

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

MARIANA CARLA NICOLAU

**BIOCONTROLE DE *FUSARIUM VERTICILLIOIDES* EM MILHO E
TRIGO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LONDRINA
2014

MARIANA CARLA NICOLAU

**BIOCONTROLE DE *FUSARIUM VERTICILLIOIDES* EM MILHO E
TRIGO**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2 do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Margarida Masami Yamaguchi

LONDRINA
2014

TERMO DE APROVAÇÃO

BIOCONTROLE DE *FUSARIUM VERTICILLIOIDES* EM MILHO E TRIGO

MARIANA CARLA NICOLAU

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 17 de fevereiro de 2014 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof^a. Dr^a. Margarida Masami Yamaguchi
Prof^a. Orientadora

Prof^a. Dr^a. Lyssa Setsuko Sakanaka

Prof^a. Dr^a. Mayka Reghiany Pedrão

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre estar comigo e me guiar nos momentos difíceis, para conseguir cumprir mais uma meta em minha vida.

A Professora Margarida Masami Yamaguchi, por ter me aceitado como orientada, pela confiança, pelos numerosos ensinamentos e pelo valioso trabalho para a concretização desse estudo.

A minha mãe Fatima, meu pai Antonio, minha irmã Andressa e ao meu namorado, por todo amor, carinho, paciência e incentivo em todos os momentos, principalmente nos mais complicados.

Os colegas Caroline Galindo, Danielle Santos e Rodolfo Serafim pela ajuda na realização deste trabalho.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Londrina por ter cedido o laboratório de microbiologia onde foi realizado esse trabalho.

Enfim, a todos os que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa.

RESUMO

NICOLAU, Mariana Carla. **Biocontrole de *Fusarium verticillioides* em milho e trigo**. 2014. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2014.

O Brasil desempenha fortes características no setor agrícola, com acentuada produção de grãos. A região sul se destaca pela produção de milho e trigo, devido ao clima favorável. Essas produções são de grande importância econômica e nutricional, entretanto essas culturas são frequentemente atacadas por fungos na pré-colheita ou no armazenamento, que além da deterioração ocasionar perda nutricional, pode provocar a contaminação por micotoxinas produzidas pelos fungos. O controle deste fungo é de extrema importância, uma vez que os métodos químicos ou físicos geram custos elevados podendo afetar o ambiente e os alimentos devido à contaminação por resíduos. Desta forma, sugere-se o biocontrole como uma alternativa economicamente viável e menos agressiva ao meio ambiente e ao consumidor. O presente trabalho teve como objetivo a seleção de leveduras com potencial de inibição do fungo *Fusarium verticillioides* em milho e trigo. Foram realizadas as análises de contagem e isolamento de bolores e leveduras e do teste de biocontrole. A contagem das amostras de milho e de trigo em sua maioria ficou acima do que é permitido pela legislação e dentre as leveduras testadas no biocontrole à levedura da amostra AM 24 C apresentou um halo de inibição, concluindo assim que as leveduras possuem um potencial de inibição ao fungo *Fusarium verticillioides*.

Palavras-chave: Grãos. Leveduras. Micotoxinas. Antagonismo.

ABSTRACT

NICOLAU, Mariana Carla. **Biocontrol of *Fusarium verticillioides* in maize and wheat**. 2014. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) - Federal Technology University - Parana. Londrina, 2014.

Brazil plays strong features in the agricultural sector with agricultural grain production. The southern region is distinguished by production of corn and wheat, due to favorable weather. These productions are of great economic and nutritional importance, however these cultures are often attacked by fungi in the pre-harvest or storage, in addition to causing deterioration of nutritional loss, can cause contamination by mycotoxins produced by fungi. The control of this fungus is of utmost importance, since the chemical or physical methods generate high costs which may affect the environment and food due to contamination by waste. Thus, it is suggested biocontrol as an economically viable and less aggressive to the environment and consumer choice. The present study aimed selection of yeasts with potential for inhibition of *Fusarium verticillioides* in maize and wheat. Analyzes of counts and isolation of yeasts and molds and biocontrol test was performed. Counting of samples of maize and wheat mostly remained above what is allowed by law and among the yeasts tested in biocontrol AM 24 C showed a considerable inhibition halo, thus concluding that yeasts have a potential to inhibit the fungus *Fusarium verticillioides*.

Keywords: Grains. Yeast. Mycotoxins. Antagonism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Corte longitudinal de grão de trigo.....	18
Figura 2 – Composição do grão de milho.....	21
Figura 3 – <i>F. verticillioide</i> em microscopia eletrônica.....	24
Figura 4 – Fotografia do halo de inibição da levedura AM 24 C.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estimativas da produção de grãos safras 2011/2012 e 2012/2013...	16
Tabela 2 – Contagem e isolamento de bolores e leveduras.....	31
Tabela 3 – Teste de Biocontrole.....	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	12
3 REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1 SEGURANÇA ALIMENTAR.....	13
3.2 PRODUÇÃO DE GRÃOS NO BRASIL.....	14
3.3 TRIGO.....	17
3.4 MILHO.....	19
3.5 FUNGOS.....	21
3.5.1 <i>Fusarium verticillioides</i>	23
3.6 MICOTOXINAS.....	24
3.7 BIOCONTROLE.....	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 MATERIAL EM ESTUDO.....	29
4.2 MÉTODOS.....	29
4.2.1 Contagem e isolamento de bolores e leveduras.....	29
4.2.2 Biocontrole.....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

A segurança alimentar é uma corrente essencial na indústria de alimentos e a busca de formas para alcançá-la de modo eficiente, natural e ambientalmente correto é uma das vertentes de muitas pesquisas da atualidade.

O setor agrícola brasileiro contribui para o crescimento econômico e a ele são confiadas importantes tarefas, como, por meio do aumento da produção e da produtividade, oferecer alimentos e matérias primas para o mercado interno, gerar excedentes para a exportação, ampliando a disponibilidade de divisas; transferir mão de obra para outros setores da economia; fornecendo recursos para esses setores; além de consumir bens produzidos no setor industrial. Por isso priorizar a segurança desses alimentos é o objetivo de muitas pesquisas na área e tendo o Brasil como um dos maiores produtores do mundo é dele a maior parte da responsabilidade e iniciativa na busca dessa segurança.

Dentre o setor agrícola os grãos de milho e trigo são bastante produzidos no país, entretanto é alvo de contaminações por fungos. Devido a fatores tais como, teor de umidade dos grãos, condição física e sanitária dos grãos, nível de inoculação do fungo, conteúdo de oxigênio e condições de armazenamento anterior, insetos e ácaros. Tornando se um lugar propício para o desenvolvimento de fungos e, assim, podendo afetar a segurança alimentar do produto e conseqüentemente, a saúde do consumidor.

Os fungos são organismos eucariotos, que apresentam parede celular rígida e podem ser uni ou multicelulares. Entre os fungos classificados como micro-organismos estão aqueles que são multicelulares, na qual produzem estruturas filamentosas microscópicas e são frequentemente chamados de bolores, enquanto as leveduras são fungos unicelulares. Os fungos filamentosos são decompositores que representam muitas vezes perdas na produção dos cereais e grãos. Além disso, são produtores de substâncias tóxicas, chamadas de micotoxinas, que são prejudiciais à saúde dos animais e dos seres humanos. Mesmo com o processamento dos alimentos sabe-se que nem todas estas toxinas são eliminadas.

Dentro da microbiologia, a utilização do antagonismo, onde um micro-organismo inibe o crescimento de outro através de competição ou pela produção de alguma substância, é o mecanismo que possui maior expectativa quanto ao

descobrimto de novas técnicas, novas substâncias ou até mesmo micro-organismos novos que possam ser aliados da segurança nos alimentos.

Identificar, desenvolver e criar meios que inibem a produção dessas toxinas ou até iniba o crescimento destes fungos é de grande importância para varias áreas e pesquisas. Este trabalho teve como proposito de analisar leveduras com potencial de inibição de bolores toxigênicos em grãos de milho e trigo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar leveduras naturais com potencial de inibição contra *Fusarium verticillioides* em grãos de milho e trigo coletados em empresas do segmento agrícola da região de Londrina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar bolores e leveduras de amostras de milho e trigo;
- Avaliar o poder de inibição das leveduras isoladas contra *Fusarium verticillioides*;
- Elegir leveduras que possuam potencial de inibição de *Fusarium verticillioides*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 SEGURANÇA ALIMENTAR

O termo "Segurança Alimentar" começou a ser empregado após o fim da Primeira Guerra Mundial. Com a experiência ruim vivenciada pela Europa durante a guerra, tornou-se claro que um país poderia dominar o outro através do controle de seu fornecimento de alimentos. A alimentação seria, assim, uma arma poderosa, principalmente se aplicada por uma potência em um país que não possuísse a capacidade de produzir por conta própria e suficientemente seus alimentos. Deste modo, esta questão adquiriria um significado de segurança nacional para cada país, apontando para a necessidade de formação de estoques estratégicos de alimentos e fortalecendo a ideia de que a soberania de um país dependia de sua capacidade de auto suprimento de alimentos (MALUF; MENEZES, 2013).

Logo após o termo ser utilizado ele foi definido como segurança alimentar e nutricional sendo a garantia do direito de todos ao acesso a alimentos de qualidade, que não causem problemas à saúde do consumidor, em quantidade suficiente e de modo permanente, com base em práticas alimentares saudáveis e respeitando as características culturais de cada povo, manifestadas no ato de se alimentar. Esta condição não pode comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, nem sequer o sistema alimentar futuro, devendo se realizar em bases sustentáveis. É responsabilidade dos estados nacionais assegurarem este direito e devem fazê-lo em obrigatória articulação com a sociedade civil, dentro das formas possíveis para exercê-lo (MALUF; MENEZES, 2013).

A saúde humana pode ser gravemente afetada pela ingestão de perigos físicos, químicos e biológicos veiculados pelos alimentos, e devido a isso, há uma conscientização em nível nacional e internacional, que tem gerado grandes avanços na área da segurança alimentar. Em muitos países, um avanço considerável tem sido alcançado, demonstrando que é possível diminuir e prevenir muitas Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). Entretanto, um número inaceitável de DTA ocorre todos os anos, demonstrando que os controles na produção de alimentos ainda

precisam apresentar melhorias. A área de alimentos é enorme, e esta envolve fatores culturais, políticos, econômicos, tecnológicos, entre muitos outros, os quais desafiam os profissionais que nela trabalham. Um número incontável de tecnologias é aplicado na produção dos mais variados produtos, para garantir melhorias aos seus consumidores (TONDO; BARTZ, 2001).

3.2 PRODUÇÃO DE GRÃOS NO BRASIL

Segundo Silva, Campos e Silveira (2008), o setor agrícola brasileiro vem contribuindo para o crescimento econômico e a ele são confiadas importantes tarefas, como, por meio do aumento da produção e da produtividade, oferecer alimentos e matérias primas para o mercado interno, gerar excedentes para a exportação, ampliando a disponibilidade de divisas; transferir mão de obra para outros setores da economia; fornecendo recursos para esses setores; além de consumir bens produzidos no setor industrial.

Quando comparado com outros países cuja agricultura possui importância econômica, o Brasil apresenta condições privilegiadas para, de forma rápida, expandir a produção e modernizar o comércio de produtos agrícolas. Alguns fatores que contribuem para viabilizar estas condições são: sistemas de transporte, novas agroindústrias, educação empresarial, educação comercial, novo mercado interno, uso racional da terra, disponibilidade de áreas, qualidade total. Os novos modelos administrativos, com técnicas mais eficientes para gerenciamento e comercialização da produção, podem promover grandes mudanças nesse setor produtivo e colocar o Brasil entre os países líderes na produção de alimentos (SILVA; CAMPOS; SILVEIRA, 2008).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), realiza metodicamente levantamentos das safras agrícolas para quantificar e acompanhar a produção brasileira. Para a realização deste levantamento, foram contactadas, nos principais municípios produtores do país, instituições direta ou indiretamente ligadas à produção agrícola, destacando-se os profissionais de Cooperativas, Secretarias de

Agricultura, órgãos de Assistência Técnica e Extensão Rural (oficiais e privados), agentes financeiros, revendedores de insumos e produtores rurais, durante o período de 24 a 28 de junho de 2013 (CONAB, 2013).

A produção da safra 2012/13, estimada em 185,05 milhões de toneladas, sendo superior à safra 2011/12 com um valor de 11,4%, quando atingiu 166,17 milhões de toneladas (Tabela 1). Esse resultado representa um incremento de 18,88 milhões de toneladas devido, sobretudo, à cultura de soja, que apresenta crescimento na área cultivada de 22,7% (15,07 milhões de toneladas) e a de milho segundo safra, com crescimento de 13,1% ou de 5,13 milhões de toneladas sobre a produção obtida na safra anterior (CONAB, 2013).

Tabela 1 – Brasil - Estimativas da produção de grãos safras 2011/2012 e 2012/2013 (em 1000 t).

PRODUTOS	SAFRA			VARIACÃO	
	2011/12	2012/13		Percentual (c)/(a)	Absoluta (c)-(a)
	(a)	Jun/2013 (b)	Jul/2012 (c)		
ALGODÃO- CAROÇO ⁽¹⁾	3.018,6	1.997,0	1999,3	(33,8)	(1.019,3)
ALGODÃO- PLUMA	1877,3	1260,6	1262,0	(32,8)	(615,3)
AMENDOIM TOTAL	294,7	329,9	336,0	14,0	41,3
AMENDOIM 1ª SAFRA	274,6	306,1	306,1	11,5	31,5
AMENDOIM 2ª SAFRA	20,1	23,8	29,9	48,8	9,8
ARROZ	11.599,5	11.924,2	11.858,3	2,2	258,8
FEIJÃO TOTAL	2.918,5	2840,3	2828,4	(3,1)	(90,1)
FEIJÃO 1ª SAFRA	1.235,6	957,1	957,1	(22,5)	(278,5)
FEIJÃO 2ª SAFRA	1063,9	1189,2	1158,5	8,9	94,6
FEIJÃO 3ª SAFRA	619,0	694,0	712,8	15,2	93,8
GIRASOL	116,4	110,4	110,0	(5,5)	(6,4)
MAMONA	24,9	16,7	15,4	(38,2)	(9,5)
MILHO TOTAL	72.979,8	78.468,1	79.077,8	8,4	6.098,0
MILHO 1ª SAFRA	33.867,1	34.845,6	34.835,0	2,9	967,9
MILHO 2ª SAFRA	39.112,7	43.622,5	44.242,8	13,1	5.130,1
SOJA	66.383,0	81.281,4	81.456,7	22,7	15.073,7
SORGO	2.221,9	2.127,6	2.160,0	(2,8)	(61,9)
SUBTOTAL	159.557,3	179.095,6	179.841,9	12,7	20.284,6
AVEIA	353,5	360,7	360,7	2,0	7,2
CANOLA	52,0	60,5	60,5	16,3	8,5
CENTEIO	3,5	3,7	3,7	5,7	0,2
CEVADA	305,1	287,2	287,2	(5,9)	(17,9)
TRIGO	5.788,6	4.379,5	4.379,5	(24,3)	(1.409,1)
TRITICALE	112,2	116,9	116,9	4,2	4,7
SUBTOTAL	6.614,9	5.208,5	5.208,5	(21,3)	(1.406,4)
BRASIL ⁽²⁾	166.172,2	184.304,1	185.050,4	11,4	18.878,2

Fonte: CONAB, 2013.

⁽¹⁾ Produção de caroço de algodão.

⁽²⁾ Exclui a produção de algodão em pluma.

O Brasil tem na agricultura uma das bases mais potentes de economia, garantindo fornecimento contínuo de insumos baseados em cereais, oleaginosas, hortaliças, frutas e respectivos produtos derivados oriundos de processamento (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2013). As culturas de grãos de inverno são em sua maioria de trigo, este é cultivado, principalmente na região sul, onde apresenta temperaturas mais baixas durante o trimestre mais frio (junho, julho e agosto) e com maior índice de chuvas (IAPAR, 2013a). Entretanto as chuvas que decorrem durante

o manejo de produção e a alta umidade durante o armazenamento dos grãos podem causar alguns danos ao produto, como o aparecimento de fungos, que tanto diminuem o valor de agregação, o valor nutricional, como também representa fontes de contaminação por micotoxinas oriundas dos fungos filamentosos que atacam a planta (PUZZI, 1997), devido o produto ser colhido com umidade superior à indicada (IAPAR, 2013c).

3.3 TRIGO

O trigo (*Triticum aestivum*) é um grão de ciclo anual, cultivado durante a primavera e o inverno. Seu consumo é na forma de pão, massa alimentícia, bolo e biscoito. Também é usado como ração animal, quando não atinge a qualidade exigida para consumo humano. O grão de trigo ocupa o primeiro lugar em volume de produção mundial. No Brasil, a produção anual varia entre 5 e 6 milhões de toneladas. É cultivado nas regiões Sul (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Centro-oeste (Mato Grosso do Sul, Goiás e Distrito Federal). Sendo em torno de 10 milhões de toneladas o consumo anual no país. A região Sul do Brasil apresenta a maior produção de trigo, cerca de 90% do total. O cereal vem sendo introduzido aos poucos na região do cerrado, por meio de irrigação ou sequeiro (EMBRAPA, 2013b).

A palavra trigo vem do vocábulo latino *triticum*, que significa quebrado, triturado, numa referência à atividade que se deve realizar para separar o grão de trigo da camada que o reveste. O termo trigo destina-se tanto à planta como às sementes comestíveis dela originadas. Ele pertencente à família *Poaceae*, subfamília *Pooideae* e ao gênero *Triticum*, é classificado em diferentes espécies, conforme o número de cromossomos: *Triticum monococcum* com 14 cromossomos, *Triticum durum* com 28 cromossomos e *Triticum aestivum* com 42 cromossomos, este último, o trigo comum. Basicamente, cinco fases de desenvolvimento podem ser definidas durante o período de crescimento da planta de trigo: fase de plântula, de perfilhamento, de alongamento, de espigamento e de maturação (SCHEUER et al., 2011).

Segundo a legislação brasileira vigente em 2009, as cultivares de trigo estão classificadas em cinco classes, de acordo com a força do glúten e de número de queda: Trigo Brando, Trigo Pão, Trigo Melhorador, Trigo para outros usos e Trigo Durum e em três tipos: 1, 2 e 3, definidos em função do limite mínimo de peso do hectolitro e dos limites máximos percentuais de umidade, de materiais estranhos e impurezas e de grãos danificados (BRASIL, 2001).

As diferentes variedades se distinguem pela altura das plantas, produtividade, conteúdo de endosperma, proporção de proteínas na farinha, qualidade da proteína, resistência a diversas doenças e adaptabilidade a solos ácidos, requerimentos climatológicos e pela aparência física (SCHEUER et al., 2011).

O grão de trigo é constituído, basicamente, por pericarpo (7,8 a 8,6%), endosperma (87 a 89%) e gérmen (2,8 a 3,5%) como demonstrado na figura 1.

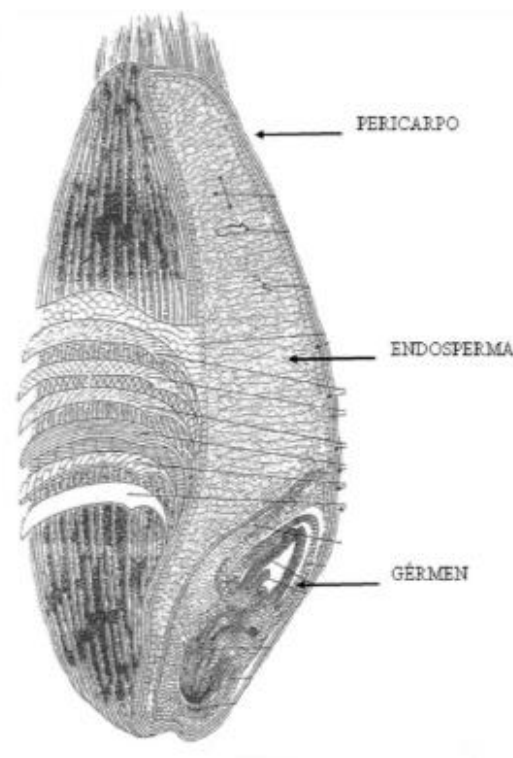


Figura 1: Corte longitudinal de um grão de trigo.

Fonte: SCHEUER et al., 2011.

O trigo (*Triticum* spp.) é uma gramínea presente em todo o mundo. Mundialmente é a segunda maior cultura de cereais, primeiramente encontra-se o milho e em terceiro o arroz. O grão de trigo é um alimento básico usado para produzir farinha para a alimentação humana e também é utilizada na alimentação de animais. Devido ao fato de serem amplamente consumidos, estes grãos precisam de cuidado especial quando se trata da sua qualidade sanitária. Como a contaminação de cereais por micotoxinas representa um risco significativo à saúde dos consumidores, este assunto tem recebido cada vez mais atenção das autoridades de segurança alimentar e dos legisladores em todo o mundo (NIEVINSKI, 2009).

3.4 MILHO

Além do trigo, outro grão bastante produzido no país e alvo de contaminações por fungos é o milho (PUZZI, 1997). Devido principalmente, às condições ambientais favoráveis à atividade metabólica do grão (alta umidade e alta temperatura), o fenômeno da respiração é o principal responsável pela rápida deterioração de grãos armazenados (IAPAR, 2013b). O milho (*Zea mays* L.) é um dos principais cereais cultivados no mundo. O Brasil é o terceiro produtor mundial (6 a 7% da produção mundial). A produção brasileira de milho no ano de 2005 foi de 35,5 milhões de toneladas em 12 milhões de grãos colhidos. O Paraná é o estado que mais produz milho no Brasil em torno de 10 milhões de toneladas por ano (EMBRAPA, 2013a).

A cultura de milho apresenta algumas vantagens, que justificam a sua ampla distribuição, tais como: composição e valor nutritivo; alta produção por unidade de trabalho e unidade de área; pequenas perdas de grãos causadas por pássaros e chuvas; fonte de nutrição de fácil transporte; período longo de colheita e permite o armazenamento. Devido à sua grande diversidade de aplicações, tanto na alimentação humana quanto na alimentação animal, a cultura de milho apresenta acentuada importância social e econômica. Além de gerar empregos no setor primário, o grão é matéria prima indispensável para incentivar diversos complexos agroindustriais (ROMANO, 2005).

O milho é uma planta de ciclo vegetativo variado, apresentando um ciclo variável entre 110 e 180 dias. Em função da caracterização dos genótipos (superprecoce, precoce, normal), período esse compreendido entre a semeadura e a colheita (FANCELLI; DOURADO, 2000).

O ciclo da cultura compreende cinco etapas de desenvolvimento: (i) germinação e emergência: ocorre entre a semeadura e o aparecimento da plântula, cujo período varia entre 4 e 12 dias, em função da temperatura e umidade do solo, (ii) crescimento vegetativo: iniciado a partir da emissão da segunda folha até o início do florescimento, cuja extensão varia em função do genótipo e de fatores climáticos, caracterizando e classificando diferentes genótipos quanto à duração do ciclo; (iii) florescimento: estabelecido entre o início da polinização e o início da frutificação; (iv) frutificação: período compreendido entre a fecundação e o enchimento completo dos grãos, cuja duração varia entre 40 e 60 dias; (v) maturidade: período compreendido entre o final da frutificação e o aparecimento da camada preta no ponto de inserção dos grãos com o sabugo. A formação da camada preta representa o rompimento do elo entre a planta mãe e fruto, caracterizando o momento ideal para a colheita, em função da máxima produção concentrada. Entretanto, a alta umidade dos grãos nesse momento (30% a 38%), constitui-se num impedimento natural às operações mecânicas inerentes a um processo de colheita eficiente, o que se torna possível quando a umidade dos grãos encontra-se entre 18% e 25%, procedendo-se à secagem artificial até 13% de umidade, permitindo seu armazenamento seguro (FANCELLI; DOURADO, 2000).

Os grãos do milho são, na maioria das vezes, amarelos ou brancos, podendo apresentar colorações variando desde o preto até o vermelho. Seu peso individual varia, em média, de 250 a 300mg e sua composição média em base seca é 72% de amido, 9,5% proteínas, 9% fibra (a maioria resíduo detergente neutro) e 4% de óleo. Conhecido botanicamente como uma cariopse, o grão de milho é formado por quatro principais estruturas físicas: endosperma, gérmen, pericarpo (casca) e ponta (Figura 2), as quais diferem em composição química e também na organização dentro do grão (PAES, 2006).

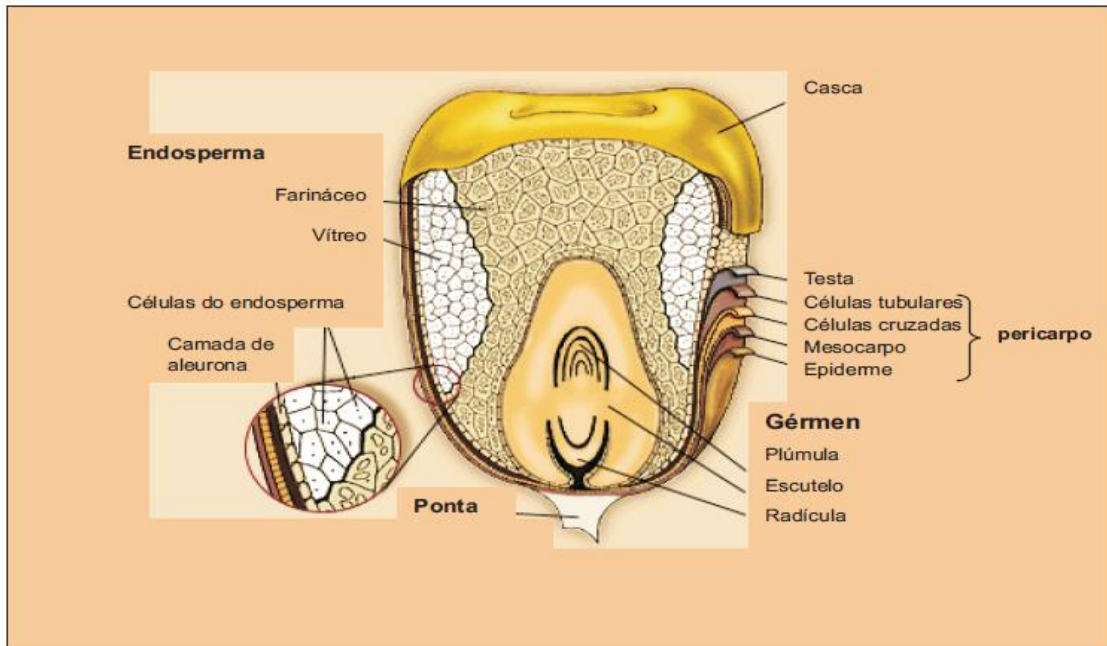


Figura 2: Composição do grão de milho.

Fonte: PAES, 2006.

3.5 FUNGOS

Segundo Pelczar, Chan e Krieg (1997) os fungos são organismos eucariotos, que apresentam parede celular rígida e podem ser uni ou multicelulares. Alguns podem ser microscópicos em tamanho, mas também existem outros muito maiores, como os cogumelos e fungos que crescem em madeira úmida ou solo. Entre os fungos classificados como micro-organismos estão aqueles que são multicelulares, os quais produzem estruturas filamentosas microscópicas e são frequentemente chamados de bolores, enquanto as leveduras são fungos unicelulares.

São vários os fatores que afetam o crescimento de fungos em grãos, tais como, teor de umidade dos grãos, condição física e sanitária dos grãos, nível de inoculação do fungo, conteúdo de oxigênio e armazenamento anterior, insetos e ácaros. A contaminação dos grãos por fungos pode ocorrer ainda no campo ou durante o armazenamento do produto. Quando ocorre a disseminação de fungos filamentosos nesses grãos, ainda no campo ou no armazenamento, os seus

derivados, carregarão os esporos e/ou os metabólitos fúngicos, como as micotoxinas (GELLI; JAKABI; PORTO, 1990).

Os bolores possuem células cilíndricas que estão ligadas nas extremidades para formar um filamento denominado hifa, na qual pode apresentar esporos. Individualmente, as hifas são microscópicas, todavia quando grandes quantidades de hifas acumulam-se em um pedaço de pão, por exemplo, a massa fúngica denominada micélio é visível a olho nu. Os bolores podem ser usados para produzir o antibiótico penicilina, molho de soja, queijos Roquefort e Camembert e muitos outros produtos (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997). Entretanto, algumas espécies podem causar transformações indesejáveis nos alimentos, produzindo sabores e odores desagradáveis, além de poder ocasionar manifestações clínicas no homem e nos animais como infecções ou doenças decorrentes da invasão de tecidos, alergias ou reações de hipersensibilidade, além de micotoxicoses, intoxicações resultantes da ingestão de alimentos ou rações contendo micotoxinas (BORGES et al., 2002)

As leveduras unicelulares apresentam forma variada, de esférica a ovoide, de elipsoide a filamentosa. Como os bolores, as leveduras são tanto benéficas quanto prejudiciais. Elas são amplamente utilizadas na indústria de pães (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* atua como papel principal na conversão de açúcares fermentáveis presentes na massa em gás carbônico e etanol. Além de produzir CO₂, que é o gás responsável pelo crescimento do pão, também exerce influência sobre as propriedades reológicas da massa, tornando-a mais elástica e porosa, que após o cozimento é digestível e nutritivo (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013) Devido a sua habilidade em produzir álcool, elas também são essenciais para a produção de bebidas alcoólicas fermentadas. Por outro lado, elas causam deterioração de alimentos e doenças como vaginites e sapinho (uma infecção oral) (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997).

A contagem de bolores e leveduras é uma das análises realizadas no controle de qualidade de alimentos, com a finalidade de estimar a validade de determinado produto alimentício. A presença excessiva destes micro-organismos resulta na deterioração ou redução da vida útil do alimento. Embora considerados indicadores de contaminação, quantificar estes fungos é fundamental para avaliar a qualidade de produtos armazenados (LAZARETTI et al., 2000).

Por muitos anos, os fungos foram conhecidos pela sua capacidade de produzir metabólitos tóxicos, porém os seus efeitos foram largamente ignorados, tornando as micotoxicoses negligenciadas. Esta situação foi alterada drasticamente após 1960, com a doença X dos perus, quando a atenção mundial se concentrou sobre as micotoxinas. A rapidez na identificação e caracterização das aflatoxinas e a demonstração da aflatoxina B1 como um carcinógeno extremamente potente ao ser humano e animal, impulsionaram esta mudança. Os principais substratos para a produção dessas toxinas são os cereais, cujas perdas, segundo estimativa da *Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO* situam-se ao redor de 25% dos grãos produzidos. A presença de micotoxinas em alimentos é um sério problema para saúde pública e para a qualidade dos alimentos (AMARAL et al., 2006).

3.5.1 *Fusarium verticillioides*

O gênero *Fusarium* sp. é classificado como um fungo imperfeito, caracterizado por um micélio hialino, ramificado e tabicado, com esporóforos em forma de filóides e conídios de forma e tamanho variável. Apresenta macroconídeos fusiformes, com vários septos (LEAL et al., 2005).

Produzem um micélio com aspecto aveludado com matrizes rosadas, vermelhas, violetas ou marrons. Os conídeos possuem forma fusiforme. *Fusarium* sp. classifica-se entre os fungos de campo, exigindo elevada umidade para o desenvolvimento, invade a semente e produz toxina no período de pré colheita. Incapaz de competir com fungos de estocagem devido ao crescimento lento tende a desaparecer relativamente rápido durante a armazenagem, ficando apenas a toxina produzida durante o seu desenvolvimento (LEAL et al., 2005).

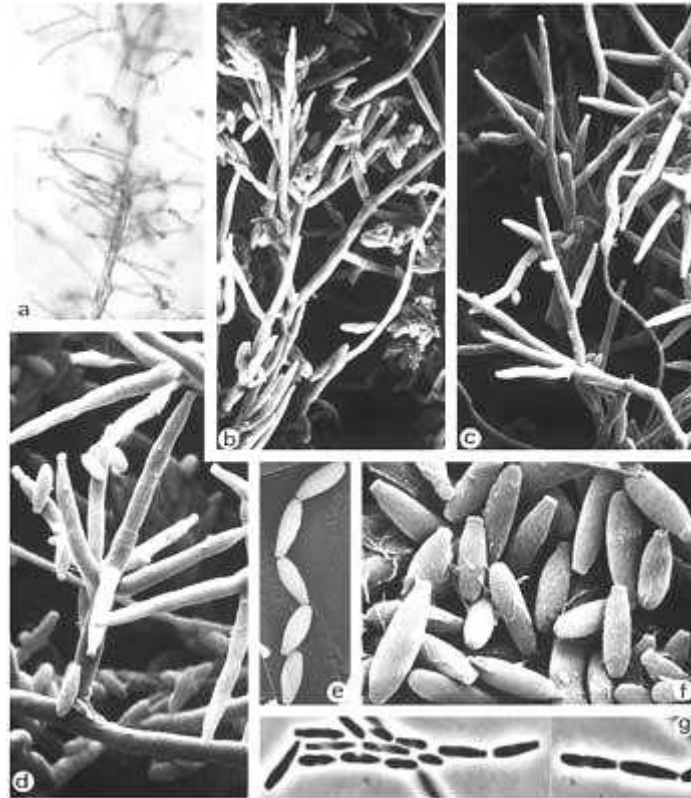


Figura 3: *F. verticillioides* em microscopia eletrônica. a) Monofialides com cadeias de conídios; b-d) conidióforos e microconídios; e-g) microconídios.

Fonte: Hoog, 2000.

3.6 MICOTOXINAS

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos provenientes de vias biossintéticas comuns em fungos, que proliferam em produtos agrícolas destinados a alimentação humana e animal. Ocasionalmente causa sérios danos à saúde humana e por serem toxinas naturais de difícil controle, aliada a termorresistência diante do processamento industrial, as micotoxinas têm sido assunto exaustivamente discutido pela “WHO/FAO Joint Expert Committee on Food Additives”- JECFA. A produção de micotoxinas por fungos de campo tem frequentemente envolvido fitopatógenos de interesse, seguida de adicional incremento devido a fungos de armazenagem, indicando característica cumulativa na cadeia produtiva (COELHO; HOFFMANN; HIROOKA, 2003). Para segurança alimentar, as micotoxinas constituem um dos

pontos críticos decisivos no comércio internacional de produtos agrícolas (BRASIL, 2002).

Numerosos fatores contribuem para que ocorra contaminação dos produtos ao longo da cadeia alimentar, encontra-se entre os principais a susceptibilidade dos tecidos vegetais ao ataque fúngico, a rotação de culturas aliada à condição ambiental (temperatura/umidade) e danos físicos e mecânicos durante a colheita e a estocagem. Dentre os principais representantes fúngicos responsáveis pela produção de micotoxinas numa ampla variedade de produtos agrícolas se encontra *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. e *Alternaria* spp.. Entre os grupos de micotoxina frequentemente relatados na contaminação de alimentos menciona-se aflatoxina, ocratoxina, patulina, zearalenona, tricoteceno, fumonisina, ácido tenuazônico, ácido ciclopiazônico, citrinina e ácido penicílico (COELHO; HOFFMANN; HIROOKA, 2003).

As Aflatoxinas (AFLs) são consideradas metabólitos secundários que podem ser produzidos por fungos como: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nominus*. Os seres humanos e várias espécies domésticas são sensíveis aos seus efeitos tóxicos que podem ser agrupados como: agudos, mutagênicos, neoplásicos e teratogênicos. Existem vários tipos de aflatoxinas, dentre elas, destacam-se quatro, B1, B2, G1, G2; sendo que sua biotransformação, em diversas espécies animais, resulta na produção de M1 e M2. As aflatoxinas M1 e M2 foram isoladas inicialmente no leite e urina de animais que consumiram AFLs. Estas se desenvolvem naturalmente em produtos alimentícios como: amendoim, milho, feijão, arroz, trigo, entre outros. O amendoim é um dos cereais mais sensíveis ao fungo, cuja invasão de micro-organismos neste grão pode ocorrer no solo, durante o processo de formação de sementes, na colheita, nas fases de secagem, beneficiamento e armazenamento. Todos os cereais, sem exceção, devem passar por um controle rigoroso, pois podem estar contaminados (FERREIRA et al., 2006).

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina com propriedades cancerígenas, nefrotóxicas, teratogênicas e imunotóxicas. Ela é produzida por fungos da espécie *Penicillium* e *Aspergillus* e ocorre naturalmente em todo o mundo em diversos produtos vegetais, como a cevada, o café em grão, o cacau e os frutos secos. Esta micotoxina foi detectada também em produtos à base de cereais, em especiarias,

em vinho, em cerveja, em sumo de uva e em produtos de origem animal, caso dos rins de porco. A sua ocorrência em toda parte no meio ambiente resulta numa provável e inevitável exposição humana (NOGUEIRA; OLIVEIRA, 2006).

A patulina é uma micotoxina termo resistente da classe hidroxifuropiranona e também pode ser chamada de clavicina, claviformina ou expansina. Pode ser produzida como metabólito secundário por várias espécies de fungos para inibir o crescimento de outros microrganismos. A patulina foi isolada primeiramente de *Penicillium claviforme*, nomeada claviformina, entretanto em razão de seu frequente isolamento partindo de *Penicillium patulum*, chama-se patulina. Inicialmente era considerado um antibiótico, mas pelos seus efeitos tóxicos em animais, foi classificada como uma toxina (CELLI et al., 2009). A patulina tem sido encontrada contaminando diversas frutas, como o damasco, a cereja, a uva, a pera, o pêsego, a ameixa e, principalmente, a maçã (CALDAS et al., 2008).

As fumonisinas são produzidas pelo *Fusarium moniliforme* e pelo *F. proliferatum* e fazem parte de uma família de micotoxinas que contaminam alimentos, predominantemente à base de milho, ao redor do mundo. A fumonisina B1 é o principal metabólito produzido pelos fungos *Fusarium moniliforme* e *F. proliferatum*, os quais são achados como contaminantes difundidos no milho, sendo o metabólito mais abundante e mais tóxico deste grupo de micotoxinas, representando 70% da concentração total em rações e alimentos naturalmente contaminados, seguido pelas fumonisinas B2 e B3 (GERTNER; SANTIN; SAAD, 2008).

A produção de micotoxinas e o desenvolvimento de fungos toxigênicos são dependentes de diversos fatores dos quais: temperatura, umidade e tipo de substrato são os mais importantes. Dependendo dos teores de micotoxinas ingeridas ou injetadas, quatro tipos básicos de toxicidades são detectados: aguda, crônica, mutagênica e teratogênica (THABULSI; ALTERTHUM, 2005).

São reconhecidos os efeitos maléficos desses compostos sobre a saúde humana e animal, sendo capazes de induzirem efeitos carcinogênicos, hepatotóxicos e mutagênicos. Sabe-se que cerca de 25% de todos os produtos agrícolas produzidos no mundo estão contaminados com alguma micotoxina. A crescente preocupação dos países importadores quanto à presença de micotoxinas

nos alimentos tem levado à elaboração de legislações cada vez mais rígidas, no qual diz respeito aos níveis máximos de micotoxinas permitidos (FREIRE et al., 2007).

3.7 BIOCONTROLE

O aumento da produtividade e demanda exige qualidade com segurança e competitividade na cadeia produtiva desde o campo. Todavia, a falta de controle resulta em perda e contaminação considerável, afetando a segurança do produto final. Neste contexto, *Fusarium* sp é um dos principais representantes fúngicos responsáveis pela deterioração e produção de micotoxinas, possuindo a capacidade de germinar, crescer e produzir toxinas em grande variedade de produtos agrícolas. Aliado ao fato, o setor agroindustrial, sem planejamento sustentável, tem como consequências os danos ao ecossistema (FOOD AND INGREDIENTS BRASIL, 2009).

Dessa forma, pode-se utilizar o biocontrole que é definido como a utilização de micro-organismos específicos, os quais interferem junto a organismos patogênicos e pragas causadoras de doenças em plantas, sendo uma ferramenta natural e uma alternativa ecológica para superar os problemas causados por métodos químicos para a proteção de plantas (SAITO et al., 2009).

Os princípios dos mecanismos de biocontrole têm como base as relações antagônicas tais como: competição, predação, amensalismo, parasitismo, resistência induzida ou pela produção de metabólitos que inibem o desenvolvimento do outro. O parasitismo parece ser o mecanismo mais eficiente de antagonismo no biocontrole, pois os hiperparasitas dependem dos seus hospedeiros para sobrevivência e estão sujeitos as mesmas variações ambientais. Já o amensalismo é quando uma espécie prejudica outra por meio de substâncias que produz e libera, sem aparentemente se beneficiar no processo (SAITO et al., 2009).

Desta forma, o controle biológico de fitopatógenos se sobressai por não se restringir a estudar apenas a relação entre o fitoparasita e o hospedeiro, mas

também por considerar os antagonistas, a microflora adjacente ao local da infecção e o relacionamento desse complexo em todo o ecossistema (SAITO et al., 2009).

Segundo Imamura et al. (2000) a utilização de micro-organismos como controle biológico, envolve o isolamento a partir de amostras do ambiente, que apresentam atividade antagônica. Um dos pontos principais para a efetividade do biocontrole contra fungos é o antagonismo, pois as chances de sucesso nos programas de controle biológico estão no isolamento e na seleção de micro-organismos que apresentem essa característica de forma eficiente (KAWASHIMA; VALENTE, 2006).

Os métodos de controle biológicos apresentam alternativas viáveis em relação aos químicos tradicionais utilizados ainda no campo para combater a infestação fúngica, principalmente por não deixarem resíduos químicos no alimento. Para se obter novos produtos de origem biológica, numerosos micro-organismos com atividade antimicrobiana vêm sendo identificados e testados (JANISIEWCZ, 2000).

Nesse sentido, inicia-se a perspectiva para o uso do biocontrole empregando leveduras, em virtude de não ter sido relatado até o momento nenhum caso na qual uma tenha produzido micotoxinas, apresentando baixa possibilidade toxigênica (FAZIO, 2009). Determinadas leveduras possuem capacidade de produzir compostos antimicrobianos que inibem o crescimento de outras leveduras e em alguns casos de micro-organismos eucariontes e procariontes, no entanto são imunes à própria toxina (SENTE, 2010). Fungos filamentosos micotoxigênicos podem ser atingidos por substâncias produzidas por leveduras. Assim a levedura surge como alternativa no processo de redução de toxinas ou do fungo produtor.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

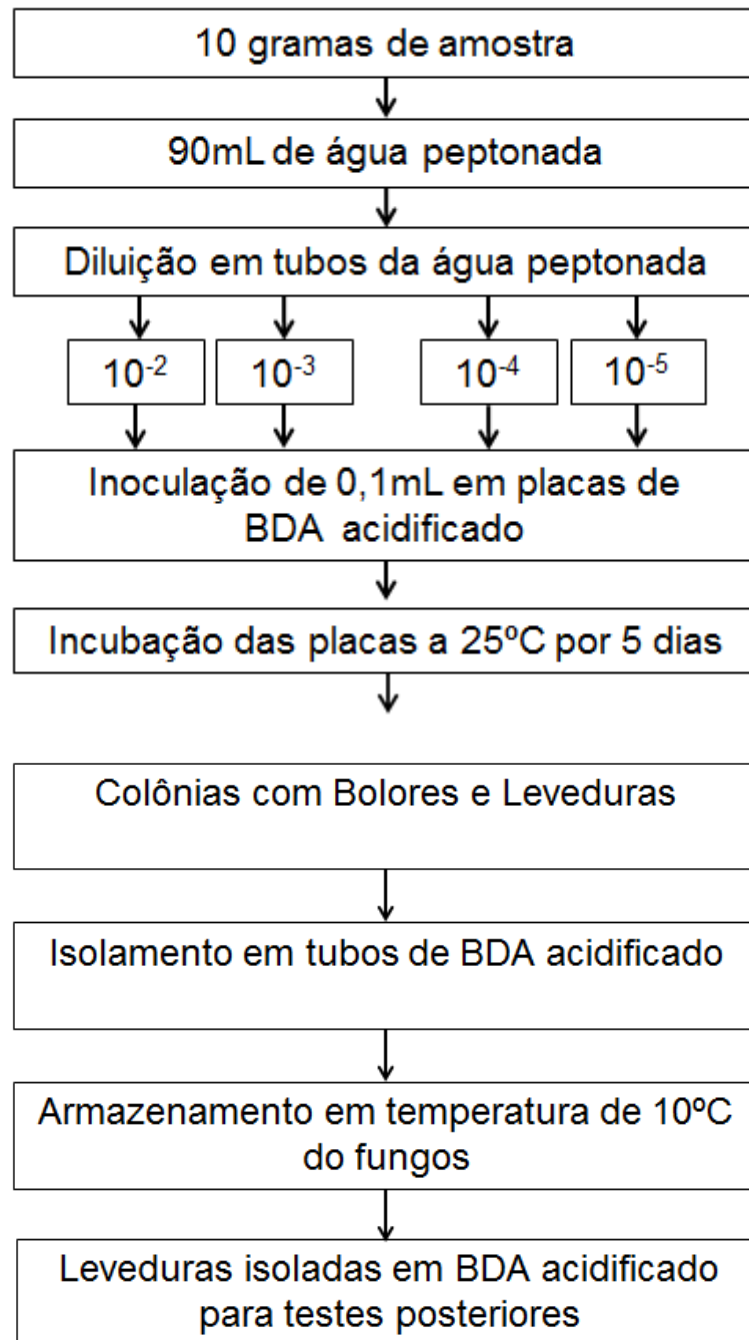
4.1 MATERIAL EM ESTUDO

O procedimento experimental foi realizado no laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Londrina. Foram utilizadas 12 amostras de milho e 12 de trigo que foram coletadas em empresas do segmento agrícola da região de Londrina no período de fevereiro de 2013, armazenadas em recipientes fechados a uma temperatura de zero grau até o momento da realização das análises. As amostras foram codificadas da seguinte maneira amostras de milho receberam codificação de AM e seu respectivo número e amostras de trigo receberam codificação de T e seu respectivo número.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Contagem e isolamento de bolores e leveduras

A contagem de bolores e leveduras realizou-se a partir de 10 g de amostra de análise, assepticamente triturada e homogeneizada. Procedeu-se a diluição seriada com peptona 0,1% (m/v) de 10^{-1} a 10^{-5} . Uma alíquota de 1 mL de cada diluição foi inoculada pela técnica *pour plate* em Placas de Petri contendo agar batata dextrose (BDA) e incubadas por 5 dias em estufa B.O.D a 25°C, conforme descrito por Nelson et al. (1983). Colônias de leveduras e bolores foram armazenadas em microtubos contendo BDA para serem utilizadas em testes posteriores de biocontrole.



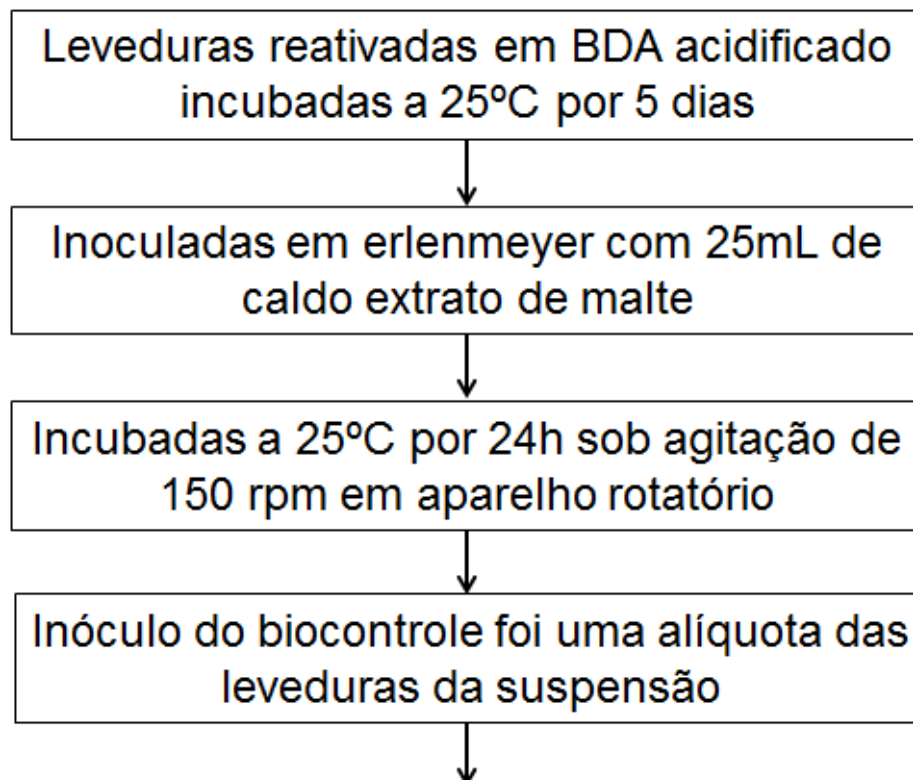
Fluxograma de contagem e isolamento de bolores e leveduras.

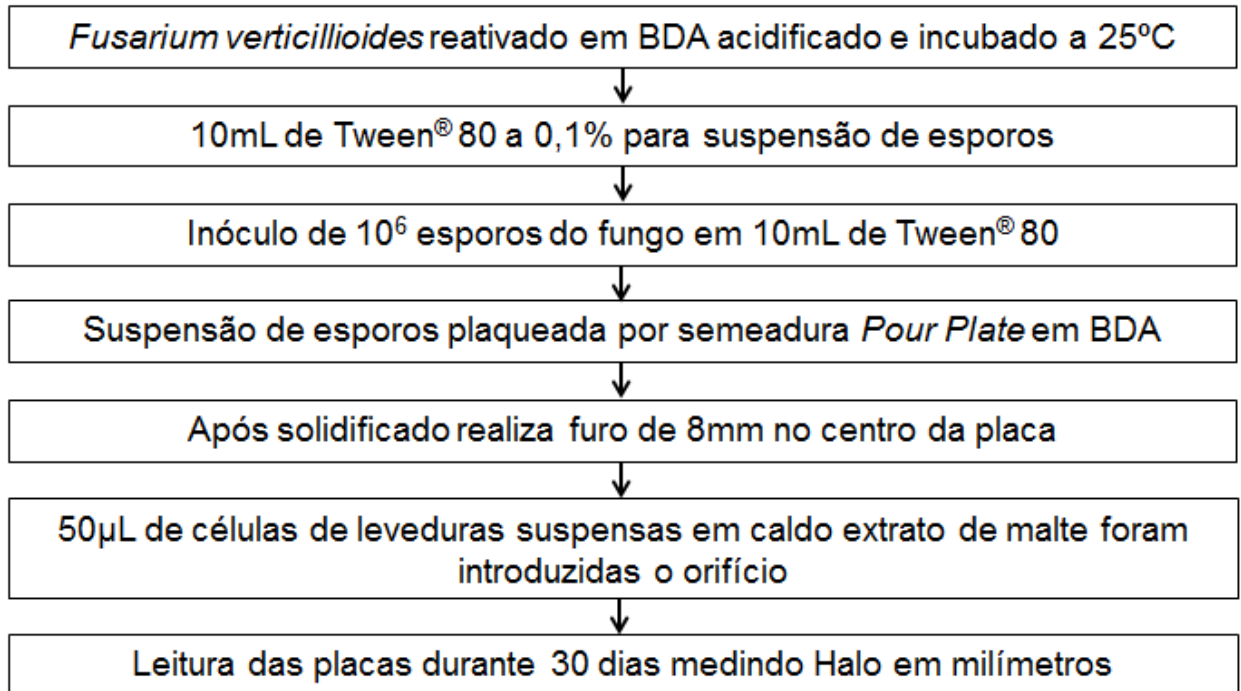
4.2.2. Biocontrole

Para o teste de biocontrole as linhagens de leveduras preservadas em BDA foram reativadas repicando-se para outro tubo contendo o mesmo meio e, incubados

a 25° C por 5 dias. A seguir as leveduras foram inoculadas em erlenmeyer contendo 25 mL de caldo extrato de malte (glicose 0,6%; extrato de malte 0,6%; extrato de levedura 0,14%; maltose 0,18% m/v) e incubadas a 25° C por 24 horas sob agitação de 150 rpm. O inóculo para antifungigrama consistiu de em uma alíquota de leveduras da suspensão. Para a reativação, as linhagens de *Fusarium verticillioides* foram repicadas em placas de *Petri* contendo BDA solidificado, inoculadas pela técnica de estria por esgotamento e incubadas a 25° C por 7 dias. A seguir preparou-se uma suspensão de esporos, colocando-se alçadas da linhagem fúngica em 10 mL de Tween 80 a 0,1% (v/v). O inóculo para antifungigrama consistiu de 10^6 esporos/mL⁻¹, determinada pela contagem em Câmara de Neubauer.

A suspensão contendo 10^6 esporos/mL⁻¹ de fungos foi plaqueada pela técnica de semeadura *pour plate* no meio BDA. Depois de solidificado o meio, fez-se um orifício de 8 mm no centro da placa e 50 µL de células de leveduras suspensas em caldo extrato de malte foram introduzida. Avaliaram se as placas durante 30 dias a 25 °C, medindo- se o diâmetro do halo de inibição em mm (MOTOMURA; HIROOKA, 1996).





Fluxograma do Biocontrole

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na metodologia realizada para contagem total e isolamento de bolores e leveduras em amostras de milho e trigo, foram obtidos os resultados que estão dispostos na tabela 2.

Tabela 2 – Contagem de bolores e leveduras. Realizada por unidade formadora de colônia por grama de milho/trigo (UFC).

CONTAGEM			
MILHO	UFC/g*	TRIGO	UFC/g*
AM 22	3×10^3	T 14	1×10^5
AM 23	8×10^4	T 15	2×10^2
AM 24	1×10^5	T 16	2×10^5
AM 25	$1,6 \times 10^4$	T 17	3×10^2
AM 26	7×10^4	T 18	2×10^4
AM 27	5×10^5	T 19	2×10^2
AM 28	2×10^3	T 20	1×10^5
AM 29	1×10^4	T 21	2×10^4
AM 30	4×10^2	T 22	1×10^4
AM 31	1×10^4	T 23	1×10^3
AM 32	3×10^5	T 24	1×10^5
AM 33	2×10^3	T 25	2×10^5

Legenda: UFC: Unidade Formadora de Colônia.

Segundo Gelli, Jakabi, Porto (1990) são vários os fatores que afetam o crescimento de fungos em grãos, tais como, teor de umidade dos grãos, condição física e sanitária dos grãos, nível de inoculação do fungo, conteúdo de oxigênio e armazenamento anterior, insetos e ácaros. A contaminação dos grãos por fungos pode ocorrer ainda no campo ou durante o armazenamento do produto. Quando ocorre a disseminação de fungos filamentosos nesses grãos, ainda no campo ou no armazenamento, os seus derivados, carregarão os esporos e/ou os metabólitos fúngicos, como as micotoxinas.

Em todas as amostras foram encontradas colônias de *Fusarium*, algumas com *Aspergillus* e *Penicillium*, estes foram guardados em estoque para testes

posteriores. Na grande maioria, também se encontraram colônias com características de leveduras.

A contagem das placas de milho e de trigo em sua maioria ficou acima do que é permitido pela legislação. O limite estabelecido pelo Ministério da Saúde é de 10^3 UFC/g (BRASIL, 1997), assim valores superiores ao mesmo, prejudicam na qualidade do alimento e podem implicar danos à saúde do consumidor. As amostras de trigo apresentaram uma contagem maior que as de milho isso pode ser devido as condições de manejo e armazenamento que cada grão teve, na presença de muitas chuvas durante o manejo e altas umidades durante o armazenamento contribui para o aparecimento de fungos.

Seguindo a metodologia descrita para o teste de biocontrole, foram obtidos os resultados que estão na tabela 3.

Tabela 3 – Teste de Biocontrole realizado por leveduras encontradas contra o fungo *Fusarium verticillioides* durante um mês.

AMOSTRA	HALO (mm)			
	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS	30 DIAS
AM 22	-	-	-	-
AM 23	-	-	-	-
AM 24 A	-	-	-	-
AM 24 B	-	-	1	1
AM 24 C	5	6	7	8
AM 25	-	-	-	-
AM 26	-	-	-	-
AM 27	-	-	-	-
AM 28	-	1	1	2
AM 29	-	-	-	-
AM 30	-	-	-	-
AM 31	-	-	-	-
AM 32 A	-	-	-	-
AM 32 B	-	-	-	-
AM 33	-	1	2	2
T 14	-	-	-	-
T 15	-	2	3	4
T 16	-	-	-	-
T 17	-	-	-	-

T 18	-	-	-	-
T 19	-	-	-	-
T 20	-	-	-	-
T 21	-	-	-	-
T 22	-	-	2	2
T 23	-	-	-	-
T 24	-	-	-	-
T 25	-	-	-	-

No teste de biocontrole, os halos de inibição de algumas leveduras apareceram logo na primeira semana, como é o caso da levedura AM 34 C que apresentou um halo de 8 mm, enquanto outras foram crescendo aos poucos durante o período de coleta dos resultados na qual houve uma pequena inibição que é o caso das leveduras AM 24 B, AM 28, AM33, T 15 E T 22 , dentre as 12 amostras de trigo e 12 amostras de milho. Porém, várias delas não apresentaram nenhuma atividade de inibição com relação ao fungo *Fusarium verticillioides*.

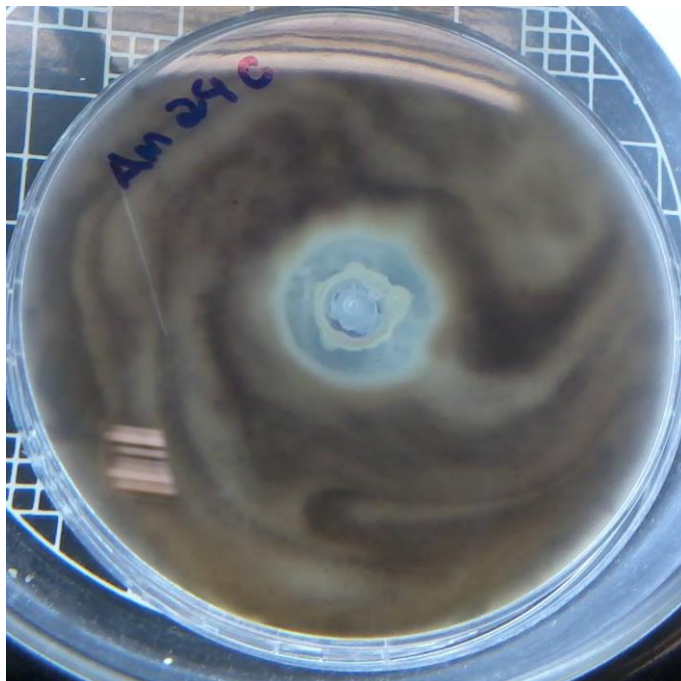


Figura 4: Fotografia do halo de inibição da levedura AM 24 C em relação ao fungo *Fusarium verticillioides*.

Fonte: A autoria própria.

6 CONCLUSÃO

A utilização de micro-organismos como controle biológico, envolve o isolamento a partir de amostras do ambiente, que apresentam atividade antagônica sendo uma ferramenta natural e uma alternativa ecológica para superar os problemas causados ao consumidor.

Através do estudo realizado pode se concluir que houve leveduras presentes no próprio grão que possuíram potencial de inibição contra o fungo *Fusarium verticillioides*, como é o caso da levedura AM 24 C que apresentou um halo de 8 mm inibindo o fungo em estudo dentre as 12 amostras de trigo e 12 de milho e outras leveduras como é o caso da AM 24 B, AM 28, AM33, T 15 E T 22 que apresentaram uma inibição menor. Entretanto o estudo foi realizado em apenas 12 amostras dos dois grãos, deste modo às leveduras com esse potencial foram poucas, seria necessário um estudo com uma maior amostragem para se obter resultados expressivos.

REFERÊNCIAS

AMARAL, Kassia A. S. et al. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 336-342, abr.-jun. 2006.

BORGES, Larissa Rolim et al. Contagem de fungos no controle de qualidade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) e isolamento de gêneros potencialmente micotoxigênicos. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 4, n. 1, p. 103-110, jan./jun. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Brasil deve iniciar exportação de manga para o Japão em junho**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/pls/pubacs_cons/ap_detalhe_noticia_cons?p_id_publicacao=3536> Acesso em: 04 jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº7 de 15 de agosto de 2001. Regulamento Técnico de Identidade e de Qualidade do Trigo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 2001. 33 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n. 451, de 19 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico Princípios Gerais para o Estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos e seus Anexos I, II e III. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1997.

CALDAS, G. M. M.; OLIVEIRA, R. C.; TESSMANN, D. J.; MACHINSKI, M. Ocorrência de patulina em uva fina (*Vitis vinifera* L. cv. "Rubi") com sinais de podridão ácida. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.1, p.14-18, jan-fev, 2008.

CELLI, M. G.; COELHO, A. R.; WOSIACKI, G.; GARCIA-CRUZ, C.H. Patulina: incidência e controle em derivados de maçã. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 135-162, jan./mar. 2009.

COBAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, nono levantamento, julho 2013 / Companhia Nacional de Abastecimento**. Brasília: Conab, 2013.

COELHO, A. R.; HOFFMAN, 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.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Milho**. Disponível em: <<http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/milho/index.htm>>. Acesso em 24 jun. 2013. a

_____. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Trigo**. Disponível em: <<http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/index.htm>>. Acesso em 24 jun. 2013. b

FAZIO, M. L. S. **Caráter *killer* e antagonismo de leveduras aplicadas no biocontrole de fungos micotoxigênicos em fruta**. 2009, 102f. Tese (doutorado em engenharia e ciência em alimentos). UNESP, São José do Rio Preto, 2009.

FANCELLI, A.L.; DOURADO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 360p.

FERREIRA, Helder et al. Aflatoxinas: um risco a saúde humana e animal. **Ambiência - Revista do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais**, Guarapuava, v. 2, n.1, p. 113-127 jan./jun. 2006.

FOOD INGREDIENTES BRASIL. Micotoxinas. **Rev. Fib.** ed. 2, n 7, p. 32-40, 2009.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Panificação**. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/114.pdf>> Acesso em 29 jul. 2013.

FREIRE, Francisco C. O. et al. **Micotoxinas: Importância na alimentação e saúde humana e animal**. Fortaleza: Embrapa Agroindustrial Tropical, 2007.

GELLI, D. S.; JAKABI, M.; PORTO, E. Isolamento de *Aspergillus spp* aflatoxigênicos de produtos alimentícios. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 50, n.1, p. 319-323, 1990.

GERTNER, L. R. S.; SANTIN, E.; SAAD M. B. Influência da fumonisina sobre a resposta imunológica de aves: revisão bibliográfica. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, Curitiba, v. 6, n. 3, p. 401-411, jul./set. 2008.

HOOG, G.S. **Atlas of clinical fungi**, 2. ed. 2000.

IAPAR. Instituto Agronômico do Paraná. **Cartas climáticas do Paraná**. Disponível em: <<http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=860>> Acesso em 18 jul. 2013. a

_____. Instituto Agronômico do Paraná. Referências. **Informações técnicas para trigo e triticales safra 2013**. Disponível em: <http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/TrigoeTriticale2013.pdf > Acesso em 22 jul. 2013. b

_____. Instituto Agronômico do Paraná. Referências. **Modulares para a produção de feijão na região sudoeste do Paraná**. Disponível em: <http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/redereferencia/pp_modsudoestefeijao.pdf> Acesso em 22 jul. 2013. c

IMAMURA, N. et al. A Novel Anti-Cyanobacterial Compound Produced by an Algal Lysing Bacterium. **The Journal of antibiotics**, v. 53, n.11, p.1317-1319, 2000.

JANISIEWCZ, W. J., WORKOSKI, T.J., SHARER, C. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. **Phytopathology**, v.9, n.11, p.1196-1200, 2000.

KAWASHIMA, L. M.; VALENTE, S. L. M. Incidência de fumonisinaB1, aflatoxinasB1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciênc.Tecnol. Aliment**, Campinas, v.26, n.3, p.516-521, jul.-set. 2006.

LAZARETTI, Katia Elisa S. et al. Comparação entre os meios de cultura para contagem de fungos no controle microbiológico de erva-mate. **B. CEPPA**. Curitiba, v.18, n.2, p. 163-170, jul./dez. 2000.

LEAL, P da C.; CANTANHEDE, K de L.; SILVA, L.M.; BEZERRA, G.F de B.; VIANA, G.M de C.; NASCIMENTO, M do D. S. B. Micotoxinas do Fusarium e seu Potencial Carcinogênico. **NewsLab** - edição 70 – 2005.

MALUF, R. S.; MENEZES, F. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Caderno “Segurança Alimentar”**. Disponível em: <http://ag20.cnptia.embrapa.br/Repositorio/seguranca+alimentar_000gvxlxe0q02wx7ha0g934vgwlj72d2.pdf> Acesso em: 12 dez. 2013.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Estatísticas**. 2013. Disponível em:<
<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/estatisticas> > Acesso 06 ago. 2013.

MOTOMURA, M.; HIROOKA, E. Y. Método rápido para o isolamento de microorganismos de solo com atividade antifúngica cobre *Fusarium verticillioides*. **Arquivos de biologia e tecnologia**, v. 39, n. 2, p. 313-322, 1992.

NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. *Fusarium species-an illustrated manual for identification*. Pennsylvania, Pennsylvania State University Press, 1983.

NIEVINSKI, Paloma Geremia. **Trigo: do grão à farinha**. 2009. 47f. Monografia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

NOGUEIRA, S.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Prevalência de Ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. **Alimentação Humana**, Porto, v.12, n. 2, 2006.

PAES, M. C. D. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Disponível em: <http://ag20.cnpqia.embrapa.br/Repositorio/fisquitectolmilho_000fghw39ut02wyiv80drauen1rteuta.pdf> Acesso em: 03 jan. 2014.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Objetivos da Microbiologia. In: _____. **Microbiologia conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Pearson Makron Books, 1997. p. 52-74.

PUZZI, Domingos. **Abastecimento e armazenagem de grãos**. Campinas, SP: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1997.

ROMANO, M. R. **Desempenho fisiológico da cultura de milho com plantas de arquitetura contrastante**: parâmetros para modelos de crescimento. 2005. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

SAITO, L. R.; SALES, L. L. S. R.; MARTINCKOSKI, L.; ROYER, R.; RAMOS, M. S.; REFFATTI, T. Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. No biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 2, n. 3, set./ dez. 2009.

SCHEUER, Patrícia Matos et al. Trigo: características e utilização na panificação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.13, n.2, p.211-222, 2011.

SENTE, L. **Otimização da produção e purificação de compostos antimicrobianos de leveduras para desenvolvimento de um novo agente fúngico**. 2010, 70 f. Dissertação (mestrado em microbiologia agrícola). UFRGS, Porto Alegre, 2010.

SILVA, J. S.; CAMPOS, M. G.; SILVEIRA, S. F. R. Armazenagem e comercialização de grãos no Brasil. In: SILVA, J. S. **Secagem e armazenamento de produtos agrícolas**. Editor Juarez de Sousa e Silva. Viçosa: Aprenda Fácil, 2008. P. 1-19.

THABULSI, Luiz R.; ALTERTHUM, Flavio. Micologia Especial e Clínica. In:_____. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

TONDO, Eduardo César; BARTZ, Sabrina. **Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de alimentos**. Porto Alegre: Sulina, 2011.