ESTUDO DA VARIABILIDADE DE PRODUÇÃO DE
AFLATOXINAS POR LINHAGENS DE *Aspergillus flavus* EM
DIFERENTES TEMPOS DE ESTOCAGEM

MARTA HIROMI TANIWAKI

Orientador: HOMERO FONSECA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: - Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro, 1984

"Tudo fez Deus formoso no Seu devido tempo, também pôs a eternidade no coração do homem, sem que este possa descobrir as obras que Deus fez desde o princípio até o fim".

Eclesiastes 3:11

Aos meus pais,

que sempre me incentivaram,

e em todas as horas me apoiaram

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Muitos colaboraram na realização deste trabalho, e quero nesta hora agradecer a todos que de alguma forma contribuíram, e também me dirigir especialmente para:

Ao Prof. Dr. Homero Fonseca, pela valiosa orientação na elaboração deste trabalho, bem como pelo carinho e incentivo em todas as horas.

À Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani Kleiner, pelo apoio e pela orientação na parte de citologia.

À Dra. Maria Luiza Filgueiras Barbosa, pelo incentivo nos trabalhos iniciais.

Ao ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos, especialmente à Dra. Maria Regina Sartori, chefe da Seção de Armazenamento e Beneficiamento, pelas facilidades concedidas.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao Prof. Dr. Urgel de Almeida Lima pelas facilidades concedidas, como chefe do Departamento de Tecnologia Rural, e também ao Prof. Dr. Alcides Martinelli Filho e Prof. Dr. Rodolfo Camargo, pela colaboração na parte de microbiologia.

Aos Amigos Anne Lore Schnoeder, Luiz Eduardo Baldijão, Maria Amélia Toffolo Rodini, Maria Aparecida Grecchi e Silas César Silva, pela amizade e incentivo.

A Sandra Cecília Miano, Ivani Valarini e João Baptista Beraldo, pelo auxílio técnico e colaboração.

A Dora Regina Duarte Chiaramonte, pelo auxílio prestado na confecção dos gráficos.

Aos Irmãos Noemi Nosomi Taniwaki e Paulo Taniwaki, pelo carinho e apoio.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xi
SUMMARY	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Aspectos Gerais	4
2.2. Estudos Fisiológicos	8
2.3. Estudos Genéticos	11
2.4. Estudos Bioquímicos	15
2.5. Estudos Morfológicos e Citológicos	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Organismo Produtor de Aflatoxinas	22
3.2. Meios de Cultivo	23
3.2.1. Meio de Czapeck, citado por RAPER e FENNELL (1965)	24
3.2.2. Meio de Czapeck modificado por FONSECA <i>et alii</i> (1974)	24
3.3. Meio de Cultura para Produção de Aflatoxina	25
3.3.1. Meio "YES", descrito por DAVIS <i>et alii</i> (1966)	25
3.4. Métodos para Conservação de Fungos	25
3.4.1. Método de transferência pe- riódica	25
3.4.2. Método de preservação em óleo mineral	26

	Página
3.5. Extração das Aflatoxinas	26
3.5.1. Extração do meio de cultura	26
3.5.2. Extração do micélio	27
3.6. Determinação Quantitativa das Afla- toxinás	27
3.7. Análise Microscópica	29
3.7.1. Corante safranina - 0,10%	29
4. RESULTADOS	30
4.1. Produção Inicial de Aflatoxinas	30
4.2. Produção de Aflatoxinas pelas Linha- gens Mantidas em Óleo Mineral	31
4.3. Produção de Aflatoxinas pelas Linha- gens Repicadas Periodicamente	39
4.4. Observação dos Caracteres Morfológi- cos dos Fungos	42
5. DISCUSSÃO	47
5.1. Variação na Produção de Aflatoxinas nas Linhagens Mantidas em Óleo Mine- ral e Repicadas Periodicamente	47
5.2. Perda na Capacidade de Produzir Afla- toxinás	51
5.3. Observação dos Caracteres Morfológi- cos	53
5.4. Produção de Aflatoxinas em Substra- tos Diferentes	54
5.5. Aflatoxinas e Micovírus	57
5.6. Aflatoxinas: um Metabólito Secundário	58
6. CONCLUSÕES	60
LITERATURA CITADA	62

LISTA DE TABELAS

Tabela nº		Página
1	Produção de aflatoxinas B ₁ e G ₁ no meio de cultura e no micélio por linhagens de <i>A. flavus</i> isoladas por FONSECA <i>et alii</i> (1974)	6
2	Produção de aflatoxinas B ₁ e G ₁ no meio de cultura e no micélio por linhagens de <i>A. flavus</i> isoladas por FONSECA <i>et alii</i> (1974) após 9 anos de estocagem	7
3	Produção inicial de aflatoxinas das linhagens do grupo <i>A. flavus</i> , isoladas do amendoim (Média de duas repetições)	30
4	Produção de aflatoxinas da linhagem 2, mantida em óleo mineral (Média de duas repetições)	32
5	Produção de aflatoxinas da linhagem 4, mantida em óleo mineral (Média de duas repetições)	33
6	Produção de aflatoxinas da linhagem 6, mantida em óleo mineral (Média de duas repetições)	34
7	Produção de aflatoxinas da linhagem 2, repicada periodicamente (Média de duas repetições)	39

Tabela nº	Página
8	Produção de aflatoxinas da linhagem 4, repicada periodicamente (Média de duas repetições) 40
9	Produção de aflatoxinas da linhagem 6, repicada periodicamente (Média de duas repetições) 41

LISTA DE FIGURAS

Figura nº		Página
1	Produção de aflatoxinas B ₁ e G ₁ (ppm) no meio de cultura e no micélio, da linhagem 2, mantida em óleo mineral	36
2	Produção de aflatoxinas B ₁ e G ₁ (ppm) no meio de cultura e no micélio, da linhagem 4, mantida em óleo mineral	37
3	Produção de aflatoxinas B ₁ e G ₁ (ppm) no meio de cultura e no micélio, da linhagem 6, mantida em óleo mineral	38
4	Produção de aflatoxinas B ₁ e G ₁ (ppm) no meio de cultura e no micélio, da linhagem 2, repicada periodicamente	43
5	Produção de aflatoxinas B ₁ e G ₁ (ppm) no meio de cultura e no micélio, da linhagem 4, repicada periodicamente	44
6	Produção de aflatoxinas B ₁ e G ₁ (ppm) no meio de cultura e no micélio, da linhagem 6, repicada periodicamente	45

ESTUDO DA VARIABILIDADE DE PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS POR
LINHAGENS DE *ASPERGILLUS FLAVUS* EM DIFERENTES
TEMPOS DE ESTOCAGEM

Marta Hiromi Taniwaki

Orientador: Homero Fonseca

RESUMO

O presente trabalho foi realizado, com a finalidade de estudar a produção de aflatoxinas, por linhagens de *A. flavus*, recém isoladas, em diferentes tempos de estocagem, a fim de contribuir para um melhor entendimento do mecanismo de variação na produção de aflatoxinas. Para isso, foram utilizadas três linhagens de *A. flavus* produtoras de aflatoxinas, classificadas como: A) grande produtora; B) média produtora e C) baixa produtora.

Neste experimento, que durou 280 dias, os fungos foram estudados em dois métodos de preservação: mantido em óleo mineral, no meio de Czapeck, e repicado periodicamente no meio de Czapeck modificado. A análise de produção de aflatoxina foi efetuada de 30 em 30 dias, seguindo a técnica de extração com clorofórmio (meio de cultura) e acetona 70% (micélio). A quantificação da toxina foi feita

por cromatografia em camada delgada pela técnica de avaliação visual.

Foi constatada uma variação na produção de toxina em todas as linhagens, contudo elas não perderam suas características de grande, média e baixa produtora. Até o momento nenhuma linhagem perdeu sua capacidade de sintetizar aflatoxinas.

Observações microscópicas revelaram zonas de espessamento e alargamento de hifas, além de algumas estruturas globosas que podem estar relacionadas às áreas de produção de aflatoxinas.

STUDY OF THE VARIABILITY IN THE PRODUCTION OF AFLATOXINS
BY *ASPERGILLUS FLAVUS* STRAINS AFTER DIFFERENT
STORAGE TIMES

Marta Hiromi Taniwaki

Adviser: Homero Fonseca

SUMMARY

The present work was carried out aiming to study the aflatoxin production, by strains of *Aspergillus flavus*, recently isolated, after different storage times, in order to better understand the mechanisms of possible variations in the aflatoxin production. To cope with this objective, three *A. flavus* aflatoxin producing strains were utilized, classified as: a) high producer; b) medium producer and c) low producer.

The experiment lasted 280 days and the molds were studied in two preservation methods: oil covered slants on Czapeck's medium and periodic transfer on Czapeck's modified medium. The quantification of the aflatoxin produced was made at 30 days intervals. The mycelium was extracted with 70% acetone and then transferred to chloroform and culture medium with chloroform followed by thin-layer chromatography and visual determination by technique of

dilution-to-extinction.

The production of aflatoxins by all strains varied but they did not lose their characteristics of high, medium and low producers. Till now the strains did not lose their capacity to syntetize aflatoxin.

Microscopic examinations revealed thickened zones and hifal enlargements over some globoses structures that can be related with aflatoxin production sites.

1. INTRODUÇÃO

Em 1960, a morte de mais de cem mil peruzinhos na Inglaterra, alimentados com ração contaminada por aflatoxinas produzidas pelo fungo *Aspergillus flavus*, despertou a atenção dos pesquisadores para o problema das micotoxinas.

Aflatoxinas são metabólitos secundários do *A. flavus*, responsáveis por intoxicações e têm se mostrado cancerígenas a diversas espécies de animais. Devido a essa característica, o estudo das aflatoxinas tem sido alvo de atenção nunca devotadas a nenhum outro problema relacionado a fungos (CHRISTENSEN, 1975). Uma série de aflatoxinas são produzidas por *A. flavus* e linhagens relacionadas, destacando-se B₁ e B₂, G₁ e G₂, que se apresentam com fluorescência azul violeta e esverdeada, respectivamente, quando analisadas em cromatografia de camada delgada à luz ultravioleta em 365 nm e estão entre as micotoxinas mais potentes.

Qualquer produto vegetal ou animal é suscetível ao ataque por fungos, desde que as condições ambientais e do substrato sejam propícias e, portanto, qualquer daqueles produtos pode representar fonte potencial de micotoxinas.

Atualmente já se sabe que existem linhagens de *A. flavus* que não produzem aflatoxinas, outras que só produzem as do grupo B e outras só do grupo G.

Inúmeras pesquisas têm demonstrado que há considerável variação na capacidade para produzir aflatoxinas pelas diversas linhagens de *A. flavus* e *A. parasiticus*, mesmo quando são isoladas da mesma fonte (LEAICH e PAPA, 1974). Um dos maiores problemas encontrados pelos pesquisadores no estudo de produção de aflatoxinas é a variação no nível de produção que uma determinada linhagem apresenta durante todo o experimento. Uma linhagem pode ser altamente toxigênica e posteriormente perder esta alta toxigenicidade, não se sabendo se esta perda foi devida a fatores externos, como as condições e tempo de estocagem, ou, se há outros fatores envolvidos (FONSECA)^{1/}.

Desta forma, o presente trabalho visa estudar principalmente a influência do tempo na produção de

^{1/} FONSECA, H. 1980. Comunicação pessoal.

aflatoxinas por linhagens de *A. flavus* em diferentes tempos de estocagem, a fim de contribuir para melhor entendimento do mecanismo de variação na produção de aflatoxinas. Portanto é objetivo do trabalho:

- Determinar quantitativamente a produção de aflatoxinas pelo *A. flavus*, após a estocagem por diferentes períodos de tempo (repetibilidade de produção de aflatoxinas).
- Analisar caracteres morfológicos e citológicos, nas linhagens estudadas, para relacionar com o mecanismo de produção de aflatoxinas nestas linhagens.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Estudos fisiológicos, genéticos, bioquímicos e citológicos, em *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, têm sido realizados, juntamente ou não, com o caráter produção de aflatoxina.

2.1. Aspectos Gerais

Aflatoxinas são sintetizadas por duas espécies intimamente relacionadas, *A. flavus* e *A. parasiticus*, com base em RAPER e FENNELL (1965). Estas espécies são muito semelhantes entre si, e as diferenças, na maior parte, são baseadas na textura e coloração das colônias, fiárides uni ou biseriadas e tamanho do conídio (MIROCHA *et alii*, 1979). De acordo com LIN (1980), vários gêneros e espécies de fungos já foram relatados como produtores de aflatoxinas, porém, a maioria destes relatos ainda precisam de confirmação. Atualmente, pode-se dizer que os fungos grande

produtores de aflatoxinas pertencem a estas duas espécies, *A. flavus* e *A. parasiticus*, ambas pertencentes ao grupo-espécie *A. flavus* (RAPER e FENNELL, 1965).

O fungo *A. flavus* foi descrito por RAPER e FENNELL (1965) como sendo um fungo filamentoso, com abundante conidiação, quando crescido em meio de Czapeck sólido. Seu crescimento é rápido, plano e radiado, sua cor amarelado-esverdeado tende a verde oliva, após longo período de desenvolvimento.

Alguns fungos produzem toxinas, enquanto outros não. Além disso, nem todas as linhagens de espécies toxigênicas produzem toxinas. Conforme SCHROEDER e CARLTON (1973), linhagens de espécies produtoras de aflatoxinas do grupo *A. flavus*, variam grandemente na habilidade de produzir e acumular compostos das séries de aflatoxinas.

LIN (1980) revisando vários autores, observou que embora todas as linhagens de *A. parasiticus* sejam produtoras de aflatoxinas, nem todas as linhagens de *A. flavus* são capazes de produzir. Além disso, *A. parasiticus* é geralmente maior produtor de aflatoxina do que *A. flavus* e parece que todas as linhagens de *A. parasiticus* conhecidas são produtoras das quatro aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2), enquanto as linhagens produtoras de *A. flavus* na maioria das

vezes produzem somente duas aflatoxinas (B_1 e B_2).

FONSECA *et alii* (1974) isolaram algumas linhagens de *A. flavus*, as quais produziam aflatoxinas em grandes quantidades, tanto no meio de cultura, como no micélio (Tabela 1).

Estes fungos foram guardados na Micoteca do Departamento de Tecnologia Rural da ESALQ, pelo método de conservação em óleo mineral.

Tabela 1. Produção de aflatoxinas B_1 e G_1 no meio de cultura e no micélio por linhagens de *A. flavus* isoladas por FONSECA *et alii* (1974)

Linhagem	Produção de aflatoxinas (ppm)			
	Meio de cultura		Micélio	
	B_1	G_1	B_1	G_1
2025	10	7,5	-	-
2026	0,2	0,15	-	-
2027	-	-	80	60
2028	8,0	6,0	400	300
2029	40	30	400	300

Após 9 anos, em 1983 o quadro da produção de aflatoxinas nestas linhagens foi bem diferente (dados não publicados), como mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Produção de aflatoxinas B₁ e G₁ no meio de cultura e no micélio por linhagens de *A. flavus* isoladas por FONSECA *et alii* (1974) após 9 anos de estocagem

Linhagem	Produção de aflatoxinas (ppm)			
	Meio de cultura		Micélio	
	B ₁	G ₁	B ₁	G ₁
2025	-	-	-	-
2026	8	-	38	-
2027	-	-	0,4	-
2028	0,9	0,67	3,5	2,6
2029	-	-	-	-

Como podemos ver, aquelas linhagens que eram altamente produtoras de aflatoxinas, já não produziram mais e em outras a produção caiu significativamente. Esse fato já havia sido observado anteriormente (FONSECA)^{1/}.

SCHROEDER e CARLTON (1973) isolaram uma linhagem de *A. flavus*, de grãos de pimenta, acumulando apenas aflatoxina B₂, quando crescido em vários substratos naturais. Não há relatos anteriores de linhagens capazes de produzir grandes quantidades de B₁ e G₁ exclusivamente. Quando

^{1/} FONSECA, H., 1980. Comunicação pessoal.

esta linhagem foi isolada, ela produzia 900 ug/g de aflatoxina. Com subculturas sucessivas, a produção declinou rapidamente, produzindo depois, 200 ug/g. Em nenhum momento esta linhagem produziu aflatoxina B₁, G₁ ou G₂.

BOLLER e SCHROEDER (1974) trabalhando com conídios secos de *A. parasiticus* e *A. flavus*, estocados em laboratório, a fim de verificar se a habilidade de produzir aflatoxina decrescia com o tempo de estocagem e observaram que a habilidade de produzir aflatoxina nestas condições, permanece inalteradas, por períodos de até 34 meses. A produção de aflatoxina foi determinada mensalmente e foi observado que não houve uniformidade na produção de toxina de cada isolado nas diferentes épocas do teste.

2.2. Estudos Fisiológicos

DIENER e DAVIS (1969) pesquisando os fatores ambientais que afetam a produção de aflatoxina em *A. flavus* tais como: temperatura, umidade relativa, oxigênio e dióxido de carbono, verificaram que a temperatura mínima, para produção de aflatoxina é de 12°C, e a máxima é de 42°C, estando a ótima entre 24 e 30°C. Quanto à umidade relativa, verificaram que o limite inferior era de 85% para o crescimento do fungo e produção de toxina. A concentração reduzida de oxigênio, reduziu a produção de aflatoxina; por

outro lado, a produção de aflatoxina decresceu com o aumento da concentração de dióxido de carbono.

DAVIS *et alii* (1966) desenvolveram um meio semi-sintético para a produção de aflatoxina que consiste em: 20% de sacarose e 2% de extrato de levedura. Este meio proveu todos os ingredientes necessários para a produção de altos níveis de aflatoxinas. Não foi necessário nenhum ingrediente adicional, nem ajustamento do pH inicial.

HESSELTINE *et alii* (1966) estudando a formação de aflatoxinas por *A. flavus*, verificaram que há grande diferença nas capacidades das linhagens para produzir aflatoxinas, mesmo por linhagens já conhecidas como produtoras, e essas diferenças ocorrem em função do meio de cultivo ou substrato empregado.

NORTHOLT *et alii* (1977) conduziram um estudo para investigar a hipótese de que, as diferenças nas temperaturas ótimas para a produção de aflatoxina, relatada por vários autores, seriam por causa das diferenças nas linhagens de *A. flavus*, hipótese esta confirmada pelos resultados do experimento. Além disso, verificaram que outro fator, que determina a temperatura ótima, é o tipo de substrato.

MOREAU (1979) revisando vários autores verificou que o fungo *A. flavus* pode utilizar uma grande

variedade de carboidratos simples ou polissacarídeos como o amido, carboximetilcelulose como sua única fonte de carbono. O crescimento de *A. flavus* pode ser profundamente influenciado pela natureza da fonte de nitrogênio, e além disso, este fungo possui a habilidade de produzir nitritos e nitratos a partir do nitrogênio orgânico por um processo de nitrificação.

REDDY *et alii* (1979), testaram o efeito de várias fontes simples e complexas de nitrogênio e carbono na formação de aflatoxina. Segundo estes autores, a habilidade de utilizar fontes de nitrogênio orgânico ou inorgânico e de carbono para a formação de toxina, depende da linhagem do fungo, da composição do meio, do pH e da temperatura.

De acordo com LIN *et alii* (1980), a linhagem do organismo produtor de aflatoxina e os fatores ambientais e nutricionais, têm um pronunciado efeito na produção total e nas proporções relativas de aflatoxina B₁ e G₁.

Segundo WICKLOW *et alii* (1981), o cultivo de isolados produtores de toxinas no substrato natural, como o milho autoclavado, prova ser um teste mais seguro do potencial de produção de aflatoxina do que um meio semi-sintético.

2.3. Estudos Genéticos

Estudos genéticos em *A. flavus* e *A. parasiticus*, são podem ser realizados com a colaboração do ciclo parassexual, fenômeno este descoberto por PONTECORVO e ROPER (1952) em *A. nidulans*. O passo essencial do ciclo parassexual consiste em: heterocariose, diploidização, recombinação mitótica e haploidização (PONTECORVO *et alii*). PAPA (1973) observou pela primeira vez a existência do ciclo parassexual em *A. flavus* Link. Mais tarde PAPA (1978), observou o ciclo parassexual em *A. parasiticus*.

MURAKAMI *et alii* (1968) testando várias linhagens de *Aspergillus*, de uso industrial, verificaram que as mesmas não eram produtoras de aflatoxina. Contudo, algumas linhagens não industriais, que eram conhecidas como aflatoxigênicas, falharam em produzir aflatoxina. Segundo estes autores, há uma diferença na produtividade de aflatoxina entre uma linhagem e seus setores segregantes. Como no caso citado por estes autores, da linhagem RIB 4016 não produtora de aflatoxina, seu segregante RIB 4028 produziu, por outro lado, um forte produtor RIB 4009, deu um segregante RIB 40026 não produtor.

ELLIS (1969) descobriu um mutante laranja-amarelo de *A. parasiticus*, produzindo duas vezes mais aflatoxina B₁ e G₁ que a linhagem selvagem.

LEAICH e PAPA (1974) isolaram mutantes de *A. flavus*, para determinar a extensão da variabilidade de produzir aflatoxina. Não observaram correlação entre necessidade nutricional e produção de aflatoxina. Uma análise estatística demonstrou que as diferenças de produção de aflatoxinas B_1 e B_2 são significativas entre os mutantes estudados, classificando-os em três níveis: alto, intermediário e baixo.

PAPA (1976) identificou sete grupos de ligação em *A. flavus*, por meio do ciclo parassexual. Mais tarde PAPA (1977) identificou um gene recessivo controlando o acúmulo de aflatoxina B_2 maior que B_1 , e este mostrou estar ligado ao "loco" histidina no grupo de ligação VIII. Pela segregação independente do "loco" histidina e por outras marcas gênicas localizadas nos grupos de ligação I ao VII, oito grupos de ligação no fungo *A. flavus* puderam ser estabelecidos. Um mutante relativamente estável acumulando altos níveis de aflatoxina B_2 (5000 ug/g de peso seco micelial) e baixos níveis de aflatoxina B_1 (600 ug/g de peso seco micelial) foi analisado pelo ciclo parassexual revelando um "loco" gênico envolvido na biossíntese de aflatoxina.

MESSIAS *et alii* (1976) trabalhando com três linhagens de *A. flavus* Link. diferindo na produção de aflatoxinas, estudaram aspectos relacionados com o ciclo

parassexual e a produção de aflatoxinas. Com os mutantes morfológicos e auxotróficos obtidos, observaram a compatibilidade entre as linhagens de diferentes origens, formando diplóides entre elas. A produção variou nas diferentes linhagens (mutantes diplóides e segregantes haplóides) e não houve relação com alterações devidas às marcas nutricionais, antes foi verificado uma grande divergência na produção de aflatoxinas pelos segregantes obtidos a partir das linhagens diplóides. MESSIAS (1977) verificou que o caráter produção de aflatoxinas em *A. flavus* é complexo, e possivelmente, muitos genes estão envolvidos.

GUSSAK *et alii* (1977), examinando oito isolados de *A. flavus* e *A. parasiticus*, para detectar a presença de partículas semelhantes a vírus (VLP "virus-like particles"), encontraram-nas somente em linhagens de *A. flavus*. Foi estudada a parassexualidade na linhagem aflatoxigênica de *A. flavus* contendo VLP, porém, não foi detectada nenhuma evidência de uma correlação entre produção ou não de aflatoxina e a presença das partículas semelhantes a vírus.

HOLLINGS (1978), revisando vários autores, concluiu que a produção de micotoxinas, raramente está correlacionada com a presença ou ausência de um micovírus. Nesta revisão ele cita o exemplo de duas espécies de *Aspergillus* infectadas com vírus e produzindo aflatoxina, uma

linhagem de *A. flavus* infectada com vírus, sem produzir, e também dois isolados de *A. parasiticus*, aparentemente livres de vírus, ambos produzindo aflatoxina.

Por outro lado, Bousquet, em 1973 (citado por HOLLINGS, 1978) relatou uma correlação positiva entre a produção da toxina piriculol pelos fungos que invadem o arroz (*Pyricularia oryzae*) e a presença de VLP.

PAPA (1979), obteve catorze mutantes não aflatoxigênicos, ao tratar conídios de seis mutantes de coloração de esporos e auxotróficos, com nitrosoguanidina. Testes de complementação dos diplóides revelaram que a maioria destes mutantes para aflatoxinas não são alélicos. A complementação não ocorreu entre todos os mutantes testados, e a maioria foi recessiva nos diplóides, com exceção do mutante *afl-1*.

BENNETT *et alii* (1980) empregaram um método de exposição breve dos esporos de *A. parasiticus* em *p*-flufenilalanina (*p*FA), a fim de recuperar marcas auxotróficas a partir dos diplóides heterozigotos. Foram examinados sete diplóides heterozigotos com três marcas na coloração de esporos e oito marcas auxotróficas. Além destes, foram analisados mais dois mutantes bloqueados na produção de aflatoxinas, acumulando detectáveis precursores de aflatoxinas. Houve evidência de ligação entre uma marca auxotrófica

e uma marca de coloração de esporos, mas nenhuma evidência foi encontrada para ligação entre os mutantes bloqueados na síntese de aflatoxina e as outras marcas estudadas. Neste experimento os autores realizaram o primeiro estudo comparativo de superfície de ornamentação entre conídios haplóides, heterocarióticos e diplóides de *A. parasiticus*, com microscopia eletrônica tipo "scanning". Suas observações indicaram que as superfícies de ornamentação foram similares para estes tipos de esporos de *A. parasiticus*.

PAPA (1982) descobriu um mutante de *A. flavus* acumulando ácido norsolorínico e aproximadamente 50% menos aflatoxina que a linhagem parental, após o tratamento dos conídios com nitrosoguanidina. O gene *nor* controlando este fenótipo mutante, foi recessivo e ligado ao *afl-1* e *leu* no grupo de ligação VII. Homozitogos diplóides para *nor* foram similares aos haplóides em acumular ácido norsolorínico. A análise de recombinantes diplóides e haplóides mostraram que *afl-1* e *nor* foram distais para *leu* no mesmo braço cromossômico.

2.4. Estudos Bioquímicos

CODNER *et alii* (1963) verificaram que existem linhagens produtoras de aflatoxinas, desprovidas de dois de seus constituintes normais G_1 e G_2 . Sendo assim, este fato sugere que os tipos de aflatoxinas podem seguir uma sequência de processos enzimáticos.

LEE *et alii* (1971) ao analisarem um mutante de *A. parasiticus*, observaram que este mutante elaborou 80% menos aflatoxina que a linhagem parental e um grande acúmulo de ácido norsolorínico, que poderia ser um possível intermediário na síntese.

Da mesma forma, DONKERSLOOT *et alii* (1972) estudando um outro mutante de *A. parasiticus*, também prejudicado na biossíntese de aflatoxina, observou que este acumulava a averufina, que também poderia ser intermediário da biossíntese.

Mais tarde SINGH e HSIEH (1977) utilizando mutantes de *A. parasiticus* marcados com "¹⁴C", bloqueados na síntese de aflatoxinas, propuseram a via biossintética da aflatoxina B₁ como sendo: acetato → averufina → acetato versiconal → versicolorina A → esterigmatocistina → aflatoxina B₁.

De acordo com LIN (1980), o caminho mais provável da biossíntese da aflatoxina é: 1 acetil CoA + 9 malonil CoA → ácido norsolorínico → averufina → acetato versiconal → versicolorina A → esterigmatocistina → aflatoxina.

SCHMIDT *et alii* (1977) utilizaram comparações eletroforéticas de enzimas miceliais de linhagens produtoras e não produtoras de aflatoxina. Os dados deste

experimento sugeriram que há um certo grau de similaridade entre as linhagens de *A. flavus* e *A. parasiticus*, e isto poderia ser o resultado de um ancestral comum ou de uma ocasional hibridização das duas espécies. Segundo aqueles autores é possível que nestas linhagens, onde falta um estágio sexual, as variações ocorram via ciclo parassexual.

2.5. Estudos Morfológicos e Citológicos

LEAICH e PAPA (1975) analisando citologicamente os conídios de *A. flavus*, observaram que haplóides binucleados ($N + N$) e diplóides uninucleados ($2N$) apresentam o mesmo volume conidial, pois o haplóide tem quantidade praticamente equivalente de DNA em relação ao diplóide.

Vários autores tem tentado correlacionar certas peculiaridades morfológicas presentes em linhagens toxigênicas, tais como: a presença de esferócitos, hipertrofia de hifas, as séries de fiálides, e outros traços significantes com sua toxigenicidade (TORRES *et alii*, 1980).

MURAKAMI *et alii* (1968) pesquisando as diferenças morfológicas em *Aspergillus* entre as produtoras e não produtoras de aflatoxinas, observaram as seguintes características nas linhagens produtoras: cabeça conidial com pigmentação verde, mesmo em culturas idosas, lado reverso da colônia enrugado e pigmentado, presença de esclerócio,

vesícula globosa ou subglobosa, esterigma geralmente biseriada e conidióforo com parede enrugada e com alta pigmentação. Estes autores analisando várias linhagens, concluíram que as características micológicas, descritas acima, são necessárias aos fungos para a produção de aflatoxina, mas nem sempre os fungos que possuem tais características são produtores de aflatoxinas.

MOREAU (1979) revisando vários autores verificou que os isolados com conidióforos enrugados e fiálides biseriadas geralmente são colocados nas espécies de *A. flavus*, enquanto aqueles com conidióforos lisos e fiálides uniseriadas são classificadas como *A. parasiticus*.

TORRES *et alii* (1980) estudando a produção de aflatoxinas em quatro linhagens de *Aspergillus*, crescendo em trigo moído e umidecido, verificaram evidência de um decréscimo na síntese de aflatoxina, acompanhada por trocas morfológicas após subculturas sucessivas. Foi observado que, através destas subculturas, ocorre uma redução de certos elementos estruturais e um aumento no desenvolvimento de outras. A quantidade do micélio vegetativo aumentou, tornando-se altamente predominante, dando uma aparência cottonosa às colônias. As vesículas diminuíram no número e tamanho, prejudicando a capacidade reprodutiva. Com estas observações, concluíram que o complexo enzimático do fungo

perdeu a capacidade para a síntese de aflatoxinas, e a perda foi acompanhada por trocas morfológicas.

ABOU-GABAL e FAGERLAND (1981) analisando a ultraestrutura de *A. parasiticus*, associaram a presença de clamidosporo com uma maior produção de aflatoxinas. Segundo estes autores, a presença de clamidosporo, foi devido às condições adversas do meio de cultura e, desta forma, os clamidiosporos converteram os nutrientes em metabólitos secundários ao invés de massa celular.

REIB (1982) investigando a relação entre conidiogênese e o metabolismo secundário em *A. parasiticus*, verificou que consideráveis quantidades de aflatoxina B₁ são sintetizadas e somente quando a formação de conídios é relativamente intensa.

BHATNAGAR *et alii* (1982) pesquisaram o papel dos blastosporos na proteção de *A. parasiticus*, dos altos níveis de aflatoxinas. Os dados obtidos sugerem que a formação dos blastosporos é um mecanismo adaptativo, pelo qual os fungos se protegem dos altos níveis de aflatoxinas. Estas células provavelmente têm permeabilidade reduzida e, portanto, a aflatoxina extracelular pode fazer pouco dano ao sistema. O desenvolvimento de parede espessa durante a fase estacionária de crescimento é observada em outros organismos produtores de metabolismo secundário.

WICKLOW e SHOTWELL (1982) estudando a distribuição de aflatoxina entre conídios e esclerócios de *A. fla-vus* e *A. parasiticus*, verificaram que os níveis totais de aflatoxinas, tanto nos conídios como nos esclerócios, podem variar grandemente, entre as linhagens produtoras de aflatoxinas. Isto é esperado, uma vez que isolados de *A. flavus* e *A. parasiticus* diferem na capacidade de produzir aflatoxina.

DOYLE e MARTH (1978 a, b e c) realizaram um minucioso estudo sobre a habilidade do micélio de *A. parasiticus* em degradar a aflatoxina. Destes estudos foram tiradas as seguintes conclusões: 1) a aflatoxina pode ser degradada pelo mesmo fungo que a produz, e a habilidade do micélio em degradar a toxina, aumenta com o aumento da produção da mesma (DOYLE e MARTH, 1978a); 2) micélios de uma mesma linhagem crescidos sob condições similares, podem variar na habilidade de degradar a aflatoxina pois, variação similar pôde ser notada na produção de aflatoxina, quando crescidos nas mesmas condições ambientais (DOYLE e MARTH, 1978b); 3) a habilidade do micélio em degradar a aflatoxi-na, foi influenciada pela temperatura e pH, o que sugere que o fator ou fatores responsáveis pela degradação é ou são enzimas (DOYLE e MARTH, 1978c).

DOYLE e MARTH (1979) mostraram também, que há uma relação positiva da atividade da peroxidase e a degradação de aflatoxina.

RAO *et alii*(1980), confirmaram esta evidência ao observarem que a peroxidase encontrada nos lipídios foi aumentada sob condições de reduzida produção de aflatoxina, este fato provavelmente ocorreu por causa da maior disponibilidade de NADPH. Por estes dados parece que a baixa atividade de lipídio e dos nucleotídios são favoráveis para a ótima produção de aflatoxina.

BHATNAGAR *et alii* (1982) também observaram que a elevada atividade da peroxidase coincidiu com o período máximo de produção de aflatoxina. De acordo com estes autores a peroxidase foi capaz de degradar as aflatoxinas em níveis bem altos e a alta atividade de GDH-NADP estaria associada à germinação dos blastosporos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no laboratório de Micotoxinas do Departamento de Tecnologia Rural e no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ-USP - Piracicaba).

3.1. Organismo Produtor de Aflatoxinas

Linhagens produtoras de aflatoxinas foram isoladas a partir de amendoins contaminados, provenientes do Estado de São Paulo

O isolamento dos fungos seguiu a seguinte técnica descrita por FONSECA *et alii* (1974): 10 g do material foi tomado e transferido assepticamente para frascos de erlenmeyer contendo 90 ml de água esterilizada. Os frascos foram agitados cuidadosamente, obtendo uma suspensão de esporos de 10^{-1} . A seguir, 1 ml dessa solução foi tomada, e

transferida para tubos de cultura contendo 9 ml de água esterilizada. Esta operação foi repetida, de modo a obter diluições de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} . Das diluições 10^{-5} e 10^{-6} foram tomadas 1 ml, e de 10^{-3} e 10^{-4} foram tomadas 0,1 ml. Estas diluições foram colocadas em placas de Petri esterilizadas, com duas repetições para cada diluição. O meio de Czapeck foi acrescentado e as placas foram agitadas levemente, para dar uma distribuição uniforme aos esporos por todo o meio. As placas foram incubadas a 28°C , durante 4 a 6 dias. As colônias foram isoladas à medida que foram aparecendo nas placas. Colônias do grupo *A. flavus* puderam ser distinguidas, pelas suas características macroscópicas, como: conidióforos longos, abundante produção de esporos de coloração verde-oliva e verde amarelada.

3.2. Meios de Cultivo

As colônias crescidas no meio de Czapeck foram isoladas assepticamente, tomando-se por base as características citadas acima, sendo transferidas para o meio de Czapeck modificado por ser um meio mais rico, que proporciona um melhor desenvolvimento ao fungo.

Seguindo as instruções de RAPER e FENNELL (1965), oito colônias do grupo *A. flavus* foram isoladas do amendoim, cada colônia recebeu uma numeração, à medida em

que foram isoladas. Depois de testar cada isolado quanto à aflatoxigenicidade, três linhagens de números 2, 4 e 6, foram escolhidas para trabalhar neste experimento.

3.2.1. Meio de Czapeck, citado por RAPER e FENNELL (1965):

NaNO_3	3,0 g
K_2HPO_4	1,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5 g
KCl	0,5 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,01 g
Sacarose	30,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

3.2.2. Meio de Czapeck modificado por FONSECA *et alii* (1974):

NaNO_3	3,0 g
K_2HPO_4	1,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5 g
KCl	0,5 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,01 g
Sacarose	200 g
Extrato de levedura.	7,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

3.3. Meio de Cultura para Produção de Aflatoxina

As linhagens foram testadas, na capacidade de produzir aflatoxina, no seguinte meio de cultura.

3.3.1. Meio "YES", descrito por DAVIS *et alii*(1966):

Extrato de levedura 2%
Sacarose20%
Água destilada1000 ml

Os fungos permaneceram neste meio por um período de 10 dias, à 28°C, e em seguida fez-se a extração da toxina.

3.4. Métodos para Conservação de Fungos

Os fungos foram mantidos em dois métodos de preservação como estudados por FENNELL (1960).

3.4.1. Método de transferência periódica:

Os fungos foram repicados periodicamente, à medida que o substrato foi se esgotando. O meio utilizado foi de Czapeck modificado em tubos de cultura inclinados. Os fungos foram mantidos à temperatura de 28°C.

3.4.2. Método de preservação em óleo mineral

Os fungos cresceram em frascos de 10 ml com meio de Czapeck inclinado, à temperatura de 28°C. Quando a cultura atingiu toda a extensão do meio, ela foi coberta com óleo mineral esterilizado e o frasco foi tampado com tampa de borracha. As culturas foram conservadas à temperatura ambiente, e foram revigoradas em meio de Czapeck modificado, antes de serem usadas.

3.5. Extração das Aflatoxinas

A extração das aflatoxinas, do meio de cultura e do micélio, foram efetuadas segundo a metodologia descrita por FONSECA *et alii* (1974):

3.5.1. Extração do meio de cultura

O meio de cultura foi filtrado cuidadosamente em funil Büchner, com papel de filtro Whatman nº 1, à vácuo de trompa, sendo o meio recebido em kitazato. Uma alíquota de 5 ml do meio foi tomada e transferida para um funil de separação, adicionando-se 25 ml de clorofórmio para extrair a aflatoxina. A fase inferior foi coletada em béquer, adicionando-se Na_2SO_4 anidro para remover a umidade. O extrato foi passado para um frasco escuro, e guardado em refrigerador, para sua posterior cromatografia em placas de camada delgada de silicagel-G.

3.5.2. Extração do micélio

O micélio foi passado cuidadosamente, com 50 ml de acetona a 70%, para um balão extrator de Soxhlet e refluxado com este mesmo solvente durante uma hora e trinta minutos. A seguir, o solvente foi passado para um funil de separação de 250 ml, lavando o balão extrator com 20 ml de água destilada. A extração da toxina foi feita com duas porções de 25 ml de clorofórmio. A fase inferior foi coletada num bequer, adicionando-se Na_2SO_4 anidro. O extrato foi passado para um frasco escuro, e guardado em refrigerador, para sua posterior cromatografia.

3.6. Determinação Quantitativa das Aflatoxinas

Alíquotas dos extratos, juntamente com padrões das aflatoxinas, foram aplicados em placas cromatográficas cobertas com camada de 0,5 mm de espessura de silicagel-G. Os cromatogramas foram desenvolvidos com Tolueno:Acetato de etila:Ácido fórmico 90% (30:15:5), conforme descrito por SCOTT *et alii* (1970). A leitura da placa foi feita sob luz ultravioleta de ondas longas (365 nm), de uma lâmpada Philips, tipo HPW, 125 watt, numa câmara escura. A quantificação das aflatoxinas seguiu a técnica de COOMES e FEUELL (1965), que consiste numa avaliação visual de diluição até extinção. Para determinar a quantidade de aflatoxinas produzidas pelo fungo, o seguinte cálculo foi utilizado:

$$\text{ppm aflatoxina B}_1 = \frac{0,4 \times D}{P \times V}$$

$$\text{ppm aflatoxina G}_1 = \frac{0,3 \times D}{P \times V}$$

onde:

D = Volume total de solvente necessário para extrair e diluir ou concentrar a amostra

P = Peso da amostra

V = Volume, em microlitros, da menor alíquota em que foi observada fluorescência, no limite de sua visibilidade na placa.

Os valores 0,4 e 0,3 que correspondem às aflatoxinas B₁ e G₁, respectivamente, é decorrente do fato de que, nas condições do método estabelecidas por COOMES e FEUELL (1965), as menores quantidades das aflatoxinas B₁ e G₁ que podem ser observadas fluorescências na placa é de 0,0004 e 0,0003 microgramas, respectivamente.

Os padrões das aflatoxinas B₁ e G₁ foram obtidas no Departamento de Tecnologia Rural da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ-USP - Piracicaba).

3.7. Análise Microscópica

As observações microscópicas dos fungos foram realizadas no Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ-USP - Piracicaba).

A técnica utilizada foi o cultivo em lâmina: em placas contendo meio de Czapeck modificado sólido, colocou-se uma lamínula esterilizada. O fungo foi inoculado ao redor da lamínula a uma distância aproximada de 1 mm dela. Este procedimento foi realizado para cada linhagem. Após 24 horas de incubação o micélio se desenvolveu crescendo sobre a lamínula. Esta foi retirada e colocada sobre lâmina com uma gota do corante safranina alcoólica, e em seguida foi levada ao microscópio óptico. As estruturas das hifas, conídios e aparelho conidial foram observadas.

3.7.1. Corante safranina - 0,10%

Safranina 1,0 g

Alcool 95% 100 ml

Retirou-se 10 ml da solução de safranina alcoólica - 1,0% e completou-se para 90 ml de água destilada.

4. RESULTADOS

4.1. Produção Inicial de Aflatoxinas

A Tabela 3 apresenta a produção inicial de aflatoxinas das três linhagens, selecionadas com suas respectivas numerações.

Tabela 3. Produção inicial de aflatoxinas das linhagens do grupo *A. flavus*, isoladas do amendoim (Média de duas repetições)

Linhagem Nº	Produção de aflatoxinas (ppm)			
	Meio de cultura		Micélio	
	B ₁	G ₁	B ₁	G ₁
2	4,0	-	8,0	-
4	40	120	72,5	108
6	80	120	104	156

Como mostra a Tabela 3, as linhagens 4 e 6 produziram aflatoxinas do tipo B e G, enquanto que a linhagem 2 sō produziu aflatoxina do tipo B; as aflatoxinas do tipo B₂ e G₂ também foram produzidas, mas não foram determinadas quantitativamente. Todas as linhagens produziram aflatoxinas no meio de cultura e no micélio. A linhagem 2 foi uma fraca produtora de aflatoxina, quando comparada com a linhagem 4 e 6. Esta ũltima produziu a maior quantidade de aflatoxinas tanto no meio como no micélio.

4.2. Produção de Aflatoxinas pelas Linhagens Mantidas em Óleo Mineral

Neste experimento, que durou 280 dias, a produção de aflatoxinas foi determinada nos seguintes intervalos de tempo: 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 280 dias. As Tabelas 4, 5 e 6 apresentam a produção de aflatoxinas das linhagens 2, 4 e 6 respectivamente, mantidas em óleo mineral, durante este período.

Tabela 4. Produção de aflatoxinas da linhagem 2, mantida em óleo mineral (Média de duas repetições)

Tempo (dias)	Produção de aflatoxinas (ppm)			
	Meio de Cultura		Micélio	
	B ₁	G ₁	B ₁	G ₁
15	4,0	-	1,9	-
30	0,8	-	1,2	-
60	6,0	-	8,8	-
90	2,5	-	1,1	-
120	6,0	-	1,5	-
150	0,8	-	0,3	-
180	4,0	-	6,3	-
280	1,6	-	4,0	-

Tabela 5. Produção de aflatoxinas da linhagem 4, mantida em óleo mineral (Média de duas repetições)

Tempo (dias)	Produção de aflatoxinas (ppm)			
	Meio de cultura		Micélio	
	B ₁	G ₁	B ₁	G ₁
15	80	60	80	35
30	20	90	209	180
60	30	75	53	35,3
90	120	180	100	150
120	60	120	40	60
150	60	180	106	160
180	40	60	27,3	61,4
280	80	120	104,7	126,2

Tabela 6. Produção de aflatoxinas da linhagem 6, mantida em óleo mineral (Média de duas repetições)

Tempo (dias)	Produção de aflatoxinas (ppm)			
	Meio de cultura		Micélio	
	B ₁	G ₁	B ₁	G ₁
15	180	180	209	313
30	80	120	61	257
60	40	240	129	193
90	200	300	161	173
120	80	240	133	200
150	160	480	261	277
180	133	300	196	240
280	120	180	291	364

De acordo com as Tabelas 4, 5 e 6, podemos observar que não houve uma produção uniforme de aflatoxinas durante os períodos estudados, antes, ela variou grandemente. Não houve também redução na quantidade de aflatoxina, com a estocagem de 280 dias, em óleo mineral. A linhagem 2 continuou produzindo pouca aflatoxina, enquanto que as linhagens 4 e 6 continuaram produzindo quantidades relativamente grandes. A aflatoxina continuou sendo produzida tanto no meio como no micélio, e as linhagens que produziam aflatoxinas do tipo B e G continuaram produzindo, a linhagem 2 em nenhum momento deste experimento, produziu aflatoxina G. Em geral a aflatoxina G_1 foi produzida em maior quantidade que a B_1 pelas linhagens 4 e 6.

Para visualizar a variação da produção de aflatoxinas nestas linhagens, durante este período, os dados das Tabelas 4, 5 e 6 foram passados para um gráfico, portanto as Figuras 1, 2 e 3 ilustram estes dados, respectivamente.

Figura 1. Produção de aflatoxinas B₁ e G₁ (ppm) no meio de cultura e no micélio, da linhagem 2, mantida em óleo mineral

Figura 2. Produção de aflatoxinas B₁ e G₁ (ppm) no meio de cultura e no micélio, da linhagem 4, mantida em óleo mineral

Figura 3. Produção de aflatoxinas B₇ e G₇ (ppm) no meio de cultura e no micélio, da linhagem 6, mantida em óleo mineral

4.3. Produção de Aflatoxinas pelas Linhagens Repicadas Periodicamente

Em paralelo, com a análise da variabilidade de produção de aflatoxinas em linhagens mantidas no óleo mineral, foi realizada da mesma forma a análise destas linhagens, repicadas periodicamente. As Tabelas 7, 8 e 9 apresentam a produção de aflatoxinas das linhagens 2, 4 e 6, respectivamente, repicadas periodicamente, durante o período de 280 dias.

Tabela 7. Produção de aflatoxinas da linhagem 2, repicada periodicamente (Média de duas repetições)

Tempo (dias)	Produção de aflatoxinas (ppm)			
	Meio de cultura		Micélio	
	B ₁	G ₁	B ₁	G ₁
15	10,0	-	12,0	-
30	4,0	-	1,8	-
60	0,8	-	0,95	-
90	2,1	-	1,05	-
120	4,0	-	5,4	-
150	0,4	-	0,8	-
180	2,5	-	2,7	-
280	4,8	-	4,4	-

Tabela 8. Produção de aflatoxinas da linhagem 4, repicada periodicamente (Média de duas repetições)

Tempo (dias)	Produção de aflatoxinas (ppm)			
	Meio de cultura		Micélio	
	B ₁	G ₁	B ₁	G ₁
15	80	120	77,5	68
30	30	90	44	133
60	80	180	21,7	49
90	30	45	35,5	53,3
120	40	90	36	54
150	60	90	142	214
180	80	180	47,5	71,5
280	20	120	94,7	126

Tabela 9. Produção de aflatoxinas da linhagem 6, repicada periodicamente (Média de duas repetições)

Tempo (dias)	Produção de aflatoxinas (ppm)			
	Meio de cultura		Micélio	
	B ₁	G ₁	B ₁	G ₁
15	70	105	128	193
30	140	210	177	266
60	80	240	212	318
90	80	80	152	163
120	80	157	111	166
150	120	180	183	235
180	80	120	54	81
280	30	90	30,7	46,2

Estes dados novamente nos mostram que não houve grande uniformidade na produção de aflatoxinas, durante os períodos estudados, mesmo nas linhagens repicadas periodicamente. Cada linhagem continuou produzindo aflatoxinas no meio de cultura e no micélio, sem perder as características de produção das culturas iniciais.. Embora, em algumas épocas, a produção de aflatoxinas tenha diminuído mais de 50%, em outras épocas a produção aumentou mais de 100% quando comparadas às culturas iniciais.

Não se pôde notar diferenças entre as culturas mantidas em óleo mineral, com as culturas repicadas periodicamente, com respeito à produção de aflatoxinas. A média foi tomada de duas repetições, mas houve diferenças em algumas repetições, mesmo sendo trabalhadas em condições similares.

Os dados das Tabelas 7, 8 e 9 podem ser melhor visualizados nas Figuras 4, 5 e 6, respectivamente.

4.4. Observação dos Caracteres Morfológicos dos Fungos

Estas linhagens diferem morfolologicamente, na coloração de suas colônias, produção de esporos, tamanho dos conídios e dos conidióforos,

Quando elas foram testadas, quanto à produção de esporos, no meio de Czapeck modificado e no amendoim autoclavado, as linhagens 2 e 4 produziram esporos abundantemente, tanto no meio de cultura como no amendoim. A linhagem 6 por sua vez, produziu poucos esporos em ambos substratos e houve ocasiões em que seu crescimento foi predominantemente micelial. Contudo, sua produção de aflatoxinas não diminuiu significativamente e não foi notada nenhuma relação entre produção de aflatoxinas e esporulação, uma vez que a produção de aflatoxinas ocorreu tanto na forma micelial, como na forma esporulada.

Figura 4. Produção de aflatoxinas B₁ e G₁ (ppm) no meio de cultura e no micélio, da linhagem 2, repicada periodicamente

Figura 5. Produção de aflatoxinas B₁ e G₁ (ppm) no meio de cultura e no micélio, da linhagem 4, repicada periodicamente

Figura 6. Produção de aflatoxinas B_1 e G_1 (ppm) no meio de cultura e no micélio, da linhagem 6, repicada periodicamente

Analizando os fungos microscopicamente, verificou-se que a linhagem 6 apresenta poucos conidióforos, e de tamanho reduzido, enquanto que a linhagem 2 em geral apresentou o maior número de conidióforos e também de maior tamanho. A linhagem 4 apresentou poucos conidióforos e de tamanho intermediário.

Observou-se, também, em todas as linhagens, uma região de alargamento de hifas com paredes espessas e presença de algumas estruturas globosas. Nessa região quase não se verificou a presença de conidióforos. No presente trabalho o estudo destas estruturas não foi aprofundado. Contudo, estas observações sugerem a necessidade de um posterior estudo sobre tais caracteres, que poderiam estar relacionados com a produção de aflatoxina nestes fungos.

5. DISCUSSÃO

5.1. Variação na Produção de Aflatoxinas nas Linhagens Mantidas em Óleo Mineral e Repicadas Periodicamente

Ao compararmos os gráficos de produção de aflatoxina, dos fungos mantidos em óleo mineral (Figuras 1, 2 e 3), com os gráficos dos fungos repicados periodicamente (Figuras 4, 5 e 6), podemos observar que ambos se comportaram de forma semelhante. A produção de aflatoxinas nas três linhagens, durante cada época do experimento, não se manteve uniforme, embora cada linhagem não tenha perdido a característica da cultura original, isto é, a linhagem 2 continuou produzindo pouca aflatoxina, enquanto as outras duas linhagens continuaram produzindo maiores quantidades. De acordo com FENNELL (1960) estas variações ocorrem durante as transferências miceliais, de um frasco para outro e quando o inóculo é tomado de áreas envelhecidas, o acúmulo do produto de metabolismo pode exercer influência mutagênica.

Muitos laboratórios têm se preocupado em descobrir métodos para manter os fungos estocados por longos períodos, contudo a maioria das técnicas têm procurado ex-tender a longevidade das culturas, sem se importar com a ma-nutenção das características fisiológicas como: patogenicidade, produção de substâncias de interesses comerciais (an-tibióticos, enzimas, etc.) e no nosso caso a produção de aflatoxinas.

Um estudo detalhado sobre os métodos de preservação de fungos, foi fornecido por FENNELL (1960). Nest estudo foi discutido tanto o método de preservação em óleo mineral como o método de repicagem sucessiva, ambos utilizados no presente experimento. O primeiro método atua pela prevenção da desidratação e retardamento tanto da atividade metabólica, como do crescimento por causa da redução do con-sumo de oxigênio. A viabilidade da cultura é geralmente aumentada e um grande número de fungos têm sido preservados por este método e sobrevivido por longos períodos. Tem sido relatada redução na patogenicidade em culturas mantidas em óleo mineral, após dois anos. Além disso, cuidado deve ser tomado, na transferência de uma cultura mantida em óleo mineral, para uma subcultura, pois, a variação geralmente ocorre nesta fase. Por outro lado, no método de transferên-cias sucessivas a variação é ainda aumentada, pois, há um

constante dano cultural ou variação fisiológica em cada período de recrescimento, principalmente se entrar um grau de seleção dentro de cada inóculo durante as repicagens sucessivas.

Neste experimento o fungo mantido em óleo mineral, foi menos trabalhado que o repicado periodicamente, contudo, a variação ocorreu em ambos. De acordo com MOREAU (1979), a produção de aflatoxina é geralmente proporcional ao peso do micélio formado na cultura, sendo um máximo produzido quando a biomassa atinge o seu valor ótimo e declina rapidamente no momento em que o micélio inicia a sua autólise. Portanto, a variação ocorreu provavelmente devido ao inóculo, que nem sempre produziu a mesma quantidade de micélio e conseqüentemente de aflatoxina.

No estudo de DOYLE e MARTH (1978b) também foi verificado que linhagens crescidas sob condições similares, podem variar na sua habilidade de degradar aflatoxina e isso está diretamente relacionado com a quantidade de toxina produzida. De acordo com estes autores houve uma variabilidade biológica na produção, devido às pequenas diferenças nas condições ambientais.

BOLLER e SCHROEDER (1974) também confirmaram este fato, em seus estudos com conídios estocados, onde a

produção de aflatoxina B₁ não foi uniforme. Eles verificaram grande diferença na alta e baixa produção em cada isolado, nas diferentes épocas de seus experimentos. Segundo estes autores, as diferenças na quantidade de aflatoxina detectadas nesta cultura, refletiram provavelmente, as variáveis na preparação do experimento e tais variações poderiam ser causadas por um ou mais destes fatores: 1) a desuniformidade na composição do substrato, uma vez que neste experimento o substrato utilizado foi o arroz; 2) a variação na idade do inóculo; 3) a variação na taxa de crescimento, de um período para outro, devido a causas desconhecidas; 4) as diferenças nas transferências dos conídios, pela alça de platina, uma vez que não se pode saber exatamente qual o número de conídios introduzidos; 5) a seleção dos conídios nas várias áreas da colônia, levando a uma variação no número dos conídios viáveis transferidos para o outro frasco; e, 6) a quantificação de aflatoxina pelo método visual em cromatografia de camada delgada, que geralmente pode propiciar um erro de aproximadamente 20%, mesmo com analistas experientes.

A variação na produção de aflatoxinas encontrada no presente experimento, nos leva a crer que foi consequência de alguns dos fatores citados acima como, por exemplo, a variação na idade dos conídios inoculados, durante cada fase do experimento. Neste experimento procurou-se

sempre escolher área de crescimento da colônia. Contudo, é difícil ter o mesmo número de conídios viáveis em cada inóculo transferido. A técnica de quantificação pelo método visual, também pode ter contribuído com erros. Portanto, a variação na produção de aflatoxinas, por uma linhagem, parece ser um problema comum, entre os pesquisadores e, de fato, é muito difícil manter todas as condições rigidamente controladas.

5.2. Perda na Capacidade de Produzir Aflatoxinas

Durante este período de 280 dias, nenhuma linhagem perdeu sua capacidade de sintetizar aflatoxina, num meio de cultura sintético. BOLLER e SCHROEDER (1974) também verificaram que mesmo com a degeneração e morte dos conídios estocados durante 21 meses, a produção de aflatoxina nas linhagens estudadas não cessou, embora esta não permanesse constante.

Por outro lado, TORRES *et alii* (1980) citam vários autores que têm investigado a influência de fontes de carboidratos, nitrogênio orgânico e inorgânico, extrato de levedura, vitaminas e certos minerais na síntese de aflatoxinas, por espécies de *Aspergillus*. Segundo os autores citados, as linhagens aflatoxigênicas perdem esta característica após subculturas sucessivas em meios sintéticos.

Utilizando o trigo como substrato natural, estes autores, esperavam encontrar um aumento na síntese de aflatoxinas como já foi encontrado em alguns trabalhos. Todavia, ao invés disso, houve degeneração após transferências sucessivas, e alguns fungos toxigênicos perderam totalmente a capacidade de síntese de aflatoxinas.

FIGUEIREDO e PIMENTEL (1975) estudando os mêtodos de conservação de fungos, verificaram que os fungos, mantidos em coleções, alteraram-se profundamente com o tempo, deixando de apresentar alguns caracteres da cultura original, ou, o que é mais raro, adquirindo certos caracteres inexistentes naquela. A explicação para isto, segundo estes autores, seria a ocorrência de saltações, mutações e outras alterações nucleares que resultam em alterações morfológicas e fisiológicas como: modificação do aspecto ou cor da cultura, perda da capacidade de esporulação, redução ou perda de patogenicidade, perda da capacidade de sintetizar certas substâncias e outras modificações, em geral irreversíveis, comuns em fungos mantidos em vida saprofítica sobre meios nutrientes ricos. Esta colocação poderia explicar os casos ocorridos em que os fungos perderam a capacidade de sintetizar aflatoxinas. Contudo, ao se pensar em mutação, deve-se lembrar que a taxa de mutação é muito baixa e seria difícil ocorrer em todos os casos e portanto, provavelmente, outros mecanismos devem estar envolvidos.

5.3. Observação dos Caracteres Morfológicos

Ao relacionar alguns caracteres morfológicos dos fungos toxigênicos, com a produção de toxina, podemos verificar que muitos trabalhos anteriores já se preocuparam em distinguir isolados toxigênicos e não toxigênicos, com base nas características morfológicas. Jacquet e Boutibonnes, 1969 (citado por MOREAU, 1979) notaram uma hipertrofia em certas partes do micélio nas linhagens toxigênicas; os esferócitos e a aparência anômala foram considerados como características de clones de produção de aflatoxinas. Além destes autores, outros têm procurado relacionar a presença de esclerócios (MURAKAMI *et alii*, 1968; TORRES *et alii*, 1980; WICKLOW e SHOTWELL, 1982); de blastosporo (BHATNAGAR *et alii*, 1982); e clamidosporo (ABOU-GABAL e FAGERLAND, 1981), com a produção de aflatoxinas.

Por outro lado, MOREAU (1979) chama a atenção, ao associar certos caracteres morfológicos ou químicos entre as linhagens produtoras e não produtoras, ao fato de uma linhagem toxigênica vir a perder sua habilidade de produzir aflatoxina, após subculturas sucessivas em meios sintéticos, ou em alguns casos aumentar sua toxigenicidade por meio de subculturas sucessivas num substrato natural apropriado.

Até o momento, nenhuma linhagem toxigênica foi estudada, relacionando trocas morfológicas e fisiológicas, durante o tempo de estocagem, com a produção de aflatoxinas. No presente trabalho, as linhagens foram observadas microscopicamente, no início e no fim do experimento, não tendo havido um acompanhamento em cada etapa da extração de toxina. Foi detectada uma região de alargamento e espessamento de hifas, com algumas estruturas globosas que poderiam estar associadas aos locais de produção de aflatoxinas, citados pelos autores acima. Portanto, estes fatos sugerem que estudos posteriores, acompanhando a produção de aflatoxinas, juntamente com estudos morfológicos e citológicos em cada época de análise, num período mais longo de estocagem, devem ser realizados.

5.4. Produção de Aflatoxinas em Substratos Diferentes

Pelos estudos realizados até o presente, parece que ainda não há uniformidade de dados quanto à perda de produção de aflatoxinas, após subculturas sucessivas em meio sintético e em substrato natural. Se por um lado alguns autores verificaram aumento na toxigenicidade em fungos mantidos em substrato natural (WICKLOW *et alii*, 1981), outros, como TORRES *et alii* (1980), verificaram perda em algumas linhagens. Portanto, estes fatos novamente sugerem

que adicionais pesquisas, comparando o comportamento do fungo em substratos naturais e em meios sintéticos são necessários. Provavelmente esta perda, ou aumento de toxigenicidade, está relacionada com a resposta do fungo aos fatores ambientais.

De acordo com MOREAU (1979), o fungo *A. flavus* é um fungo encontrado no solo, geralmente na matéria orgânica e em sementes, especialmente as oleaginosas. Ele geralmente é acompanhado por numerosos outros fungos, e o seu crescimento pode, às vezes, ser inibido por fungos como *Aspergillus niger*, *Rhizoctonia solani* ou espécies de *Penicillium*, como também ele pode retardar o crescimento de espécies de *Sclerotium bataticola*. As propriedades toxigênicas de uma cultura podem ser mascaradas, se os metabólitos tóxicos são subsequentemente transformados em derivados não tóxicos por outros microrganismos.

Na natureza ocorre uma interação microbiológica, onde a produção de toxina dá uma certa vantagem seletiva ao organismo produtor. Enquanto quase todas as linhagens de *A. parasiticus* são toxigênicas, em *A. flavus* nem todas as linhagens produzem aflatoxinas. Em ambas as espécies a produção está relacionada com as condições ambientais e segundo Schroeder e Anshworth, 1966 (citado por MOREAU, 1979), a produção de aflatoxina é o resultado da

interação do genótipo de uma linhagem e o ambiente em que ela está crescendo.

Portanto, o que levaria uma linhagem toxigênica que está sendo cultivada em laboratório, sobre um meio sintético rico, perder sua toxigenicidade, talvez esteja relacionada ao fato de se adaptar às condições saprofíticas de laboratório e o mesmo poderia acontecer num substrato natural livre de outros microrganismos. O aumento na toxigenicidade no substrato natural, observado por alguns autores, provavelmente ocorre só no início.

O meio de Czapeck utilizado no presente experimento é pobre em nutrientes, isto é, o fungo necessita sintetizar substâncias mais complexas, a partir de fontes simples. Provavelmente, o fungo cultivado em meios sintéticos ricos, perde sua capacidade de produzir aflatoxinas com maior facilidade que o fungo cultivado em meios mais pobres, uma vez que naquele meio o fungo encontra a substância pronta sem precisar seguir algumas vias metabólicas para sua síntese. Desta forma um estudo comparando o comportamento do fungo toxigênico num meio sintético rico, com um meio sintético pobre, além de um substrato natural poderia esclarecer estas suposições.

5.5. Aflatoxinas e Micovírus

No presente trabalho procuramos considerar algumas das hipóteses que tem sido levantadas pelos pesquisadores, com relação ao mecanismo de produção de aflatoxinas. Uma destas hipóteses, que vem sendo estudadas, é a presença das VLP ("virus-like particles") com a produção de aflatoxinas.

Para se saber, seguramente, se as VLP estão ou não relacionadas com a produção de aflatoxinas, é preciso analisar um número significativo de linhagens produtoras e não produtoras, juntamente com a presença ou não de micovírus. Além disso, é preciso conhecer melhor o papel das VLP nos fungos; a maioria delas em condições normais, parecem ser latentes. Embora as VLP sejam transmitidas por esporos, faltam ainda estudos para verificar se são herdadas como um fator nuclear ou citoplasmático (WOOD *et alii*, 1974).

De acordo com HOLLINGS (1978) ainda não há um padrão geral uniforme, com relação à presença de infecção viral e micotoxinas, há somente alguns relatos comparando isolados infectados por vírus e livres de vírus, que podem bem diferir geneticamente em certos caracteres metabólicos.

5.6. Aflatoxinas: um Metabólito Secundário

A esta altura podemos relacionar as aflatoxinas como um metabólito secundário do fungo *A. flavus*. De acordo com WANG *et alii* (1979) e a maioria dos autores, metabólitos secundários são substâncias sintetizadas por certos microrganismos, geralmente no final do ciclo de crescimento, e embora não necessários ao seu crescimento, estes metabólitos podem ter valores de sobrevivência para o organismo produtor. No caso das aflatoxinas, elas podem ser detectadas 48 horas após a germinação do esporo, e o seu ciclo celular é de 24 horas.

Não conhecemos ainda o verdadeiro significado do metabolismo secundário nos organismos. Por que os microrganismos sintetizam os metabólitos secundários? É evidente que, a menos que o microrganismo possua a informação codificada no seu genoma, para a síntese de metabólitos secundários, ele é incapaz de sintetizá-los, e a expressão desta informação é regulada por uma variedade de fatores ambientais.

ROSE (1979) revisando vários autores sobre a razão da síntese de metabólitos secundários, tomou, como explicação mais coerente, o fato de que os organismos que entram na fase estacionária do crescimento e são incapazes de impedir a síntese de intermediários de baixo peso molecular,

podem desviar estes intermediários dentro da síntese de uma variedade de metabólitos secundários. Nos organismos que não sintetizam os metabólitos secundários, assume-se que estes possuem mecanismos que impedem a síntese de compostos de baixo peso molecular, que durante o crescimento são conduzidos à síntese de seus constituintes celulares.

Schroeder e Verrett, 1969 (citado por SCHMIDT *et alii*, 1977) sugeriram que linhagens produtoras de aflatoxinas acumulam toxinas como produtos finais, enquanto que as não produtoras podem metabolizar a toxina em proporções iguais à medida em que ela é sintetizada.

Neste trabalho procuramos contribuir para um melhor entendimento dos fatores envolvidos na produção de aflatoxinas, durante o período de estocagem, contudo não sabemos se as linhagens que conhecemos como não produtoras de aflatoxinas (dentro do grupo *A. flavus*) realmente não produzem porque não têm a informação genética em seu genoma, ou porque ela perdeu esta capacidade de produzir devido a algum efeito ambiental natural. Sabemos que as linhagens aflatoxigênicas, mantidas em laboratório, com o tempo podem perder esta característica, mas não sabemos se o que acontece num laboratório, pode acontecer num ambiente natural.

6. CONCLUSÕES

Do presente trabalho, as seguintes conclusões podem ser tiradas:

1) A produção de aflatoxinas, numa linhagem, pode variar e esta variação provavelmente está relacionada com as condições do experimento como: número de conídios viáveis, técnicas de transferência do inóculo, idade dos conídios, técnicas de quantificação de aflatoxinas e outros fatores que geralmente são difíceis de serem controlados.

2) A produção de aflatoxinas nestes fungos, não cessou durante o período de 280 dias, tanto nos que foram mantidos em óleo mineral, como nos repicados periodicamente.

3) Não houve diferença no comportamento de produção de aflatoxinas, no fungo mantido em óleo mineral, com o fungo repicado periodicamente, durante este período.

4) Caracteres morfológicos, observados microscopicamente, podem estar relacionados às áreas de adaptação de produção de aflatoxinas.

LITERATURA CITADA

- ABOU-GABAL, M. e J.FAGERLAND. 1981. Ultrastructure of the chlamydospore growth phase of *Aspergillus parasiticus* associated with higher production of aflatoxins. *Mykosen*, 24:307-311.
- BENNETT, J.W., C.H.VINNETT e W.R.GOYNES Jr. 1980. Aspects of parasexual analysis in *Aspergillus parasiticus*. *Canadian Journal Microbiology*, 26:706-713.
- BHATNAGAR, R.K., S.AHMAD, K.G.MUKERJI e T. A. VENKITASUBRAMANIAN. 1982. Role of blastospores in protecting *Aspergillus parasiticus* NRRL 3240 from high levels of aflatoxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 44:579-582.

- BOLLER, R.A. e H.W.SCHROEDER. 1974. Production of aflatoxin by cultures derived from conidia stored in the laboratory. *Mycologia*, 66:61-66.
- CHRISTENSEN, C.M. 1975. Some reflections on micotoxycosis (an introduction). *Int.J.Environ.Stud.*, 8:153-157.
- CODNER, R.C., K.SARGEANT e R.YEO. 1963. Production of aflatoxin by the culture of strains of *Aspergillus flavus-oryzae* on sterilized peanuts. *Biotechnology and Bioengineering* 5:185-192.
- COOMES, T.J. e A.J.FEUILL. 1965. Recommended procedures for the detection and estimation of aflatoxin B₁ in groundnuts and groundnut materials. *Tropical Products Institute, Report G 13*, Londres.
- DAVIS, N.D., U.L.DIENER e D.W.ELDRIDGE. 1966. Production of aflatoxins B₁ and G₁ by *Aspergillus flavus* in semisynthetic medium. *Applied Microbiology*, 14:378-380.
- DIENER, U.L. e N.D.DAVIS. 1969. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. In: L.A.GOLDBLATT, Aflatoxin Cap.II-Academic Press, New York, London, 472 p.

- DONKERSLOOT, J.A., R.I.MATELES e S.S.YANG. 1972. Isolation of averufin from a mutant of *Aspergillus parasiticus* impaired in aflatoxin biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 47:1051-1055.
- DOYLE, M.P. e E.H.MARTH. 1978a. Aflatoxin is degraded by micelia from toxigenic and nontoxigenic strains of *Aspergilli* grown on different substrates. *Mycopathologia*, 63:145-153.
- DOYLE, M.P. e E.H.MARTH. 1978b. Aflatoxin is degraded by fragmented and intact mycelia of *Aspergillus parasiticus* grown 5 to 18 days with and without agitation. *Journal of Food Protection*, 41: 549-555.
- DOYLE, M.P. e E.H.MARTH. 1978c. Aflatoxin is degraded by heated and unheated mycelia, filtrates of homogenized mycelia and filtrates of broth cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*, 64: 59-62.
- DOYLE, M.P. e E.H.MARTH. 1979. Peroxidase activity in mycelia of *Aspergillus parasiticus* that degrade aflatoxin. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 7:211-217.

- ELLIS, J.J. 1969. An orange-yellow mutant of *Aspergillus parasiticus* produces aflatoxin. *Mycologia*, 61:651-653.
- FENNELL, D.I. 1960. Conservation of fungous cultures. *Botanical Review*, 26:79-141.
- FIGUEIREDO, M.B. e C.P.V.PIMENTEL. 1975. Métodos utilizados para conservação de fungos na Micoteca da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico. *Summa Phytopathologica*, 1:299-302.
- FONSECA, H., A.MARTINELLI FILHO, H.DEL NERY e E.RONCATTO. 1974. Espécies de *Aspergillus* produtoras de aflatoxina, na Região Araraquarense, SP. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, 31:519-536.
- GUSSACK, G., J.W.BENNETT, S.CAVALIER e L.YATSU. 1977. Evidence for the parasexual cycle in a strain of *Aspergillus flavus* containing virus-like particles. *Mycopathologia*, 61:159-165.
- HESELTIME, C.W., O.L. SHOTWELL, J.J.ELLIS e R.D. STUBBLEFIELD. 1966. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Bacteriological Reviews*, 30:795-805.

- HOLLINGS, M. 1978. Mycoviruses: viruses that infect fungi. *Advances Virus Research*, 22:1-53.
- LEAICH, L.L. e K.E.PAPA. 1974. Aflatoxins in mutants of *Aspergillus flavus*. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 52:223-229.
- LEAICH, L.L. e K.E.PAPA. 1975. Identification of diploids of *Aspergillus flavus* by nuclear condition of conidia. *Mycologia*, 67:674-678.
- LEE, L.S., J.W.BENNETT, L.A.GOLDBLATT e R.E.LUNDIN. 1971. Norsolorinic acid from a mutant strain of *Aspergillus parasiticus*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48:93-94.
- LIN, M.T. 1980. Biologia dos fungos toxigênicos. *Anais do Encontro Nacional de Micotoxinas: problemas e soluções*. p.11-22.
- LIN, Y.C., J.C.AYRES e P.E.KOEHLER. 1980. Influence of temperature cycling on the production of aflatoxins B₁ and G₁ by *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 40: 333-336.

- MESSIAS, C.L., A.MARTINELLI FILHO, H.FONSECA e J.L.AZEVEDO. 1976. Mutantes em linhagens de *Aspergillus flavus*, Link produtoras de aflatoxina. *Ciência e Cultura*, 28 (Suplemento) 23-4.1.1. p.253.
- MESSIAS, C.L. 1977. Parassexualidade e produção de aflatoxina em *Aspergillus flavus*, Link. Piracicaba, ESALQ/USP, 75 p. (Dissertação de Mestrado).
- MIROCHA, C.J., S.V.PATHRE e C.M.CHRISTENSEN. 1979. Micotoxins. In: A.H.ROSE, Economic microbiology, vol. III. Secondary products of metabolism. Academic Press, London, New York, San Francisco. 595 p.
- MOREAU, C. 1979. Moulds, Toxins & Food. John Wiley & Sons Ltd. 477 p.
- MURAKAMI, H., H.SAGAWA e S.TAKASE. 1968. Non-productivity of aflatoxin by japanese industrial strain of the *Aspergillus*. III Common characteristics of the aflatoxin-producing strains. *The Journal General Applied Microbiology*, 14:251-262.
- NORTHOLT, M.D., H.P. van EGMOND e W.E. PAULSCH. 1977. Differences between *Aspergillus flavus* strains in growth and aflatoxin B₁ production in relation to water activity and temperature. *Journal of Food Protection*, 40: 778-781.

- PAPA, K.E. 1973. The parasexual cycle in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 65:1201-1205.
- PAPA, K.E. 1976. Linkage groups in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 68:159-165.
- PAPA, K.E. 1977. Genetics of aflatoxin production in *Aspergillus flavus*: linkage between a gene for a high B₂:B₁ ratio and the histidine locus on linkage group VIII. *Mycologia*, 69:1185-1190.
- PAPA, K.E. 1978. The parasexual cycle in *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia*, 70:766-773.
- PAPA, K.E. 1979. Genetics of *Aspergillus flavus*: complementation and mapping of aflatoxin mutants. *Genetic Research*, 34:1-9.
- PAPA, K.E. 1982. Norsolorinic acid mutant of *Aspergillus flavus*. *Journal of General Microbiology*, 128:1345-1348.
- PONTECORVO, G. e J.A.ROPER. 1952. Genetics analysis without sexual reproduction by means of polyploidy in *Aspergillus nidulans*. *Proceeding Journal Genetics Microbiology*, 6: Abstract.

- PONTECORVO, G., J.A.ROPER, L.M.HEMMONS, K.D.MACDONALD e A. W.BUFTON. 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5:141-238.
- RAO, V.M., K.K.MAGGON e T.A.VENKITASUBRAMANIAN. 1980. Oxidases in *Aspergillus parasiticus* in relation to aflatoxin biosynthesis. *Toxicon*, 18:279-283.
- RAPER, K.B. e D.I.FENNELL. 1965. The genus *Aspergillus*. The Williams & Wilkins Company Baltimore.
- REDDY, T.V., L.VISWANATHAN e T.A.VENKITASUBRAMANIAN. 1979. Factors affecting aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a chemically defined medium. *Journal of General Microbiology*, 144: 409-413.
- REIB, J. 1982. Development of *Aspergillus parasiticus* and formation of aflatoxin B₁ under the influence of conidiogenesis affecting compounds. *Archives of Microbiology*, 133:236-238.
- ROSE, A.H. 1979. Economic microbiology, vol.III. Secondary products of metabolism. Academic Press, London, New York, San Francisco. 595 p.

- SCHMIDT, A.L., C.R.CURTIS e G.A.BEAN. 1977. Eletrophoretic comparisons of mycelial enzymes from aflatoxin-producing and non-producing strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Canadian Journal Microbiology*, 23:60-67.
- SCHROEDER, H.W. e W.W.CARLTON. 1973. Accumulation of only aflatoxin B₂ by a strain of *Aspergillus flavus*. *Applied Microbiology*, 25:146-148.
- SCOTT, P.M., J.W.LAWRENCE e W.van WALBEEK. 1970. Detection of mycotoxins by thin-layer chromatography: application to screening of fungal extracts. *Applied Microbiology*, 20: 839-842.
- SINGH, R. e D.P.H.HSIEH. 1977. Aflatoxin biosynthetic pathway: elucidation by using blocked mutants of *Aspergillus parasiticus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 178:285-292.
- TORRES, J., J.GUARRO, G.SUAREZ, N.SUÑE, M.A.CALVO e C. RAMIREZ. 1980. Morphological changes in strains of *Aspergillus flavus* Link ex Fries and *Aspergillus parasiticus* Speare related with aflatoxin production. *Mycopathologia*, 72:171-174.

- WANG, D.I.C., C.L.COONEY, A.L.DEMAIN, P.DUNNILL, A.E. HUMPHREY e M.D.LILLY. 1979. Fermentation and enzyme technology. John Wiley & Sons, Inc. 374 p.
- WICKLOW, D.T., O.L.SHOTWELL, G.L.ADAMS. 1981. Use of aflatoxin-producing ability medium to distinguish aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 41:697-699.
- WICKLOW, D.T. e O.L.SHOTWELL. 1982. Intrafungal distribution of aflatoxin among conidia and sclerotia of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Canadian Journal Microbiology*, 29:1-5.
- WOOD, H.A., R.F.BOZARTH, J.ADLER e D.W.MACKENZIE. 1974. Proteinaceous virus-like particles from an isolate of *Aspergillus flavus*. *Journal of Virology*, 13: 532-534.