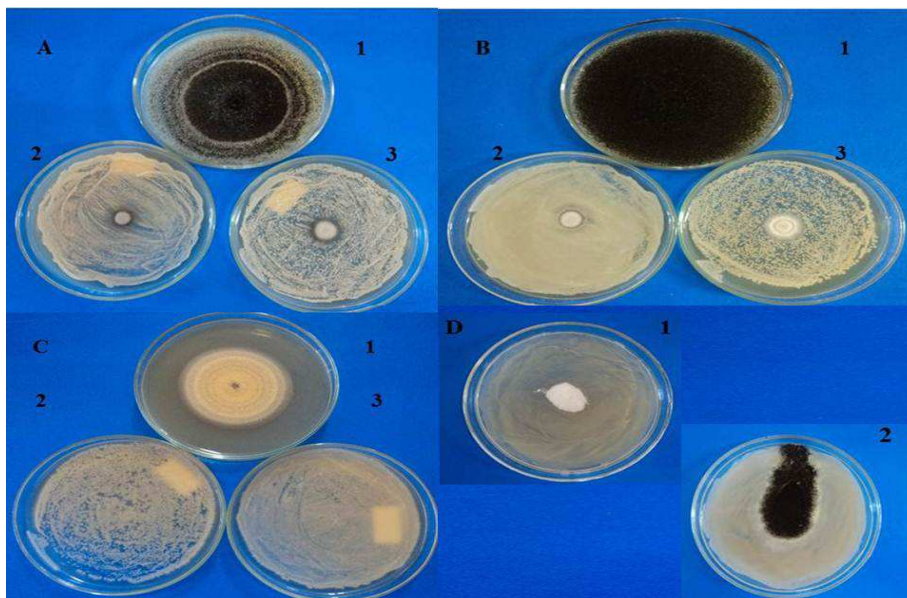


Figura 4 Fotografias dos cocultivos com 7 dias de incubação

Nota: **A.1** controle *Aspergillus carbonarius* 2 (10^5 esporos/mL) sem levedura; **A.2** cocultivo de *Aspergillus carbonarius* 2 (10^5 esporos/mL) e *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CF856 (10^7 células/mL); **A.3** cocultivo de *Aspergillus carbonarius* 2 (10^5 esporos/mL) e *S. cerevisiae* UFLA CF856 (10^4 células/mL); **B.1** controle *A. carbonarius* 8CSP 3-25 (10^5 esporos/mL) sem levedura; **B.2** cocultivo *Aspergillus carbonarius* 8CSP 3-25 (10^5 esporos/mL) e *Pichia burtonni* UFLA CF553 (10^7 células/mL); **B.3** cocultivo *Aspergillus carbonarius* 8CSP 3-25 (10^5 esporos/mL) e *Pichia burtonni* UFLA CF553 (10^4 células/mL); **C.1** controle *Aspergillus ochraceus* SCM1.9 (10^5 esporos/mL) sem levedura; **C.2** cocultivo *Aspergillus ochraceus* SCM1.9 (10^5 esporos/mL) e *Pichia fermentans* YCH16.2 (10^4 células/mL); **C.3** cocultivo *Aspergillus ochraceus* SCM1.9 (10^5 esporos/mL) e *Pichia fermentans* YCH16.2 (10^7 células/mL); **D. 1** cocultivo *Aspergillus carbonarius* -2 (10^5 esporos/mL) e *Debaryomyces hansenii* UFLA CF640 (10^7 células/mL) no meio CYA com a_w 0,94; **D.2** cocultivo *Aspergillus carbonarius* 2 (10^5 esporos/mL) e *Debaryomyces hansenii* UFLA CF640 (10^7 células/mL) no meio CYA com a_w 0,96

A competição por nutrientes é uma das formas de ação de controle biológico por microrganismos. Foi realizado um estudo com *Aureobasidium pullulans* para verificar sua eficácia em controlar *Penicillium expansum* em frutos armazenados. Para isto foram realizados ensaios *in vitro* e o efeito nas porcentagens de germinação de conídios de *P. expansum* foi avaliado após 24

horas de incubação, na presença de concentrações de suco de maçã. Os resultados mostraram que, na ausência da levedura, a germinação dos conídios foi fortemente promovida pelo suco em qualquer concentração, mas quando na presença da levedura a germinação foi significativamente reduzida (BENCHEQROUN et al., 2007).

Segundo Ramos et al. (2010), microrganismos usados como agentes de controle biológico podem agir impedindo que estruturas ou mecanismos de virulência sejam desencadeados sem interferir no crescimento do microrganismo patogênico. No seu trabalho, a inoculação dos isolados de leveduras foi realizada concomitantemente à inoculação dos isolados de fungos filamentosos, distantes 4 cm, permitindo que ambos os isolados se desenvolvessem antes do contato direto da colônia de levedura com a de fungo filamentoso, o que aconteceu, em média, sete dias após a inoculação. Isto poderia justificar o maior efeito inibitório de isolados de leveduras sobre a esporulação do que no desenvolvimento micelial.

Dessa maneira, os resultados encontrados não condizem com os relatos por Ramos et al. (2010), visto que a inoculação dos fungos se deu sob as leveduras que haviam sido inoculadas anteriormente. E como resultado teve-se que tanto a inibição do crescimento micelial quanto da produção de esporos ocorreram na grande maioria dos ensaios.

Observou-se que houve diferença significativa entre as variáveis testadas com interação dupla, ou seja, o grau de inibição do crescimento foi dependente da cepa e da concentração de células das leveduras utilizadas (Tabela 5).

Tabela 5 Análise de variância para a comparação do diâmetro da colônia de fungo com diferentes fontes de variação: levedura, concentração, isolado de fungo

Fonte de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Fungo	2	410,239436	205,119718	449,758	0,0000
Levedura	31	278,063294	8,969784	19,668	0,0000
Concentração (Conc.)	1	82,242227	82,242227	180,329	0,0000
Repetição	2	12,689227	6,344614	13,912	0,0000
Fungo + Levedura	62	118,726120	1,914937	4,199	0,0000
Fungo+ Concentração	2	12,244714	6,122357	13,424	0,0000
Levedura+ Conc.	31	23,787635	0,7673434	1,683	0,0142
Fungo+Levedura+Conc.	62	24,877509	0,401250	0,880	0,7269
Erro	382	174,217439	0,456067		
Total corrigido	575	1137,087600			
CV (%) =	31,31				
Média geral:	2,1572049	Número de observações: 567			

Conc. = Concentração de células de leveduras.

As médias do diâmetro das colônias fúngicas foram diferentes para os três isolados testados ($P < 0.05$) (Tabela 6). O isolado *Aspergillus ochraceus* SCM 1.9 apresentou o menor valor médio do diâmetro representando assim maior efeito inibitório dos isolados de leveduras sobre seu crescimento. O diâmetro da colônia deste isolado foi, em média, 66% menor em relação ao *Aspergillus carbonarius* 2 e 59% em relação ao *Aspergillus carbonarius* 8 CSP3-25.

Tabela 6 Média dos diâmetros das colônias dos três isolados de *Aspergillus* em cocultivo com 32 isolados de leveduras isoladas de frutos do café e cacau

Isolados de fungo	Médias dos diâmetros das colônias
<i>Aspergillus carbonarius</i> - 2	2,98255 a
<i>Aspergillus carbonarius</i> - 8CSP 3-25	2,491146 b
<i>Aspergillus ochraceus</i> - SCM 1.9	0,997917 c

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-knott, a 5% de probabilidade

Em relação à concentração do inóculo de leveduras, as médias do diâmetro das colônias fúngicas foram diferentes para as duas concentrações de leveduras testadas ($P < 0.05$) (Tabela 7). As leveduras na concentração de 10^7 células/mL proporcionaram um potencial efeito inibitório de 30% maior em relação à menor concentração testada. Dessa maneira, pode-se inferir que ocorre diferença no grau de inibição do crescimento fúngico em consideração à concentração de células de leveduras presentes no meio.

Tabela 7 Média dos diâmetros das colônias de *Aspergillus* em relação às duas concentrações de células de leveduras (10^4 e 10^7 células /mL)

Concentração de leveduras (células/mL)	Médias do diâmetro dos fungos
10^4	2,53069 a
10^7	1,779340 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-knott, a 5% de probabilidade

Nos testes de inibição do crescimento de *Aspergillus ochraceus* SCM 1.9, observou-se que, independente do isolado de levedura utilizado, o grau de inibição não se mostrou com diferença significativa ($P < 0.05$) (Tabela 8). Em média houve inibição de 53% em relação ao controle positivo. Opostamente, os

isolados pertencentes à espécie *A. carbonarius* têm diferenças no crescimento dependente do isolado de levedura cocultivada.

Tabela 8 Análise de variância para a comparação do diâmetro da colônia de cada isolado de fungo em relação ao agrupamento das 32 leveduras testadas

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Levedura/ <i>A. carbonarius</i> 2	31	190,639466	6,149660	13,484	0,0000
Levedura/ <i>A. ochraceus</i> SCM 1.9	31	5,848333	0,188656	0,414	0,9980
Levedura/ <i>A. carbonarius</i> 8 CSP 3-25	31	200,301615	6,461342	14,168	0,0000
Erro	382	174,217439	0,456067		

Na Tabela 9, encontra-se o resultado da média dos diâmetros dos três isolados de *Aspergillus* em relação às 32 leveduras que foram utilizadas. Pode-se observar que aquelas leveduras que apresentaram médias seguidas de mesma letra maiúscula, na linha, não diferem estatisticamente entre si em relação ao fungo que foi utilizado no tratamento.

Tabela 9 Média geral e média dos diâmetros das colônias dos três isolados de *Aspergillus* em cocultivo com 32 isolados de leveduras isoladas de frutos do café e cacau

Leveduras	<i>Aspergillus Carbonarius</i>		<i>Aspergillus ochraceus</i>	Média geral (cm)
	2	8CSP3-25	SCM 1.9	
<i>Pichia guilliermondii</i> UFLA CF 381	3,91 bB	3,68 bB	1,14 aD	2,91 b
<i>Debaryomyces polymorphus</i> UFLA CF 384	3,76 bB	3,07 bC	1,00 aD	2,61 b
<i>Debaryomyces polymorphus</i> UFLA CF 385	2,69 bC	2,76 bC	1,35 aD	2,27 c
<i>Pichia guilliermondii</i> UFLA CF 397	4,24 aB	2,93 bC	1,21 aD	2,79 b
<i>Pichia holstii</i> UFLA CF 441.b	3,08 bC	2,88 bC	0,97 aD	2,31 c
<i>Pichia guilliermondii</i> UFLA CF 493	2,17 bD	2,44 bC	0,75 aD	1,79 c
<i>Pichia anomala</i> UFLA CF 507	2,40 bC	1,47 cD	0,95 aD	1,61 d
<i>Pichia anomala</i> UFLA CF 508	3,85 bB	3,52 bB	1,02 aD	2,80 b
<i>Pichia burtonii</i> UFLA CF 553	2,81 bC	1,32 cD	1,00 aD	1,71 d
<i>Saccharomyces kluyveri</i> UFLA CF 567	5,60 bA	5,15 bA	1,10 aD	3,95 a
<i>Pichia burtonii</i> UFLA CF 605	4,05 aB	2,93 cD	1,16 aD	2,71 b
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF 640	2,75 bC	2,25 bC	0,92 aD	1,97 c

“Tabela 9, continua”

Leveduras	<i>Aspergillus Carbonarius</i>		<i>Aspergillus ochraceus</i>	Média geral (cm)
	2	8CSP3-25	SCM 1.9	
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF 641	2,50 bC	2,44 bC	1,00 aD	1,98 c
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF 642	2,60 bC	1,92 bD	1,10 aD	1,88 c
<i>Debaryomyces polymorphus</i> UFLA CF 650	3,00 bC	2,67 bC	0,89 aD	2,19 c
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF 693	5,73 bA	5,76 bA	1,37 aD	4,29 a
<i>Pichia anomala</i> UFLA CF 702	1,48 cD	1,31 cD	0,82 aD	1,20 d
<i>Pichia sydowiorum</i> UFLA CF 732	2,58 bC	1,58 bD	1,24 aD	1,80 c
<i>Pichia sydowiorum</i> UFLA CF 759	4,00 aB	2,93 bC	1,02 aD	2,65 b
<i>Saccharomyces kluyveri</i> UFLA CF 768	2,62 bC	1,38 cD	0,73 aD	1,58 d
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFLA CF 856	1,58 bD	1,40 bD	0,66 aD	1,21 d
<i>Pichia jardinii</i> UFLA CF 933	1,90 bD	1,66 bD	0,88 aD	1,48 d
<i>Pichia hostilii</i> UFLA CF 975.b	1,86 bD	1,49 bD	0,79 aD	1,38 d
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 2.2	1,82 bD	1,39 bD	0,79 aD	1,33 d

“Tabela 9, conclusão”

Leveduras	<i>Aspergillus</i>			Média geral (cm)
	<i>Carbonarius</i>	<i>ochraceus</i>		
	2	8CSP3-25	SCM 1.9	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFLA YCH 5.5	3,47 bB	3,18 bC	1,00 aD	2,55 b
<i>Debaryomyces etchellsii</i> UFLA YCH 5.56	2,46 bC	2,34 bC	0,97 aD	1,92 c
<i>Pichia fermentans</i> UFLA YCH 16.2	2,06 bD	1,55 bD	0,80 aD	1,47 d
<i>Pichia guilliermindii</i> UFLA YCH 155	2,69 bC	2,2 bC	1,15 aD	2,01 c
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 192	2,78 bC	2,37 bC	0,83 aD	1,99 c
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 194	2,75 bC	2,43 bC	1,13 aD	2,10 c
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 1204	3,12 bC	2,86 bC	0,91 aD	2,30 c
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 1207	2,99 bC	2,32 bC	1,15 aD	2,15 c
Média geral	2,98 b	2,49 c	0,99d	-

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott- Knott ($P > 0,05$). Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott ($P > 0,05$).

As leveduras *Debaryomyces polymorphus* UFLA CF384, *Pichia guilliermondii* UFLA CF493, *Debaryomyces hansenii* UFLA CF642, *Pichia sydowiorum* UFLA CF732 e *Pichia guilliermondii* UFLA YCH5.5 apresentaram diferentes graus de inibição em relação aos *Aspergillus carbonarius* (2 e 8CSP 3-25).

Considerando-se as diferentes leveduras com os dois isolados de *A. carbonarius*, observou-se que a inibição é dependente do isolado utilizado. Em parêntesis encontra-se a porcentagem de inibição do crescimento do isolado *A. carbonarius* 8CSP3-25 em relação ao isolado *A. carbonarius* 2, quando utilizado a mesma levedura: *Pichia guilliermondii* UFLA CF397 (31%), *Pichia anomala* UFLA CF507 (39%), *Pichia burtonii* UFLA CF553 (53%), *Pichia burtonii* UFLA CF605 (28%), *Pichia sydowiorum* UFLA CF759 (27%), *Saccharomyces kluyveri* UFLA CF768 (47%). Assim pode-se inferir que a levedura mais eficiente na inibição do crescimento foi *Pichia burtonii* UFLA CF553 (Tabela 9).

As demais leveduras utilizadas em relação aos *A. carbonarius* não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao tamanho do diâmetro da colônia de fungo.

Quando agrupadas todas as leveduras pela concentração de células testadas, 10^4 e 10^7 células/mL ocorreram diferenças significativas (Tabela 10).

Tabela 10 Análise de variância com a comparação das 32 leveduras testadas em relação as duas concentrações testadas (10^4 e 10^7 células/mL)

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Levedura / (10^4 células/ mL)	31	193,505799	6,242123	13,687	0,00
Levedura / (10^7 células /mL)	31	108,345130	3,495004	7,663	0,00
Erro	382	174,217439	0,456067	-	-

Observando os dados da Tabela 11 têm-se que os isolados de levedura *Pichia burtoni* UFLA CF553, *Debaryomyces hansenii* UFLA CF641, *Debaryomyces hansenii* UFLA CF642, *Debaryomyces polymorphus* UFLA CF650, *Saccharomyces kluyveri* UFLA CF768, *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CF856, *Pichia jadinii* UFLA CF933, *Pichia holstii* UFLA CF975b, *Pichia kluyveri* UFLA YCH2.2, *Pichia fermentans* UFLA C 16.2, *Pichia kluyveri* UFLA YCH192, *Pichia kluyveri* UFLA YCH194 e *Pichia kluyveri* UFLA YCH1207 não diferiram estatisticamente entre si em relação às duas concentrações de células utilizadas. Sendo assim, em trabalhos posteriores pode-se utilizar a concentração mais baixa de células, visto que se terá o mesmo efeito inibitório no crescimento micelial desses isolados de *A. carbonarius*.

Tabela 11 Média dos diâmetros nas concentrações (10^4 e 10^7 células/mL) utilizando os 32 isolados de leveduras isoladas de frutos do café e cacau

Leveduras	Concentração (10^4 células/mL)	Concentração (10^7 células /mL)
<i>Pichia guilliermondii</i> UFLA CF 381	3,71 bA	2,11 dB
<i>Debaryomyces polymorphus</i> UFLA CF 384	3,45 bA	1,77dB
<i>Debaryomyces polymorphus</i> UFLA CF 385	2,81 cA	1,73 dB
<i>Pichia guilliermondii</i> UFLA CF 397	3,25 bA	2,34 dB
<i>Pichia holstii</i> UFLA CF 441.b	2,96 cA	1,66 dB
<i>Pichia guilliermondii</i> UFLA CF 493	2,09 dB	1,48 eB

“Tabela 11, continua”

Leveduras	Concentração (10⁴ células/mL)	Concentração (10⁷ células /mL)
<i>Pichia anomala</i> UFLA CF 507	1,95 dA	1,26 eB
<i>Pichia anomala</i> UFLA CF 508	2,52 bA	2,07 dB
<i>Pichia burtonii</i> UFLA CF 553	1,90 eB	1,52 eB
<i>Saccharomyces kluyveri</i> UFLA CF 567	4,21 aB	3,68 cB
<i>Pichia burtonii</i> UFLA CF 605	3,22 bA	2,20 dB
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF 640	2,44 dA	1,51 eB
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF 641	2,20 dB	1,76 dB
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF 642	2,11 dB	1,65 dB
<i>Debaryomyces polymorphus</i> UFLA CF 650	2,36 dB	2,01dB
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF 693	4,77 aA	3,80 cB
<i>Pichia anomala</i> UFLA CF 702	1,53 eA	0,88 eB
<i>Pichia sydowiorum</i> UFLA CF 732	2,06 dB	1,53 eB
<i>Pichia sydowiorum</i> UFLA CF 759	3,37 bA	1,93 dB

“Tabela 11, continua”

Leveduras	Concentração (10⁴ células/mL)	Concentração (10⁷ células /mL)
<i>Saccharomyces kluyveri</i> UFLA CF 768	1,83 eB	1,32 eB
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFLA CF 856	1,38 eB	1,05 eB
<i>Pichia jadinii</i> UFLA CF 933	1,73 eB	1,22 eB
<i>Pichia hostilii</i> UFLA CF 975.b	1,58 eB	1,17 eB
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 2.2	1,56 eB	1,11 eB
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFLA YCH 5.5	2,96 cA	2,13 dB
<i>Debaryomyces etchellsii</i> UFLA YCH 5.56	2,19 dA	1,66 dB
<i>Pichia fermentans</i> UFLA YCH 16.2	1,44 eB	1,51 eB
<i>Pichia guilliermindii</i> UFLA YCH 155	2,39 dA	1,64 dB
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 192	2,33 dA	1,65 dA
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 194	2,40 dA	1,80 dA

“Tabela 11, conclusão”

Leveduras	Concentração (10⁴ células/mL)	Concentração (10⁷ células /mL)
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 1204	2,89 cA	1,71 dB
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 1207	2,37 dB	1,93 dB
Média	3,04 d	1,93 e

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott- knott ($p > 0,05$), análise da concentração em relação à levedura. Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott ($p > 0,05$), análise da levedura em relação à concentração.

Os isolados *Pichia guilliermondii* UFLA CF493, *Saccharomyces kluyveri* UFLA CF567 e *Pichia sydowiorum* UFLA CF732 não apresentaram diferenças estatísticas significativas quando considerado a levedura em relação às duas concentrações utilizadas. Diante disso, a concentração de 10⁷ células /mL é mais efetiva em relação à inibição do crescimento vegetativo dos fungos se comparada à concentração de 10⁴ células/mL. A porcentagem de inibição utilizando à concentração de 10⁷ células/mL foi 29%, 26% e 13%, respectivamente, utilizando-se os isolados leveduriformes *Pichia guilliermondii* UFLA CF493, *Pichia sydowiorum* UFLA CF732 e *Saccharomyces kluyvery* UFLA CF567. Assim, em futuros testes *in vivo*, o ideal será utilizar a concentração de 10⁷ células/mL para obter resultados mais eficazes.

Dessa maneira, há trabalhos que relatam a utilização de microrganismos, como as leveduras, para poder controlar o crescimento e produção de OTA por fungos. Ramos et al (2010), testaram o efeito antagônico dos isolados das espécies *Debaryomyces hansenii* (UFLA CF889 e UFLA CF847) e *Pichia anomala* (UFLA CF710 e UFLA CF951) sobre três fungos filamentosos (*Aspergillus ochraceus*, *A. parasiticus* e *Penicillium roqueforti*). As leveduras

inibiram a esporulação, mas não interferiram no crescimento micelial. Outro resultado observado foi que, utilizando diferentes concentrações celulares das leveduras, eles obtiveram diferentes graus de inibição, trazendo a ideia de que concentração celular inicial do microrganismo antagonista parece ser um dos fatores que interfere no grau de inibição.

Há diferentes mecanismos utilizados pelos agentes antagonistas no controle do crescimento fúngico. Um exemplo é a produção de álcool por *Saccharomyces cerevisiae* (FIALHO et al., 2010). Nesta espécie, a fermentação alcoólica supera a respiração, quando esse microrganismo encontra-se na presença de concentrações elevadas de glicose, mesmo estando em condições de aerobiose. A acumulação de álcool na presença de oxigênio pode ser considerada uma estratégia evolutiva utilizada por algumas leveduras para aumentar a competitividade e assim inibir o desenvolvimento de outros microrganismos (FIALHO et al., 2010; MACLEAN; GUDELJ, 2006; PISKUR et al., 2006; PFEIFFER; SCHUSTER; BONHOEFFER, 2001).

4.2 Avaliação da produção de esporos

Visto que os esporos são estruturas reprodutivas assexuadas de fungos filamentosos e que também podem apresentar acúmulo de toxinas (GUZMÁN-DE-PEÑA; HERRERA, 1997), foi realizada a contagem dessas estruturas neste estudo.

A contagem foi feita utilizando a Câmara de Neubauer. Assim, tanto o controle (placas apenas com o fungo) quanto as placas de leveduras em cocultivo com os fungos foram utilizadas para aferir o número de esporos que haviam crescido nos meios de cultivos. Em relação ao isolado de *A. ochraceus*, após ser realizada a suspensão de esporos e posteriormente observado em microscópio óptico, não foi possível diferenciar os esporos do fungo das células

de leveduras. Os esporos de *A. ochraceus* eram pequenos, ligeiramente lisos e apresentavam a coloração semelhante às leveduras e também aos brotos (células mais jovens das leveduras). Desta maneira, a aferição do grau de inibição da produção de esporos foi realizada quando as leveduras foram cocultivadas com os isolados de *A. carbonarius* 2 e 8 CSP3-25. Os esporos de *A. carbonarius* apresentaram uma coloração marrom escuro a preto e muito rugosos, o que permitia a diferenciação desses em relação às células das leveduras (Figura 5).

Essa coloração preta dos esporos, dos fungos da Seção *Nigri*, confere proteção à luz solar e à radiação UV, fornecendo assim uma vantagem competitiva em regiões de clima quente (PITT; HOCKING, 1997).

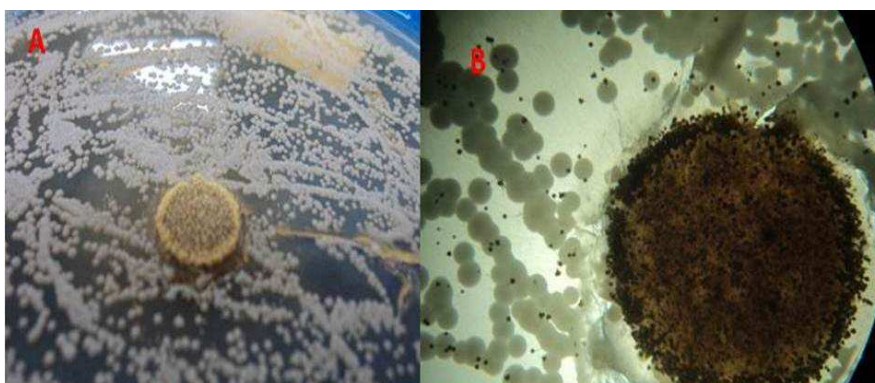


Figura 5 **A-** Levedura - *Pichia sydowiorum* UFLA CF732 em cocultivo com o fungo *A. ochraceus* SCM1.9, evidenciando a esporulação do fungo; **B-** Campo de visão através de uma lupa, sendo possível observar a presença de esporos

Trinta e dois isolados de leveduras, isoladas do café e do cacau, foram testados em duas diferentes concentrações celulares (10^4 e 10^7 células/mL) a fim de se avaliar o potencial na inibição da produção de esporos de *Aspergillus carbonarius* (2 e 8CSP3-2) e *Aspergillus ochraceus* (SCM 1.9), porém no

isolado SCM 1.9, não foi possível fazer essa avaliação. O grau de inibição foi determinado considerando-se o controle positivo como 100% (Tabela 12).

Tabela 12 Somatório do número de esporos em log/mL e % de inibição da produção de esporos dos isolados de *A. carbonarius* (2 e 8CSP3-25), em relação as 32 cepas de leveduras isoladas de frutos do café e do cacau, nas concentrações de 10^4 e 10^7 células /mL

Σ do número de esporos em log/mL e % de inibição da produção de esporos dos isolados de <i>A. carbonarius</i> (2 e 8CSP 3-25)			
Leveduras	Cel. mL⁻¹	2	8CSP 3-25
<i>Pichia guillermondii</i> UFLA CF 381	10^4	6,26 (13,12%)	6,52 (3,84)
	10^7	5,64 (21,70%)	5,77 (14,90%)
<i>Debaryomyces polymorphus</i> UFLA CF 384	10^4	6,53 (9,21%)	6,49 (4,28%)
	10^7	6,83 (4,73%)	0 (100%)
<i>Debaryomyces polymorphus</i> UFLA CF 385	10^4	6,56 (8,94%)	6,57 (3,10%)
	10^7	6,49 (9,87%)	6,14 (9,44%)
<i>Pichia guillermondii</i> UFLA CF 397	10^4	6,64 (7,85%)	6,25 (7,82%)
	10^7	6,01 (16,53%)	6,01 (11,36%)
<i>Pichia holstii</i> UFLA CF 441 b	10^4	7,00 (2,73%)	6,54 (3,54%)
	10^7	6,81 (5,42%)	0 (100%)
<i>Pichia guillermondii</i> UFLA CF 493	10^4	6,09 (15,42%)	6,53 (3,69%)
	10^7	6,09 (15,42%)	6,24 (7,97%)

“Tabela 12, continua”

Σ do número de esporos em log/mL e % de inibição da produção de esporos dos isolados de <i>A. carbonarius</i> (2 e 8CSP 3-25)			
Leveduras	Cel.mL ⁻¹	2	8CSP 3-25
<i>Pichia anomala</i> UFLA CF 507	10 ⁴	5,92 (17,71%)	0 (100%)
	10 ⁷	0 (100%)	0 (100%)
<i>Pichia anomala</i> UFLA CF 508	10 ⁴	6,51 (9,59%)	6,58 (2,95%)
	10 ⁷	6,27 (12,91%)	6,55 (3,40%)
<i>Pichia burtonii</i> UFLA CF 553	10 ⁴	6,47 (10,14%)	0 (100%)
	10 ⁷	6,46 (10,28%)	0 (100%)
<i>Saccharomyces kluyveri</i> UFLA CF 567	10 ⁴	6,81 (5,42%)	0 (100%)
	10 ⁷	6,13 (14,87%)	6,56 (3,15%)
<i>Pichia burtonii</i> UFLA CF 605	10 ⁴	7,01 (2,63%)	6,70 (1,18%)
	10 ⁷	6,66 (7,50%)	6,28 (7,38%)
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF 640	10 ⁴	6,40 (11,12%)	6,52 (3,83%)
	10 ⁷	6,20 (13,88%)	6,17 (9,00%)
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF 641	10 ⁴	5,67 (20,00%)	6,38 (5,90%)
	10 ⁷	6,25 (13,20%)	6,77 (0,15%)
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF 642	10 ⁴	5,93 (17,64%)	6,51 (3,99%)
	10 ⁷	5,90 (18,06%)	0 (100%)

“Tabela 12, continua”

Σ do número de esporos em log/mL e % de inibição da produção de esporos dos isolados de <i>A. carbonarius</i> (2 e 8CSP 3-25)			
Leveduras	Cel. mL ⁻¹	2	8CSP 3-25
<i>Debaryomyces polymorphus</i> UFLA CF 650	10 ⁴	5,48 (18,75%)	6,62 (2,36%)
	10 ⁷	6,07 (15,70%)	5,87 (13,43%)
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF 693	10 ⁴	6,85 (4,87%)	6,83 (8,62%)
	10 ⁷	6,69 (7,08%)	6,51 (3,99%)
<i>Pichia anomala</i> UFLA CF 702	10 ⁴	0 (100%)	0 (100%)
	10 ⁷	5,77 (100%)	0 (100%)
<i>Pichia sydowiorum</i> UFLA CF 732	10 ⁴	6,11 (15,14%)	6,14 (9,44%)
	10 ⁷	6,23 (13,47%)	0 (100%)
<i>Pichia sydowiorum</i> UFLA CF 759	10 ⁴	6,47 (10,14%)	6,53 (3,69%)
	10 ⁷	5,97 (17,09%)	0 (100%)
<i>Saccharomyces kluyveri</i> UFLA CF 768	10 ⁴	6,59 (8,47%)	6,51 (3,99%)
	10 ⁷	0 (100%)	0 (100%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFLA CF 856	10 ⁴	0 (100%)	0 (100%)
	10 ⁷	0 (100%)	0 (100%)
<i>Pichia jadinii</i> UFLA CF 933	10 ⁴	5,30 (26,39%)	0 (100%)
	10 ⁷	0 (100%)	0 (100%)

“Tabela 12, continua”

Σ do número de esporos em log/mL e % de inibição da produção de esporos dos isolados de <i>A. carbonarius</i> (2 e 8CSP 3-25)			
Leveduras	Cel.mL⁻¹	2	8CSP 3-25
<i>Pichia holstii</i> UFLA CF 975 b	10 ⁴	0 (100%)	0 (100%)
	10 ⁷	0 (100%)	0 (100%)
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 2.2	10 ⁴	4,69 (34,86%)	0 (100%)
	10 ⁷	5,71 (20,70%)	0 (100%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFLA YCH 5.5	10 ⁴	6,53 (9,31%)	6,34 (6,49%)
	10 ⁷	6,52 (9,44%)	6,47 (4,58%)
<i>Debaryomyces etchellsii</i> UFLA CF 5.56	10 ⁴	5,65 (21,53%)	0 (100%)
	10 ⁷	6,43 (10,70%)	0 (100%)
<i>Pichia fermentans</i> UFLA YCH 16.2	10 ⁴	5,32 (26,11%)	0 (100%)
	10 ⁷	5,98 (16,95%)	6,35 (6,35%)
<i>Pichia guilliermondii</i> UFLA YCH 155	10 ⁴	6,58 (8,62%)	6,07 (10,48%)
	10 ⁷	6,24 (13,33%)	5,77 (14,90%)
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 192	10 ⁴	6,83 (5,14%)	5,65 (16,67%)
	10 ⁷	6,14 (14,37%)	5,53 (18,44%)
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 194	10 ⁴	6,91 (4,02%)	6,81 (0,00%)
	10 ⁷	6,41 (10,98%)	6,90 (0,00%)

“Tabela 12, conclusão”

Σ do número de esporos em log/mL e % de inibição da produção de esporos dos isolados de <i>A. carbonarius</i> (2 e 8CSP 3-25)			
Leveduras	Cel.mL⁻¹	2	8CSP 3-25
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 1204	10 ⁴	6,41 (10,98%)	6,31 (6,94%)
	10 ⁷	6,62 (8,06%)	6,32 (6,79%)
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 1207	10 ⁴	7,12 (1,12%)	0 (100%)
	10 ⁷	6,97 (3,20%)	6,47 (4,58%)
Controle	10 ⁵	7,20 (0,00%)	6,78 (0,00%)

Σ = somatório

A produção de esporos foi dependente da espécie fúngica e do isolado e concentração de células das diferentes leveduras testadas (P<0.05). Não houve diferença significativa nas interações entre os fatores avaliados (Tabela 13).

Tabela 13 Análise de variância para a produção de esporos considerando-se o isolado e concentração de células de leveduras testadas e a espécie fúngica

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Fungo	1	201,361784	201,361784	31,912	0,0000
Levedura	31	1197,424471	38,626596	6,122	0,0000
Concentração (Con.)	1	67,594875	67,594875	10,712	0,0012
Repetição	2	271,108707	135,554353	21,483	0,0000
Fungo + Levedura	31	196,896425	6,351498	1,007	0,4623
Fungo + con.	1	0,034694	0,034694	0,005	0,9409
Levedura + com.	31	227,715066	7,345647	1,164	0,2595
Fungo+Levedura+Con.	31	159,970014	5,160323	0,818	0,7440
Erro	254	1602,721627	6,309928	-	-
Total corrigido	383	3924,827662	-	-	-

CV(%) = 74,79

Média geral: 3,1610677 Número de observações: 384

Conc= Concentração de células de leveduras

A média do número de esporos, em log/mL, foi diferente para os dois isolados testados ($p < 0,05$) (Tabela 14). O isolado *Aspergillus carbonarius* 2 apresentou produção de esporos 38% superior comparado com o isolado *A. carbonarius* 8CSP 3-25 indicando que para o primeiro isolado houve menor grau de inibição pelos isolados de leveduras.

Tabela 14 Média geral do número de esporos em log/mL em relação aos dois isolados de *A. carbonarius* (isolado 2 e 8CSP 3-25)

Isolado de Fungo	Média (número de esporos em log ₁₀ /mL)
Isolado 2	3,885208 a
8CSP 3-25	2,436927 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-knott, a 5% de probabilidade.

Observa-se, na Tabela 15, a média geral da produção de esporos (log esporos /mL), após sete dias de incubação em BOD a 28 °C, em relação às duas concentrações de leveduras (10^4 e 10^7 células/mL) ($P < 0,05$). Infere-se que as leveduras na concentração de 10^7 células /mL apresentaram um potencial efeito inibitório na produção de esporos, apresentando assim um melhor controle dessa produção. Pode-se inferir que ocorreu diferença no grau de inibição sobre a espécie de fungo levando-se em consideração a concentração de células de leveduras presentes no meio. Dessa maneira a concentração 10^7 células /mL, é a mais viável para inibir ou reduzir a produção de esporos independente do isolado leveduriforme.

Tabela 15 Média geral do número de esporos (log esporos /mL) em relação a 32 leveduras testadas nas concentrações 10^4 e 10^7 células /mL

Concentração de leveduras (células/mL)	log esporos/mL
10^4	3,741510 a
10^7	2,741510 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-knott, a 5% de probabilidade

Os diferentes isolados de leveduras mostraram diferenças quanto ao grau de inibição da produção de esporos, refletindo em menor ou maior grau de controle da produção (Tabela 16). O controle da produção de esporos é um fator interessante, pois além deles serem estruturas que produzem e acumulam toxinas, são agentes de dispersão da espécie (GUZMÁN-DE-PEÑA; HERRERA, 1997). Em se tratando da cultura do café, o controle da produção de esporos reflete diretamente a disseminação deste fungo na lavoura e safra do ano, bem como no possível comprometimento da safra seguinte, decrescendo a qualidade sanitária do produto. A falta de controle da qualidade sanitária reflete

diretamente na saúde do consumidor e nas taxas de exportação deste produto (DUARTE; PENA; LINO, 2009; SILVA et al., 2008).

Tabela 16 % de inibição da produção de esporos dos isolados de *A.carbonarius* com as 32 testadas nas duas concentrações celulares

Leveduras	<i>A. carbonarius</i> 2		<i>A. carbonarius</i> 8CSP		Análise estatística
	3-25		3-25		
	células /mL		células /mL		Médias
	10 ⁴	10 ⁷	10 ⁴	10 ⁷	
<i>Pichia guilliermondii</i> UFLA CF 381	13,12	21,70	3,84	14,90	4,6183 a
<i>Debaryomyces polymorphus</i> UFLA CF 384	9,21	4,73	4,28	100	3,2841 b
<i>Debaryomyces polymorphus</i> UFLA CF 385	8,94	9,87	3,10	9,44	4,8416 a
<i>Pichia guilliermondii</i> UFLA CF 397	7,85	16,53	7,82	11,36	5,2075 a
<i>Pichia holstii</i> UFLA CF 441.b	2,73	5,42	3,54	100	3,3941 b
<i>Pichia guilliermondii</i> UFLA CF 493	15,42	15,42	3,69	7,97	4,6841 a
<i>Pichia anomala</i> UFLA CF 507	17,47	100	100	100	0,9866 c
<i>Pichia anomala</i> UFLA CF 508	9,59	12,91	2,95	3,40	5,3933 a
<i>Pichia burtonii</i> UFLA CF 553	10,14	10,28	100	100	1,6150 c
<i>Saccharomyces kluyveri</i> UFLA CF 567	5,42	14,87	100	3,25	5,4600 a

“Tabela 16, continua”

Leveduras	<i>A. carbonarius</i> 2		<i>A. carbonarius</i> 8CSP 3-25		Análise estatística
	células /mL		células /mL		Médias
	10^4	10^7	10^4	10^7	
<i>Pichia burtonii</i> UFLA CF 605	2,63	7,5	1,18	7,38	3,3300 b
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF 640	11,12	13,88	3,83	9,00	4,2375 b
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF 641	20,00	13,20	5,90	0,15	4,6358 a
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF 642	17,64	18,06	3,99	100	2,4875 c
<i>Debaryomyces polymorphus</i> UFLA CF 650	18,75	15,70	2,36	13,43	3,5816 b
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF 693	4,87	7,08	100	3,99	6,1841 a
<i>Pichia anomala</i> UFLA CF 702	100	19,87	100	100	0,4816 c
<i>Pichia sydowiorum</i> UFLA CF 732	15,14	13,47	9,44	100	1,5408 c
<i>Pichia sydowiorum</i> UFLA CF 759	10,14	17,09	3,69	100	3,7008 b
<i>Saccharomyces kluyveri</i> UFLA CF 768	8,47	100	3,99	100	0,5491 c
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFLA CF 856	100	100	100	100	0,000 c
<i>Pichia jardinii</i> UFLA CF 933	26,39	100	100	100	0,4416 c

“Tabela 16, conclusão”

Leveduras	<i>A. carbonarius</i> 2		<i>A. carbonarius</i> 8CSP 3-25		Análise
	células /mL		células /mL		estatística
	10^4	10^7	10^4	10^7	Médias
<i>Pichia hostilii</i> UFLA CF 975.b	100	100	100	100	0,0000 c
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 2.2	34,86	20,70	100	100	1,3441 c
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFLA YCH 5.5	9,31	9,44	6,49	4,58	5,4008 a
<i>Debaryomyces etchellsii</i> UFLA YCH 5.56	21,53	10,70	100	100	2,5541 c
<i>Pichia fermentans</i> UFLA YCH 16.2	26,11	16,95	100	6,35	3,4416 b
<i>Pichia guilliermindii</i> UFLA YCH 155	8,62	13,33	10,48	14,90	4,1833 b
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 192	5,14	14,73	16,67	18,44	3,0475 b
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 194	4,02	10,98	0	0	3,3658 b
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 1204	10,98	8,06	6,94	6,79	4,8508 a
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 1207	1,12	3,20	100	4,58	2,3100 c

De acordo com os dados da Tabela 16, as leveduras *Pichia kluyveri* UFLA YCH2.2, *Pichia jadinii* UFLA CF933 e *Pichia fermentans* UFLA YCH16.2, na concentração de 10^4 células/mL, apresentaram maior efeito inibitório sendo de 35%, 26% e 26%, respectivamente, sobre a produção de

esporos de *Aspergillus carbonarius* 2. Em relação à concentração de 10^7 células/mL para esse mesmo isolado de fungo, as leveduras que se destacaram foram *Pichia guilliermondi* UFLA CF381 (22% de inibição) e *Pichia kluyveri* UFLA YCH2.2 (21%). O isolado *Pichia kluyveri* UFLA YCH2.2 foi eficiente na inibição da produção de esporos, em ambas as concentrações celulares testadas. Desta maneira, o ideal em futuros trabalhos é utilizar este isolado na menor concentração de células.

Em relação à inibição de produção de esporos de *A. carbonarius* 8CSP 3-25, a levedura *Pichia kluyveri* UFLA YCH192 quando na concentração de 10^4 células/mL e *Pichia guilliermondii* UFLA YCH155, *Pichia kluyveri* UFLA YCH192, *Pichia guilliermondii* UFLA CF381, *Pichia guilliermondii* UFLA YCH 155, *Debaryomyces polymorphus* UFLA CF650 e *Pichia guilliermondii* UFLA CF397 na concentração de 10^7 células/mL apresentaram maior efeito inibitório de 17, 10, 18, 15, 15, 13 e 11%, respectivamente. Pode-se concluir que as leveduras do gênero *Pichia* foram as que apresentaram os melhores resultados em relação à inibição da produção de esporos.

O problema da contaminação de micotoxinas se deve à produção de esporos pelos fungos que são potencialmente toxigênicos. Assim, dentre os vários produtos agrícolas, o café é um dos principais afetados. Segundo Taniwaki et al. (2003), a comercialização e também o consumo de frutos de cafés que foram produzidos no Brasil sofreram algumas restrições no mercado mundial e esse fato foi devido a frequentes contaminações causadas por fungos toxigênicos e por micotoxinas.

A ação antagonista que algumas espécies de leveduras exercem sobre o desenvolvimento de fungos filamentosos tem sido explorada por alguns autores, especialmente para utilização em grãos armazenados (MASOUD; KALTOF, 2006; PETERSSON; SCHNÜRER, 1998; PETERSSON et al., 1999).

As leveduras *Pichia anomala*, *Debaryomyces hansenii* e outras espécies dos gêneros *Saccharomyces*, *Candida* e *Zygosaccharomyces* já foram relatadas em literatura, quanto ao potencial de descontaminação de alimentos contaminados com Aflatoxina B1, por meio da adsorção destas moléculas (SHETTY; JESPERSEN, 2006). Sendo assim, pode-se concluir que essas leveduras dos gêneros *Pichia* e *Debaryomyces*, que apresentaram alto grau de inibição da produção de esporos, são candidatas a futuros estudos, podendo assim realizar testes *in situ* com alimentos que são prováveis contaminantes de OTA, como ocorre com o café, as uvas, entre outros frutos.

Algumas leveduras não apresentaram efeito antagônico quanto à produção de esporos, por exemplo, o isolado *Pichia kluyvery* UFLA YCH194. Dessa maneira, essas leveduras não são indicadas como agentes de biocontrole de *A. carbonarius*.

4.3 Determinação da presença de ocratoxina A pelo método Plug Agar em meio sintético com diferentes níveis de atividade de água (a_w)

A atividade de água (a_w) pode ser um dos fatores mais críticos que influencia no crescimento, germinação e também no estabelecimento dos fungos em substratos ricos em nutrientes (BOURAS; KIM; STRELKOV, 2009).

Assim, realizou-se o cultivo dos isolados em meios com diferentes atividades de água e após sete dias de incubação a 28 °C foi avaliada a produção da Ocratoxina A, através da Cromatografia de Camada Delgada (CCD).

A Figura 6 exemplifica um dos resultados da análise de CCD.

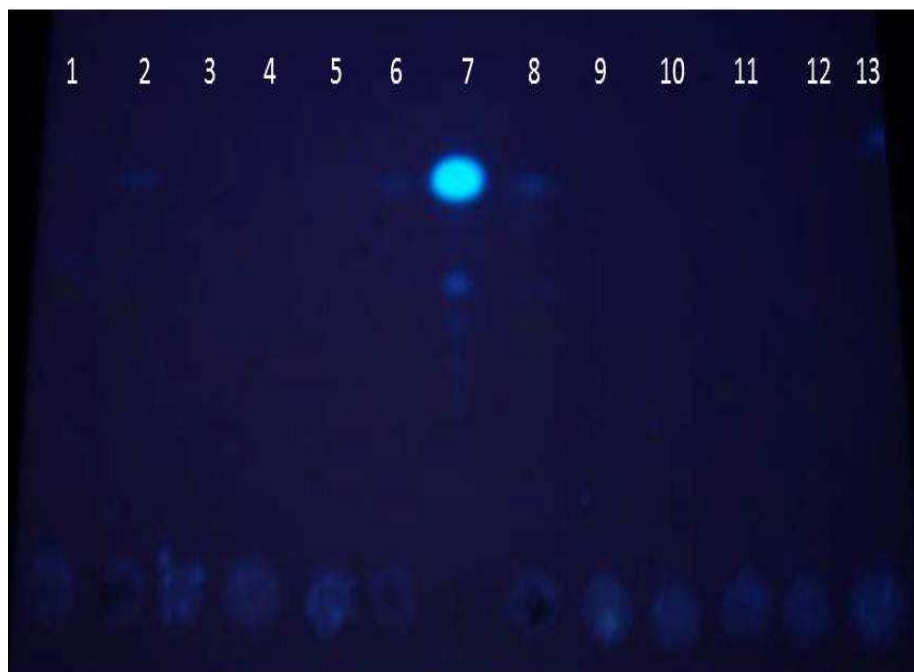


Figura 6 Fotografia da CCD evidenciando a presença e ausência de OTA nos diversos tratamentos

Nota: Spot 2- cocultivo de *Aspergillus carbonarius* 2 (10^5 esporos/mL) e *Debaryomyces hansenii* UFLA CF693 (10^4 células/mL); Spot 6- controle de *Aspergillus carbonarius* 2 (10^5 esporos/mL); Spot 7- padrão da OTA-20 μ L; Spot 8- controle de *A. carbonarius* 8CSP3-25 (10^5 esporos/mL); Spot 13- cocultivo de *A. carbonarius* 8CSP3-25 (10^5 esporos/mL) e *Pichia sydowiorum* UFLA CF759 (10^7 células/mL); os demais spots não houve a produção da micotoxina.

A produção de OTA era claramente dependente do fungo em estudo e influenciada pelas diferentes leveduras utilizadas em cocultivos com os fungos, dependendo assim da concentração de células de leveduras inoculadas. Todos os dois fungos controles, *A. carbonarius* (2 e 8CSP3-25) produziram OTA, apesar de ter apresentado uma intensidade menor se comparado ao padrão da OTA, quando cultivados no meio YES (Figura 6), geralmente esse meio de cultivo é considerado como um meio muito favorável para a biossíntese da OTA (PITT,

1997), devido à grande quantidade de sacarose presente. Além do meio YES faz-se também o uso do meio CYA (PITT, 1997).

Há divergência em alguns casos em relação à produção de OTA pelo gênero *Aspergillus*, o que sugere que a síntese desta micotoxina é dependente da interação de vários fatores ambientais e não apenas do crescimento, ou seja, a incapacidade de produzir OTA em algumas determinadas condições não justifica assim qualquer conclusão sobre a habilidade geral para a produção da micotoxina (MÜHLENCOERT et al., 2004).

A produção de micotoxinas, muitas vezes, pode ser influenciada por fatores ambientais que irão regular não só os genes como também as enzimas envolvidas na produção de ocratoxina A (MÜHLENCOERT et al., 2004).

A presença de microbiota competitiva e a composição do substrato são fatores que interferem na contaminação por espécies de *Aspergillus* e na produção de OTA, além dos fatores ambientais, (KHALESIA; KHATIB, 2011; RAMOS et al., 1998).

De acordo com dados da Tabela 17, o isolado *Pichia guilliermondii* UFLA CF493 (10^7 células/mL) foi capaz de inibir a produção da OTA, quando cocultivado com o fungo no meio CYA com a_w de 0,984 e 0,939, porém não na a_w de 0,96. O isolado *Pichia sydowiorum* UFLA CF759 (10^7 células/mL) foi capaz de inibir a produção da OTA, quando cocultivado com o fungo no meio CYA com a_w de 0,939, porém não nos meios com a_w de 0,984 e 0,96.

As demais leveduras *Pichia anomala* UFLA CF507, *Pichia burtonii* UFLA CF553, *Pichia anomala* UFLA CF702, *Saccharomyces kluyveri* UFLA CF768, *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CF856, ambas na concentração de 10^4 células/mL, *Debaryomyces hansenii* UFLA CF693, *Saccharomyces kluyveri* UFLA CF768, *Pichia kluyveri* UFLA YCH2.2, ambas na concentração de 10^7 células/mL, foram eficientes na inibição da produção de OTA, em todos os meios com a_w de 0,984, 0,96 e 0,939.

Tabela 17 Avaliação da produção de OTA pelo isolado *A. carbonarius* 8CSP 3-25 em cocultivo com diferentes isolados de leveduras (10^4 e 10^7 células /mL) cultivados em meio CYA com diferentes teores de atividade de água (a_w)

<i>Aspergillus carbonarius</i> 8 CSP 3-25				
Levedura	Células /mL	Meio CYA		
		0,984 a_w	0,960 a_w	0,939 a_w
<i>Pichia anomala</i> UFLA CF 507	10^4	-	-	-
<i>Pichia burtonii</i> UFLA CF 553	10^4	-	-	-
<i>Pichia anomala</i> UFLA CF 702	10^4	-	-	-
<i>Saccharomyces kluyveri</i> UFLA CF 768	10^4	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFLA CF 856	10^4	-	-	-
<i>Pichia guilliermondii</i> UFLA CF 493	10^7	-	+	-
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF 640	10^7	-	-	+
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF 693	10^7	-	-	-
<i>Pichia sydowirum</i> UFLA CF 759	10^7	++	+	-
<i>Saccharomyces kluyveri</i> UFLA CF 768	10^7	-	-	-
<i>Aspergillus carbonarius</i> 8 CSP 3-25 (Controle)	10^5	++	-	-

Sinal -: ausência de produção de OTA; sinal + e ++: produção da OTA em diferentes intensidades, quando comparado ao padrão OTA

Em relação ao controle de *Aspergillus carbonarius* 8CSP3-25, o fator a_w do meio interferiu na produção da OTA estando essa micotoxina presente apenas no meio com 0,984 a_w (Tabela 17).

Os controles de *Aspergillus carbonarius* (8CSP 3-25 e 2) (Tabela 17 e 18) apresentaram a mesma resposta em relação à produção de OTA nos três meios com diferentes a_w , ou seja, produziram a micotoxina quando cultivados em meios com 0,984 a_w e ausência da OTA em meios com 0,960 e 0,939 a_w .

Tabela 18 Avaliação da produção de OTA pelo isolado *A. carbonarius* 2 em cocultivo com diferentes isolados de leveduras (10^4 e 10^7 células/mL) cultivados em meio CYA com diferentes teores de atividade de água (a_w)

<i>Aspergillus carbonarius</i> 2				
Levedura	Células /mL	Meio CYA		
		0,984 a_w	0,960 a_w	0,939 a_w
<i>Pichia guillermondii</i> UFLA CF 493	10^4	-	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF 693	10^4	++	-	-
<i>Pichia anomala</i> UFLA CF 702	10^4	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFLA CF 856	10^4	-	-	-
<i>Pichia holstii</i> UFLA CF 975b	10^4	-	-	-
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH 2.2	10^4	-	-	-
<i>Pichia fermentans</i> UFLA YCH 16.2	10^4	-	-	-

“Tabela 18, conclusão”

<i>Aspergillus carbonarius</i> 2				
Levedura	Células /mL	Meio CYA		
		0,984 a _w	0,960 a _w	0,939 a _w
<i>Debaryomyces polymorphus</i> UFLA CF 385	10 ⁷	-	++	-
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF 640	10 ⁷	-	++	+
<i>Pichia anomala</i> UFLA CF 702	10 ⁷	++	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFLA CF 856	10 ⁷	-	-	-
<i>Pichia jardinii</i> UFLA CF 933	10 ⁷	-	-	-
<i>Aspergillus carbonarius</i> Controle 2	10 ⁵	+++	-	-

Sinal -: ausência de produção de OTA; sinal ++ e +++: produção da OTA em diferentes intensidades, quando comparado ao padrão OTA

Em relação ao controle de *Aspergillus carbonarius* 2, o fator a_w do meio interferiu na produção da OTA estando essa micotoxina presente apenas no meio com 0,984 a_w (Tabela 18).

As cepas *Debaryomyces hansenii* UFLA CF693 (10⁴ células/mL) e *Pichia anomala* UFLA CF702 (10⁷ células/mL), de acordo com os dados da Tabela 18, foram capazes de inibir a produção da OTA, quando cocultivadas com o fungo no meio CYA com a_w de 0,96 e 0,939, porém não na a_w de 0,98. Coincidindo assim com o resultado encontrado para o controle, apesar do fator de retenção do controle ter sido mais evidente se comparado com o fungo em cocultivo com as leveduras.

As leveduras *Debaryomyces polymorphus* UFLA CF385 e *D. hansenii* UFLA CF640 ambas na concentração de 10^7 células/mL, não foram capazes de inibir a produção da OTA, quando cocultivadas com o fungo no meio CYA com a_w de 0,96, sendo que a segunda não foi eficiente também no meio com a_w de 0,939, apesar do fator de retenção da OTA ter sido menos intenso.

O efeito da atividade de água (a_w) e da temperatura no crescimento e produção de OTA por espécies de *Aspergillus carbonarius* isolados de vinhedos europeus e australianos foi avaliado em diversos estudos (BELLÍ et al., 2007; CABRERA-PALACIOS et al., 2005; ESTEBAN et al., 2006; LEONG et al., 2006; OUESLATI et al., 2010; VALERO et al., 2007). Nestes estudos, observou-se, em geral, que as condições favoráveis para o crescimento desta espécie ocorrem nas faixas de 25 a 35 °C e em a_w entre 0,95 a 0,99, e a condição ótima para a produção da OTA ocorre no intervalo de 15 a 20 °C e 0,95 a 0,98 a_w .

Assim, os resultados deste trabalho condizem com resultados já citados na literatura, visto que ambos os *A. carbonarius* (isolado 2 e 8CSP 3-25) foram capazes de crescer no meio com 0,984 a_w e produzirem a OTA nessa condição

Tassou et al. (2007) avaliaram o efeito da temperatura e da atividade de água (a_w) na taxa de crescimento e produção de OTA *in vitro* de dois isolados de *Aspergillus carbonarius*, na Grécia. Esses autores observaram que os dois isolados cresceram a 30 – 35 °C e a_w de 0,96, enquanto que a produção máxima de OTA ocorreu em condições subótimas de crescimento (15 – 20 °C) e a_w entre 0,93 e 0,96. Dessa maneira, condiz com alguns resultados que foram encontrados visto que as leveduras *Pichia guilliermondii* UFLA CF493 e *Pichia sydowiorum* UFLA CF759, crescidas em cocultivo com *Aspergillus carbonarius* 8CSP3-25, produziram OTA nos meios com 0,96 a_w . E para *Aspergillus carbonarius* 2 juntamente com as leveduras *Debaryomyces polymorphus* UFLA CF385 e *D. hansenii* UFLC CF640 também produziram OTA no meio com a

mesma atividade de água. Assim, pode-se dizer que essas leveduras não seriam boas para inibir a produção de OTA em fungos da espécie *Aspergillus carbonarius*.

Pode-se inferir que os isolados *Saccharomyces klyveri* UFLA CF567 (10^4 células/mL), no meio YES com 0,964 a_w e o isolado *Debaryomyces hansenii* UFLA CF693 (10^7 células/mL), no meio YES com 0,945 a_w , não foram eficientes para inibir a produção da OTA (Tabela 19).

Os demais isolados de leveduras, nas suas devidas concentrações, foram capazes de inibir a produção da OTA produzida por SCM 1.9 (*Aspergillus ochraceus*).

Segundo estudos, a espécie *Aspergillus ochraceus*, produtora de ocratoxina em café, desenvolve-se em temperatura entre 8 °C e 37 °C , sendo que a temperatura ótima está na faixa de 24 - 31 °C, com a atividade de água mínima de 0,76 a 25 °C, sendo que a_w ótima está na faixa de 0,95 - 0,99 e pH entre 3-10 (PALACIOS-CABRERA et al., 2005; PITT; HOCKING, 1997).

Apesar da espécie *A. ochraceus* desenvolver-se a partir de 0,76 de atividade de água, a OTA é produzida a partir de 0,85, sendo a_w ótima de 0,97. Com relação ao fator temperatura na qual ocorre a produção da toxina, essa se situa entre 12 °C e 37 °C, sendo que a ótima é de 25 °C e o pH ótimo de produção encontra-se entre 5 - 6 (MOSS, 1996).

Tabela 19 Avaliação da produção de OTA pelo isolado *A. ochraceus* SCM 1.9 em cocultivo com diferentes isolados de leveduras (10^4 e 10^7 células/mL) cultivados em meio YES com diferentes teores de atividade de água (a_w)

<i>Aspergillus ochraceus</i> SCM 1.9				
Meio YES				
Levedura	Células /mL	0,976 a_w	0,964 a_w	0,945 a_w
<i>Pichia guilliermondii</i> UFLA CF381	10^4	-	-	-
<i>Pichia burtoni</i> UFLA CF553	10^4	-	-	-
<i>Saccharomyces kluyveri</i> UFLA CF567	10^4	-	++	-
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF693	10^4	-	-	-
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH155	10^4	-	-	-
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH192	10^4	-	-	-
<i>Pichia kluyveri</i> UFLA YCH1204	10^4	-	-	-
<i>Saccharomyces kluyveri</i> UFLA CF567	10^7	-	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFLA CF693	10^7	-	-	+
<i>Aspergillus ochraceus</i> Controle SCM 1.9	10^5	+++	-	-

Sinal -: ausência de produção de OTA; sinal +, ++ e +++: produção da OTA em diferentes intensidades, quando comparado ao padrão OTA

A atividade de água realmente é um fator que influencia na produção da OTA, uma vez que no controle a presença da toxina foi detectada somente quando o fungo foi cultivado em meio de cultura com 0,976 de a_w .

Diante desses resultados da produção de OTA, podemos observar que *A. ochraceus* é mais sensível do que *A. carbonarius*, ou seja, menos competitivo.

4.4 Aferição do pH

O crescimento fúngico e a produção de micotoxinas dependem de uma complexa interação entre diversos fatores, tais como atividade de água (a_w), temperatura, fatores nutricionais, pH, tipos de produtos alimentares, tempo de armazenamento, dentre outros fatores (ANLI; ALKIS, 2010; GARCIA et al., 2011; LASRAM et al., 2010; PATERSON; LIMA, 2010).

Ao aferir o pH dos meios de cultivo com os isolados fúngicos cocultivados com as leveduras, pôde-se observar que houve diferença nos valores de pH.

É possível observar diferença no crescimento e produção de esporos de *Aspergillus carbonarius* 2 (10^5 células/mL) cocultivado com *Pichia burtonii* UFLA CF605 em pH 2 e em pH 4 (Figura 7). Ambos os cultivos foram feitos com os mesmos isolados, no mesmo meio de cultivo, MEA com o pH ajustado para 5,6, porém o isolado de levedura foi cultivado tendo concentração de células de 10^4 células/mL e 10^7 células/mL. A diferença na concentração de células do antagonista foi suficiente para alterar o pH do meio de cultura e conseqüentemente interferiu no crescimento e produção de esporos do isolado fúngico. Percebeu-se, portanto, que quando *Pichia burtonii* UFLA CF605 apresentava concentração de 10^7 células/mL, houve um melhor efeito inibitório sobre o crescimento e sobre a esporulação deste fungo.



Figura 7 Fotografia a esquerda cocultivo de *Aspergillus carbonarius* 2 (10^5 esporos/ mL) e *Pichia burtonii* UFLA CF605(10^4 células/ mL) pH 2; a direita cocultivo de *Aspergillus carbonarius* 2 (10^5 esporos/ mL) e *Pichia burtonii* UFLA CF605 (10^7 células/mL) pH 4

Segundo Abubakar et al. (2013), quando a espécie *Aspergillus parasiticus* foi cultivada em meios com diferentes valores de pH, conseguiram observar que a maior formação de esporos se deu no pH 5 e o menor número de esporos e formação micelial se deram no pH 10, indicando que o meio alcalino maior não é indicado para o desenvolvimento dessa espécie. Assim, uma análise semelhante pode ser feita, visto que no maior valor de pH o crescimento micelial foi relativamente menor e a produção de esporos foi ausente.

Semelhante ao *Aspergillus niger*, *A. carbonarius* naturalmente produz ácido cítrico e acidifica o seu meio ambiente (PAPAGIANNI, 2007; WEYDA et al., 2014). Sendo assim, possivelmente o abaixamento do pH do meio em que estava no início do experimento ajustado para 5,6 e, posteriormente, decaiu para pH 2 e 4, foi devido à produção de ácido cítrico pelo isolado de *Aspergillus carbonarius* 2.

4.5 Acompanhamento por microscopia óptica da germinação de esporos de *Aspergillus carbonarius* 2 cocultivado com *Debaromyces hansenii* UFLA CF693.

O acompanhamento da germinação de esporos de *Aspergillus carbonarius* 2 cocultivado com *Debaromyces hansenii* UFLA CF693 utilizando-se um sistema de captura de imagem acoplado em microscópio óptico foi realizado por 16 h (Figura 8). Sendo possível realizar o monitoramento do local onde se encontrava a amostra, a temperatura apresentou algumas variações que se deram no intervalo de 22,9 °C a 27,1 °C e em relação à umidade essa variação foi de 36,7 a 37,1.

Após 20 minutos de inoculação de ambos os isolados, observou-se que algumas leveduras já se encontravam em brotamento. Neste mesmo tempo, foi possível observar que os esporos apresentavam-se em diferentes estágios de maturação. Foi possível acompanhar o crescimento do esporo do fungo e também visualizar um grande aumento na quantidade de células de leveduras (Figura 8B e 8C). Aproximadamente após 16 horas de incubação (Figura 8D), foi possível observar o aumento da extensão da hifa sendo aparente a formação de núcleos. A extensão das hifas não foi homogênea, sendo possível detectar alguns esporos com menor extensão da hifa. Sobre a diferença de extensão das hifas, pode-se inferir que as células de leveduras estavam competindo por espaço ou até mesmo por nutrientes, que ocasionaria um crescimento lento da hifa, as fotos estão num aumento de 40X.

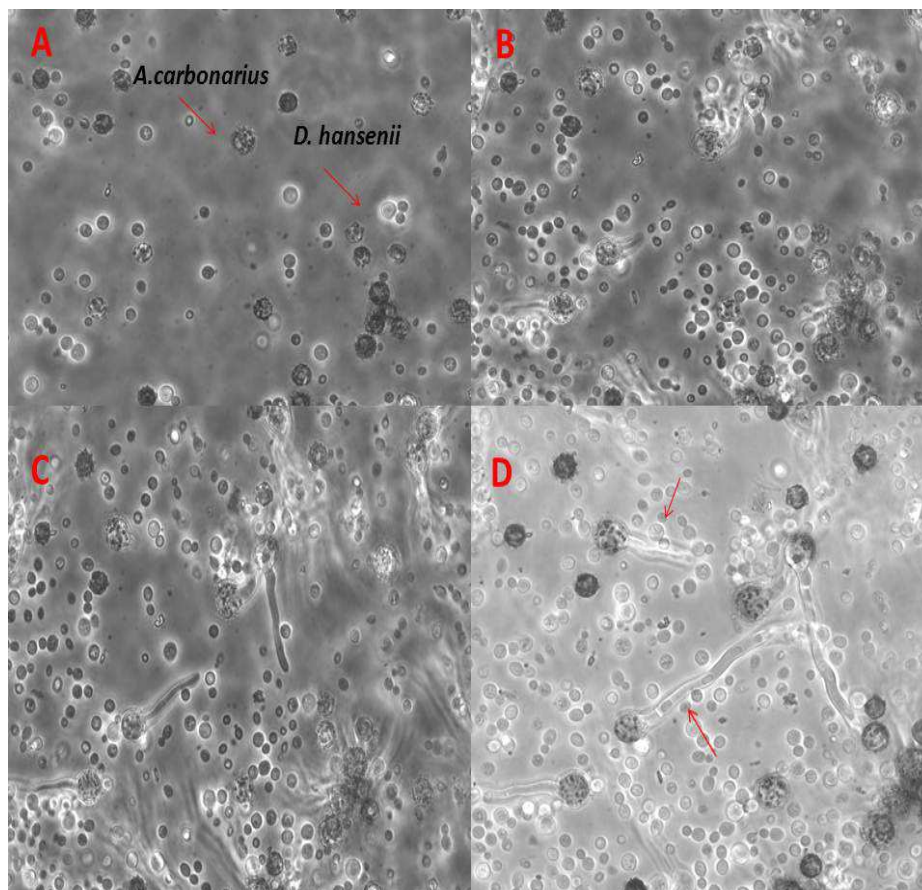


Figura 8 Competição *in vitro* entre *Aspergillus carbonarius* 2 (uva) e *Debaryomyces hansenii* UFLA CF 693 (café arábica), aumento de 40x

Nota: **A**- Células da levedura e esporos do fungo após a inoculação. **B**- Aumento na quantidade de células de levedura e começo da germinação dos esporos de *A. carbonarius*. **C**- Acompanhamento da germinação dos esporos de *A. carbonarius*. **D**- Observação do aumento da hifa emitida pelo esporo de *A. carbonarius*, sendo possível observar a formação de núcleos, após aproximadamente 16 horas de incubação. Há também um esporo que não apresentou crescimento muito extenso da hifa. Imagens obtidas utilizando-se BioStation IM-Q (Nikon).

Souza (2010), utilizando extratos de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, observou que ocorreu redução tanto na germinação quanto na esporulação dos fungos *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium sp.*e

Penicillium sp. Observou início da germinação de conídios de *Aspergillus ochraceus* G. Wilh, após 12 horas de incubação, em meio de cultura AA (Ágar Água), e de *Aspergillus niger* Tiegh após 18 horas de incubação. Um tempo intermediário (16 horas) foi observado pelo *A. carbonarius* 2 nas condições de ensaio realizadas aqui.

A presença de leveduras no café tem sido atribuída a fatores benéficos, pois estudos apontam para o potencial de *Pichia sp.* e *Debaryomyces sp* na inibição do desenvolvimento de fungos filamentosos (RAMOS et al., 2010). Assim como no trabalho feito por Ramos et al. (2010) concluímos que a levedura *Debaryomyces hansenii* UFLA CF693, isolada de café arábica, pode ser uma estirpe potencial para ser utilizada no controle biológico de fungos do gênero *Aspergillus*, visto que, quando cocultivada com *A. carbonarius* 2, *A. carbonarius* 8 CSP3-25 e *A. ochraceus* SCM1.9, foi eficaz na inibição da produção de OTA.

5 CONCLUSÕES

A partir das metodologias empregadas neste estudo pode-se concluir que:

- a) O isolado *Aspergillus ochraceus* SCM 1.9 apresentou o menor valor médio do diâmetro de colônia, representando assim maior efeito inibitório dos isolados de leveduras sobre seu crescimento. Em média houve inibição de 53% em relação ao controle positivo;
- b) A porcentagem de inibição do crescimento micelial em média, utilizando a concentração de 10^7 células/mL foi, respectivamente, de 29, 26 e 13%, quando em cocultivo com os isolados leveduriformes- *Pichia guilliermondii* UFLA CF493, *Pichia sydowiorum* UFLA CF732 e *Saccharomyces kluyveri* UFLA CF567. Assim, em futuros testes *in vivo*, o ideal será utilizar essa concentração de células para maior eficiência da inibição;
- c) O isolado *Aspergillus carbonarius* 2 apresentou, produção de esporos 38% superior, quando comparado com o isolado *A.carbonarius* 8CSP 3-25;
- d) *Pichia kluyveri* UFLA YCH2.2 foi eficiente na inibição da produção de esporos, independente da concentração celular inicial.
- e) Leveduras do gênero *Pichia* foram as que apresentaram maior efeito inibitório na produção de esporos;
- f) Em relação à inibição da produção da OTA, a levedura que coincidiu entre os três isolados de *Aspergillus* foi: *Debaryomyces hansenii* UFLA CF693. E a maior inibição da produção de OTA ocorreu nos meios com 0,94 a_w ;

- g) No cocultivo de *Aspergillus carbonarius* 2 (10^5 esporos/mL) e *Pichia burtonii* UFLA CF605 (10^4 células/mL) em pH-2, o fungo apresentou um crescimento de 86% menor em relação ao controle e sem inibição da produção de esporos, o que pode estar favorecendo a contaminação de algum alimento que estivesse no pH-2. Quando o mesmo isolado de levedura foi cocultivado com 10^7 células/mL e pH-4, observou-se um melhor efeito inibitório sobre o crescimento e a esporulação deste fungo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A levedura *Debaryomyces hansenii* UFLA CF693, isolada de café arábica, e a levedura *Pichia kluyveri* UFLA YCH2.2, isolada do cacau, ambas podem ser estirpes potencias para serem utilizadas no controle biológico de fungos do gênero *Aspergillus*. Em relação à primeira, pode-se observar que, quando cocultivada com *A. carbonarius* 2, *A. carbonarius* 8 CSP3-25 e *A. ochraceus* SCM 1.9, após a realização da Cromatografia de Camada Delgada, pode-se constatar que foi eficaz na inibição da produção de OTA. Em relação à segunda, essa foi eficiente na inibição da produção de esporos independente da concentração celular inicial.

Serão feitas futuramente análises, utilizando Cromatografia Gasosa, para poder avaliar os possíveis compostos orgânicos voláteis e ácidos orgânicos produzidos por essas cepas e que podem ser os responsáveis pelo efeito inibitório na produção do crescimento micelial, produção de esporos e OTA.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, M. L. et al. Current importance of Ochratoxin A – producing *Aspergillus* spp. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 6, p. 903 - 906, June 2001.
- ABDEL-BAKY, N. F.; ABDEL-SALAM, A. H. Natural incidence of *Cladosporium* spp. as a bio-control agent against whiteflies and aphids in Egypt. **Journal of Applied entomology**, Hamburg, v. 127, n. 11, p. 228-235, Nov. 2001.
- ABDEL-HAFEZ, A. I. I.; EL-MAGHRABY, O. M. O. Fungal flora and aflatoxin associated with cocoa, roasted coffee and tea powders in Egypt. **Cryptogamie Mycologie**, Paris, v. 13, n. 1, p. 31-45, 1992.
- ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R. R. M.; VENÂNCIO, A. A. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 25, p. 7493-7496, July 2002.
- ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R. R. M.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of Ochratoxin A for food and feed de contamination. **Toxins**, New York, v. 2, n. 5, p. 1078-1099, May. 2010.
- ABUBAKAR, A. et al. Effect of pH on Mycelial Growth and Sporulation of *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 1, n. 4, p. 64-67, Nov. 2013.
- AHANSAL, L. et al. Biodiversity of yeasts isolated from the indigenous forest of Argan (*Argania spinosa* (L.) Skeels) in Morocco. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 777-782, June 2008.
- AMÉZQUETA, S. et al. Ochratoxin A decontamination: a review. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 4, p. 326-333, Apr. 2009.
- 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.
- ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos: teoria e prática**. 4. ed. Viçosa: Universidade da UFV, 2008.

AZIZ, N. H.; MOUSSA, L. A. A.; FAR, F. M. E. Reduction of fungi and mycotoxins formation in seeds by gamma-radiation. **Journal Food Safety**, Westport, v. 24, n. 2, p. 109-127, July 2004.

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.

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

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M. Incidência de Ocratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea arabica* L.): bóia, mistura e varrição após secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 804-813, maio/jun. 2007.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G. Identificação de espécies toxigênicas de *Aspergillus* associadas aos grãos de café armazenados. **Revista Brasileira de Armazenagem**, Viçosa, n. 3, p. 11-16, 2001.

BATTILANI, P. et al. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, n. 13, p. 1736-1740, Oct. 2004.

BELLÍ, N. et al. Effect of chemical treatments on ochratoxigenic fungi and common mycobiota of grapes (*Vitis vinifera*). **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 70, n. 1, p. 157-163, Jan. 2007.

BELLÍ, N. et al. Ochratoxin A in wines, musts and grape juices from Spain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, n. 6, p. 591-594, Apr. 2004.

BENCHEQROUN, S. K. et al. *In vitro* and *in situ* study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: Evidence for the involvement of competition for nutrients. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 128-135, Nov. 2007.

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

- BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: ROMEIRO, R. da S. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1991. p. 1-5.
- BIRZELE, B.; PRANGE, A.; KRÄMER, J. Deoxynivalenol and Ochratoxin A in German wheat and changes of level in relation to storage parameters. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 17, n. 12, p. 1027-1035, Dec. 2000.
- BJORNBERG, A.; SCHNURER, J. Inhibition of the growth of grainstorage brewer? **Trends Genet**, Cambridge, v. 22, n. 4, p. 183-186, Apr. 2006.
- BJORNBERG, A.; SCHNURER, J. Inhibition of the growth of grainstorage molds *in vitro* by the yeast *Pichia anomala* (Hansen) Kurtzman. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa, v. 39, n. 6, p. 623-628, 1993.
- BLEVE, G. et al. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 204-209, Apr. 2006.
- BOUDRA, H.; LE-BARS, P.; LE-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.
- BOURAS, N.; KIM, Y. M.; STRELKOV, S. E. Influence of water activity and temperature on growth and mycotoxin production by isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* from wheat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 131, n. 1, p. 251-255, May 2009.
- BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1-2, p. 140-146, Oct. 2007.
- CABRERA-PALACIOS, 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, Feb. 2005.
- CASTELLA, G. et al. Molecular characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*, **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 25, n. 1, p. 74-83, Apr. 2002.

CECCHINI, F. et al. Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 5, p. 411–417, Aug. 2006.

CHALFOUN, S. M. Biological control and bioactive microbial metabolites: a coffee quality perspective. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 5, p. 1071-1085, set./out. 2010.

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

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. O papel dos microrganismos na qualidade e segurança do café. In: ENCONTRO SUL MINEIRO DE CAFEICULTURA, 8. ; SIMPÓSIO DE PESQUISA CAFEIEIRA DO SUL DE MINAS, 3., 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: EMATER, 2002. p. 200.

CHALFOUN, S. M.; CORRÊA, T. B. S. Micotoxinas em café - riscos e controle. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Palestras...** Brasília: Embrapa Café, 2002. p. 237-256. Disponível em: < <http://www.sbicafe.ufv.br> >. Acesso em: 07 ago. 2012.

CHIOTTA, M. L. et al. *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 136, n. 1, p. 137-141, Mar. 2009.

COELHO, A. R.; HOFFMANN F. L.; HIROOKA, E. Y. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 337-358, jul./dez. 2003.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY.
Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. Ames: Instructional Technology Center, 2003.

DALCERO, A. et al. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section *Nigri* in Argentina. **Food Additives and Contaminates**, London, v. 19, n. 11, p. 1065–1072, Nov. 2002.

DROBY, S. et al. Influence of CaCl₂ on *Penicillium digitatum*, grapefruit peel tissue, and biocontrol activity of *Pichia guilliermondii*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 3, p.310–315, Mar. 1997.

DROBY, S.; CHALUTZ, E. Mode of action of biocontrol agents for postharvest diseases. In: WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. E. **Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: theory and practice**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 63–75.

DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. Ochratoxina A non-conventional sources: a review. **Microchemical Journal**, New York, v. 93, n. 2, p. 115-120, Nov. 2009.

DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. 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.

DUPUY, J. et al. Thermo stability of fumonisin B1, a mycotoxin from *Fusarium moniliforme*, in corn. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 9, p. 2864-2867, Sept. 1993.

ESPADALÉ, R. M. A.; LAMPURLANÉS, X. S.; AUBERT, A. C. Exposición laboral a hongos en una planta de procesamiento de café. **Medicina y Seguridad del Trabajo**, Madrid, v. 54, n. 211, p. 31-37, Mar. 2008.

ESTEBAN, A. et al. Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 1, p. 634-640, Feb. 2006.

FERRAZ, M. B. M. et al. Kinetics of ochratoxin A destruction during coffee roasting. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 6, p. 872-877, June 2010.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FERREIRA, G. F. P. et al. Fungos associados a grãos de café (*Coffea arabica* L.) beneficiados no sudoeste da Bahia. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 37, n. 3, p. 98-102, mar. 2011.

FIALHO, M. B. et al. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the *in vitro* development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 5, p. 925-932, May 2010.

FIALHO, M. B. Potential of antimicrobial volatile organic compounds to control *Sclerotinia sclerotiorum* in bean seeds. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira** Brasília, v. 46, n. 2, p. 137-142, fev. 2011.

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, 1980.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 871-879, Oct. 2005.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003**. Rome: WHO, 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.HTM>>. Acesso em: 11 mar. 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Prevention and reduction of food and feed contamination**. Rome: World Health Organization, 2012. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/Booklets/Contaminants/CCCF_2012_EN.pdf>. Acesso em: 11 de mar. 2014.

FREDLUND, E. et al. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 395-402, Aug. 2002.

FRISVAD, J. C. et al. Important mycotoxins and the fungi which produce them. In: HOCKING, A. D. et al. (Ed.). **Advances in food mycology**. New York: Springer, 2006. p. 3-31.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. *Neopetromyces* gen. nov. and an overview of teleomorphs of *Aspergillus* sub. *Circumdati*. **Studies in Mycology**, Denmark, v. 45, p. 201-207, May 2000.

FRISVAD, J. C. et al. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. **Studies in Mycology**, Denmark, v. 50, n. 4, p. 23-43, Oct. 2004.

GALLO, M. L.; SELDS, A. M.; CABRERA, G. M. Antibiotic long-chain and α,β -unsaturated aldehydes from culture of the marine fungus *Cladosporium* sp. **Biochemical Systematics and Ecology**, Palo Alto, v.32, p.545-551, 2004.

- GARCIA, D. et al. Is intraspecific variability of growth and mycotoxin production dependent on environmental conditions?: a study with *Aspergillus carbonarius* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 144, n. 3, p. 432-439, Jan. 2011.
- GIL-SERNA, J. et al. Revision of ochratoxin A production capacity by the main species of *Aspergillus* Section *Circumdati*. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. **Food Control**, Guildford, v. 22, n. 2, p. 343-345, Feb. 2011.
- GUZMÁN-DE-PEÑA, D. G.; HERRERA, J. R. Relationship between aflatoxin biosynthesis and sporulation in *Aspergillus parasiticus*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 21, n. 2, p. 198-205, Apr. 1997.
- HUIG, A.; et al. Mycotoxin detoxication of animal feed by different absorbents. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 122, n. 2, p. 179-188, July 2001.
- HWANG, C. A.; DRAUGHON, F. A. Degradation of ochratoxin A by *Acinetobacter calcoaceticus*. **Journal of food protection**, Des Moines, v. 57, n. 5, p. 410-414, May 1994.
- IPPOLITO, A. et al. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 265-272, July 2000.
- KHALESIA, M.; KHATIB, N. The effects of different ecophysiological factors on ochratoxin A production. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 113-121, July 2011.
- KOZAKIEWICZ, Z. ***Aspergillus* species on stored products**. Kew: CAB International Mycological Institute, 1989. (Mycological Paper, 161).
- LACHANCE, M. A. et al. Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 1-8, Apr. 2001.
- LASRAM, S. et al. Evolution of ochratoxin A content during red and rose vinification. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 88, n. 10, p. 1696-1703, Aug. 2008.
- LASRAM, S. et al. Ochratoxin A and ochratoxigenic black *Aspergillus* species in Tunisian grapes cultivated in different geographic areas. **Food Control**, Guildford, v. 25, n. 2, p. 75-80, Feb. 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**, Chicago, v. 75, n. 2, p. 89-97, Apr. 2010.

LEONG, S. L. et al. Fate of ochratoxin A during vinification of Semillon and Shiraz grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 17, p. 6460-6464, Aug. 2006.

LINO, M. C.; SILVA, L. J. G.; PENA, A. S. Fumonisin: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 99, n. 552, p. 181-19, 2004.

LIU, S.; TSAO, M. Biocontrol of dairy moulds by antagonistic dairy yeast *Debaryomyces hansenii* in yoghurt and cheese at elevated temperatures. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 9, p. 852-855, Sept. 2009.

LUNARDI, L. U. et al. Generation of *Aspergillus carbonarius* mutants by *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation method. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 27, n. 2 p. 95-104, jul. /dez. 2006.

MACLEAN, C.R.; GUDELJ, I. Resource competition and social conflict in experimental population of yeast. **Nature**, London, v. 441, p.498-501, May 2006.

MALLMANN, C. A. et al. Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2006, Campinas. **Anais...** Campinas: Apinco, 2006. p. 213-224.

MALLMANN, C. A. et al. Micotoxinas em Ingredientes para Alimento Balanceado de Aves. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA, BRASIL, 20., 2007, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: ALA, 2007. p.191-204.

MASIH, E.I.; PAUL, B. Secretion of β -1,3-glucanases by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of the grapevine. **Current Microbiology**, New York, v. 44, n. 6, p. 391-395, June 2002.

MASOUD, W.; JAKOBSEN, M. The combined effects of pH, NaCl and temperature on growth of cheese ripening cultures of *Debaryomyces hansenii* and coryneform bacteria. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 1, p. 69-77, Jan. 2005.

MASOUD, W.; KALTOFT, H. C. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 2, p. 229-234, Feb. 2006.

MCDONOUGH, M. X. et al. Ozone application in a modified screw conveyor to treat grain for insect pests, fungal contaminants, and mycotoxins. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 249-254, July 2011.

MEKBIB, S. B.; REGNIER T.; J. C.; KORSTEN, L. Efficacy and mode of action of yeast antagonists for control of *Penicillium digitatum* in oranges. **Tropical Plant Pathology**, Brasilia, v. 36, n. 4, p. 233-240, Aug. 2011.

MERWE, K.J., STEYN, P.S.; FOURIE, L. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, London, v. 205, n. 976, p. 1112-1113, May 1965.

MOSS, M. O. Mode of formation of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, suppl. 5-9, p. 5-9, 1996.

MÜHLENCOERT, E. et al. Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 5-6, p. 651-659, Nov. 2004.

NOONIM, P. et al. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, n. 7, p. 1727-1734, July 2008.

OUESLATI, S. et al. Alternating temperatures and photoperiod effects on fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* isolated from Tunisian grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 139, n. 3, p. 2010-2013, Feb. 2010.

PALACIOS-CABEIRA, H. et al. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* e *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.

PALACIOS-CABEIRA, H. et al. The production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in raw coffee at different equilibrium relative humidity and under alternating temperatures. **Food Control**, Guildford, v. 15, n. 7, p. 531-535, Oct. 2004.

PAPAGIANNI, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. **Biotechnology Advances**, New York, v. 25, n. 3, p. 244–263, May/June 2007.

PASSOTH, V. et al. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 6, n.1, p. 3-13, Jan. 2006.

PASTER N. et al. Evaluation of the potential of the yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent against *Aspergillus flavus* and fungi of stored soya beans. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, n. 10, p.1201–1206, Oct. 1993.

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

PEREIRA, R. T. G. **Influência de *Cladosporium cladosporioides* na qualidade da bebida do café**. 2002. 42 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

PERRONE, G. et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Micology**, Wageningen, v. 59, n. 1, p. 53-66, Feb. 2007.

PÉTERI, Z.; TÉREN, J.; VÁGVÖLGY, J. Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. **Food Microbiology**, London, v. 24, n. 3, p. 205-210, May 2007.

PETERSSON, S. et al. Ochratoxin A accumulation in cultures of *Penicillium verrucosum* with the antagonistic yeast *Pichia anomala* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, n. 8, p. 1003-1006, Aug. 1999.

PETERSSON, S.; SCHNÜRER, J. *Pichia anomala* as a biocontrol agent of *Penicillium roqueforti* in high moisture wheat, rye, barley, and oats stored under airtight conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, n. 5, p. 471-476, 1998.

PFEIFFER, T.; SCHUSTER, S.; BONHOEFFER, S. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. **Science**, New York, v. 292, n. 5516, p.504–507, Apr. 2001.

PFOHL-LESZKOWICZ, A.; MANDERVILLE, R.A. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 51, n. 1, p. 61-99, Jan. 2007.

PISKUR, J. et al. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? **Trends Genet**, Cambridge, v. 22, n. 4, p. 183–186, Apr. 2006.

PITT, J. I. et al. Distribution of *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* and *A. carbonarius* in coffee in four regions of Brazil. In: COLLOQUIUM MOISTURE MANAGEMENT FOR MOULD PREVENTION IN COFFEE, 19., 2001, Trieste, 2001. **Proceedings...** Trieste: [s.n], 2001. p. 1-5.

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

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

PONSONE, M. L. et al. Control of ochratoxin A production in grapes. **Toxins**, New York, v. 4, n. 1, p. 364-372, Apr. 2012.

PRADO, G. et al. Reduction of aflatoxin B1 in stored peanuts (*Arachis hypogaea* L.) using *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 74, n. 6, p. 1003–1006, June 2011.

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. 1-2, p. 133-140, Oct. 1998.

RAMOS, D. M. B. et al. Inibição *in vitro* de fungos toxigênicos por *Pichia* sp. e *Debaryomyces* sp. Isoladas de frutos de café (*Coffea arabica*). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 3, p. 397- 402, July/Sept. 2010.

REYES, M. E. Q.; ROHRBACH, K. G.; PAULL, R. E. Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 193-203, Aug. 2004.

REZENDE, E. F. **Biodiversidade, fungos ocratoxigênicos e ocratoxina A em grãos de café (*Coffea arabica* L.) de cultivo convencional e orgânico**. 2010. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

RINGOT, D. et al. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 159, n. 1, p. 18-46, Jan. 2006.

RODRIGUES, M. B. **Efeito do gás ozônio na qualidade micotoxicológica de arroz (*Oryza sativa* L.) em casca durante a armazenagem**. 2013. 123 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

ROSA, M. R. et al. Evaluation of the biological control by the yeast *Torulaspora globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 8, p. 1491–1502, Aug. 2010.

SAGE, L. et al. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 5, p. 1306–1311, Feb. 2002.

SAINT-PRIX, F.; BÖNQUIST, L.; DEQUIN, S. Functional analysis of the ALD gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP⁺-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation. **Microbiology**, Reading, v. 150, n. 7, p. 2209-2220, July 2004.

SAMSON, R. A. et al. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, Denmark, v. 50, n. 2, p. 45-61, Dec. 2004.

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, May 2006.

SCHATZMAYR, G. et al. Investigation of different yeasts strains for detoxification of ochratoxin A. **Mycotoxicology Research**, Mainz, v. 19, n. 2, p. 124-128, June 2003.

SCHERM, B. et al. Biocontrol activity of antagonistic yeasts against *Penicillium expansum* on apple. **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 85, n. 3, p. 205–213, 2003.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Arlington, v. 30, n. 2, p. 507-512, Sept. 1974.

SERRA, R. M. A. **Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação de com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A**. 2005. 330 p. Tese (Doutorado Engenharia Química e Biológica) - Universidade do Minho, Portugal, 2005.

SERRA, R.; MENDONÇA, C.; VENÂNCIO, A. Fungi and ochratoxin A detected in healthy grapes for wine production. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 42–47, Jan. 2006.

SHERIF, S. O.; SALAMA, E. E.; ABDEL, M. A. W. Mycotoxins and child health: the need for health risk assessment. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Jena, v. 212, n. 4, p. 347-368, July 2009.

SHETTY, P. H.; JESPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 17, n. 2, p. 48–55, Feb. 2006.

SILVA, C. F. et al. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 60, n. 2, p. 251-260, Apr. 2000.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. B.; SCHWAN, R. F. Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea arabica* L.) beans. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 521-526, July/Sept. 2008.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; SCHWAN, R. S. Incidência de *Aspergillus* produtores de micotoxinas em frutos e grãos de café (*Coffea arábica* L.). **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, n. 7, p. 30-36, 2003.

- SILVA, C.F. et al. Microbiota presente em frutos e grãos de café despolpado e natural: uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 37, supl., p. 22-28, 2003.
- SKRINJAR, M.; RASIC, J. I.; STOJICIC, V. Lowering ochratoxin A level in milk by yoghurt bacteria and bifidobacteria. **Folia Microbiologica**, Praha, v.41, n.1, p.26-28, Fev. 1996.
- SOLFRIZZO, M. et al. Removal of Ochratoxin A from contaminated red wines by repassage over Grape Pomaces. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 1, p. 317-323, Jan. 2010.
- SOLIMAN, K. M. Incidence, level, and behavior of aflatoxins during coffee bean roasting and decaffeination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 25, p. 7477-7481, Oct. 2002.
- SOMAI, B. M.; BELEWA, V. Aqueous extract of *Tulbaghia violacea* inhibit germination of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus conidia*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 74, n. 6, p. 1007–1011, June 2011.
- SOUZA, L. P. **Potencial antifúngico de extratos de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries**. 2010. 110 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- SUNDH, I.; MELIN, P. Safety and regulation of yeasts used for biocontrol or biopreservation in the food or feed chain. **Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology**, Wageningen, v. 99, n. 1, p. 113-119, Jan. 2011.
- 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. 85-92, Apr. 2003.
- TASSOU, C. C. et al. Impact of water activity and temperature on growth and ochratoxin A production of two *Aspergillus carbonarius* isolates from wine grapes in Greece. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 70, n. 12, p. 2884-2888, Dec. 2007.
- THOMAS, P.; SOLY, T. A. Endophytic bacteria associated with growing shoot tips of banana (*Musa sp.*) cv. grand naine and the affinity of endophytes to the host. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, n. 4, p. 952–964, Nov. 2009.

TIAN, S. P. et al. Effects of calcium on biocontrol activity of yeast antagonists against the postharvest fungal pathogen *Rhizopus stolonifer*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 3, p. 352–358, June 2002.

TJAMOS, S. E. et al. *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in corinthrais in and wine-producing vineyards in greece: population composition, ochratoxin a production and chemical control. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 4, p. 250-255, Apr. 2004.

TRUCKSESS, M. W.; DIAZ-AMIGO, C. **Mycotoxins in foods encyclopedia of environmental health**. Ueno: [s.n], 2011.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S. S. A. P. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 632, n. 2, p. 168-180, Jan. 2009.

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

VALERO, A. et al. Effect of intra and interspecific interaction on OTA production by *A. section Nigri* in grapes during dehydration. **Food Microbiology**, London, v. 24, n. 2, p. 254-259, Aug. 2007.

VARGA, J. et al. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 99, n. 3, p. 321–328, Apr. 2005.

VARGA, J. et al. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 41, n. 1, p. 29-36, Jan. 2003.

VARGA, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin in grapes and grape-derived products. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 17, n. 2, p. 72-81, Feb. 2006.

VARGA, J.; SAMSON, R. A. ***Aspergillus in the genomic era***. Netherlands: Wageningen Academic, 2008.

VASANTHI, S.; BHAT, R. V. Mycotoxins in foods: occurrence, health & economic significance & food control measures. **Indian Journal Medical Research**, New Delhi, v. 108, n. 8, p. 212-224, Nov. 1998.

VELMOUROUGANE, K. et al. Management of *Aspergillus ochraceus* and ochratoxin- A contamination in coffee during on-farm processing through commercial yeast inoculation. **Biological Control**, Orlando, v. 57, n.3, p. 215–221, June 2011.

VILELA, D. M. et al. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 8, p. 1128-1135, Dec. 2010.

VITERBO, A. et al. Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (T. harzianum T-203). **Current Genetics**, New York, v. 42, n. 2, p. 114–122, Nov. 2002.

VOSS, K.A. et al. Comparative subchronic toxicity studies of nixtamalized and water-extracted *Fusarium moniliforme* culture material. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 34, n. 7, p. 623-632, July 1996.

WEYDA, I. et al. Point mutation of the xylose reductase (XR) gene reduces xylitol accumulation and increases citric acid production in *Aspergillus carbonarius*. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, Houndmills, v. 41, n. 4, p. 1-7, Feb. 2014.

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

ZHANG, D. et al. Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. **Biological Control**, Orlando, v. 54, n. 3, p. 172-180, Sept. 2010.

ZHANG, D. et al. Potential biocontrol activity of a strain of *Pichia guilliermondii* against grey mold of apples and its possible modes of action. **Biological Control**, Orlando, v. 57, n. 3, p. 193–201, June 2011.

ZHAO, Y. et al. Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 49, n. 1, p. 113–120, July 2008.

ZINEDINE, A.; MAÑES, J. Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 4, p. 334-344, Apr. 2009.