

Influência de *Saccharomyopsis schoenii* e *Saccharomyopsis crataegensis* na produção de aflatoxinas B₁ e G₁ por *Aspergillus parasiticus* em amendoim (*Arachis hypogaea* L.)

Saccharomyopsis schoenii and *Saccharomyopsis crataegensis* effect on B₁ and G₁ aflatoxins production by *Aspergillus parasiticus* in peanut (*Arachis hypogaea* L.)

RIALA6/1172

Guilherme PRADO^{1*}, Robson de Assis SOUZA¹, Vanessa Andrea Drummond MORAIS¹, Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz MADEIRA¹, Marize Silva de OLIVEIRA¹, Mabel Caldeira de ANDRADE¹, Ignácio José de GODOY², Carlos Augusto ROSA³, Ary CORRÊA Jr³, Joenes Mucci PELUZIO⁴, Raphael Sanzio PIMENTA⁴

* Endereço para correspondência: Fundação Ezequiel Dias, Rua Conde Pereira Carneiro, 80 Gameleira. CEP30510010, Belo Horizonte, MG/Brasil. Tel: +55 31 33719462; Fax: +55 31 33719553 e-mail: gui@funed.mg.gov.br.

¹Laboratório de Micologia e Micotoxinas, Serviço de Ciências Bioquímicas, Fundação Ezequiel Dias. Belo Horizonte, MG/ Brasil.

²Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, SP/ Brasil.

³Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG/ Brasil.

⁴Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, TO/ Brasil.

Recebido:30/04/2008 – Aceito para publicação: 16/10/2008.

RESUMO

As aflatoxinas constituem o grupo de metabólitos secundários produzidos principalmente pelos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Foi investigado o efeito isolado das leveduras *Saccharomyopsis schoenii* e *S. crataegensis* na produção de aflatoxinas B₁ e G₁ em amendoim, cultivar IAC Caiapó. As amostras de amendoim *in natura* e previamente autoclavadas foram inoculadas com *A. parasiticus* (1,6 x 10⁶ esporos.mL⁻¹) e cultura das leveduras (1,6 x 10⁸ células.mL⁻¹), seguido de incubação a 25°C durante sete dias. Foram realizados dois experimentos: no primeiro o fungo filamentososo e as leveduras foram inoculados simultaneamente. No segundo, a levedura foi inoculada 3 h antes da adição de fungo filamentososo. A quantificação das aflatoxinas foi executada por cromatografia em camada delgada. A produção das aflatoxinas B₁ e G₁ foi reduzida na presença das leveduras. A porcentagem de redução da concentração das aflatoxinas foi maior quando a suspensão do fungo foi adicionada 3 h após a inoculação da suspensão de leveduras. O decréscimo da concentração de aflatoxina B₁ atingiu 89,3% e 82,6%, respectivamente na presença de *S.schoenii* e de *S.crataegensis*. Os níveis de aflatoxina G₁ foram reduzidos em 91,2% na presença de *S.schoenii* e em 93,2% quando *S.crataegensis* foi inoculada.

Palavras-chave. controle biológico, fungos, aflatoxinas.

ABSTRACT

Aflatoxins are a group of secondary metabolites produced mainly by *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius*. The effect of *S. schoenii* and *S. crataegensis* in the production of aflatoxin B₁ and G₁ in peanuts, cultivar IAC Caiapó was investigated. Previously autoclaved and *in natura* peanuts samples were inoculated with *A. parasiticus* (1.6 x 10⁶ spores.mL⁻¹) and yeast cultures (1.6 x 10⁸ cells.mL⁻¹), followed by incubation at 25°C for seven days. Two experiments were carried out: for the first one, the filamentous fungi and the yeast suspensions were inoculated simultaneously. In the second experiment, the filamentous fungi were inoculated 3 h after yeasts inoculation. Aflatoxin quantification was performed by thin layer

chromatography. The production of B₁ and G₁ aflatoxin was reduced in the presence of the yeasts. The percentage of reduction in aflatoxin concentration was higher when the filamentous fungus was inoculated 3 h after adding yeast suspension. The reduction of B₁ aflatoxin concentration came to 89.3% and 82.6%, in the presence of *S. schoenii* and *S. crataegensis*, respectively. The G₁ aflatoxin levels were reduced in 91.2% in the presence of *S. schoenii* and 93.2% in the presence of *S. crataegensis*.

Key words. biological control, fungi, aflatoxins.

INTRODUÇÃO

Aflatoxinas são produtos do metabolismo secundário de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, ocorrendo, na grande maioria dos casos, após a fase de crescimento exponencial dos fungos, sendo descritas como tendo atividade imunossupressora, teratogênica e hepatocarcinogênica^{1,2}.

A contaminação de alimentos com aflatoxinas é mais freqüente em regiões tropicais e semitropicais, como o Brasil, sendo as aflatoxinas B₁ e G₁ as de maior ocorrência. A literatura publicada está repleta de informações sobre a incidência de aflatoxinas em alimentos naturais e processados, principalmente em grãos, como o amendoim, em níveis que variam de 1 a 100 ng.g⁻¹ ou superiores³.

O controle das micotoxinas, e em especial das aflatoxinas, após mais de 40 anos de sua descoberta, ainda não apresentou um modelo seguro, eficaz e de solução definitiva. Numerosas estratégias para a prevenção, detoxificação ou inativação das aflatoxinas têm sido utilizadas, como separação mecânica de grãos, calor, utilização de adsorventes, microondas e irradiação gama⁴⁻⁹.

Com o crescente aumento no consumo de alimentos isentos de agrotóxicos, devido a uma maior preocupação do consumidor com a qualidade de vida e saúde, produtores têm buscado alternativas de controle de doenças que não depreciem o valor final do produto e que atendam as necessidades do mercado. Neste contexto, o controle biológico de patógenos se apresenta como uma alternativa¹⁰.

Alguns microrganismos são capazes de diminuir ou inibir a produção de aflatoxinas por espécies toxigênicas de *A. flavus* e *A. parasiticus*. As bactérias *Lactobacillus casei* e *L. rhamnosus*, as leveduras *Pichia guilliermondii*, *Kluyveromyces* sp, *Saccharomyces cerevisiae* e os fungos, tais como, *A. oryzae*, *A. niger* e *Rhizopus oryzae*, têm sido descritos como capazes de inibir o crescimento de cepas toxigênicas de *Aspergillus*, bem como a produção de aflatoxinas¹¹⁻¹⁵.

Normalmente o controle biológico utiliza fungos, bactérias, vírus e insetos. Nos últimos anos, as leveduras têm despertado o interesse de estudiosos, pois apresentam diversas características que podem ser exploradas no desenvolvimento de estratégias de controle¹⁶. Leveduras em geral são de fácil cultivo, com grande habilidade de colonização de substratos vegetais, permanecendo viáveis nestes substratos por grandes períodos de tempo em diferentes condições ambientais, não formam esporos alergênicos e normalmente não produzem substâncias tóxicas¹⁷⁻¹⁹.

Diversas espécies de leveduras vêm sendo utilizadas com sucesso como agentes de controle biológico. *Candida oleophila* e *Pichia membranifaciens* contra *Botrytis cinerea* causador do bolor cinzento em uvas; *Debaryomyces hansenii* contra *Penicillium digitatum* também em uvas; *Pichia guilliermondii* contra *Botrytis*, *Rhizopus*, *Penicillium* e *Alternaria* que degradam o tomate; *Cryptococcus laurentii*, *Cr. flavus* e *Cr. albidus* que controlam as populações de *Mucor* em pêras; *Candida sake* contra *B. cinerea* e *Rhizopus nigrans*, que são os principais causadores de doenças pós-colheita em maçãs²⁰⁻²².

O parasitismo e a degradação das hifas do fungo patogênico pelos antagonistas têm sido vinculados à aderência das células da levedura às hifas dos fungos e à elevada produção de glucanase a partir de diferentes fontes de carbono. A presença natural de várias espécies de leveduras, bem como a utilização de alimentos preparados com esses organismos pela população, são fatores que contribuem para a aceitação de vegetais tratados com estes microrganismos nos diversos mercados do mundo²³.

O primeiro relato descrevendo a penetração de um fungo filamentosos por uma levedura foi realizado por Kreger-van Rij e Veenhuis²⁴, mas foi o trabalho de Lachance e Pang²⁵, o primeiro a descrever a penetração e identificar esse fenômeno como predação. A capacidade de predação foi observada em espécies do gênero *Saccharomycopsis* incluindo *Candida amapae*, uma levedura anamórfica (sem fase sexual conhecida), também pertencente a este gênero, como determinado por seqüenciamento das regiões D1 e D2 da substância maior do DNA ribossomal²⁶.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das leveduras *Saccharomycopsis schoenii* e *S. crataegensis* na produção de aflatoxinas B₁ e G₁ por uma cepa toxigênica de *Aspergillus parasiticus*, em amendoim *in natura* e previamente autoclavado.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécies de leveduras

As leveduras estudadas neste trabalho foram a *Saccharomycopsis schoenii* UWO (PS) 80-91 isolada de seiva de avelã (*Quercus* sp) e a *S. crataegensis* UFMG-DC 19-2 isolada de fruto de palmeira na Estação Ecológica da Universidade Federal de Minas Gerais. Encontram-se depositadas na coleção de cultura de leveduras tropicais do Laboratório de Ecologia e

Biotecnologia de Leveduras (Instituto de Ciências Biológicas - UFMG).

Isolado fúngico

O fungo a ser controlado foi a cepa de *A. parasiticus* IMI 242695 (International Mycological Institute, Inglaterra) isolado de produtos alimentícios e produtor de aflatoxinas. Está depositado na coleção de cultura de fungos do Laboratório de Micologia da Fundação Ezequiel Dias.

Amendoim

Utilizaram-se neste trabalho aproximadamente 6 kg de grãos de amendoim, cultivar IAC Caiapó, cultivado no Instituto Agrônomo de Campinas (SP), safra 2005/2006.

Preparação dos inóculos

As leveduras preservadas em meio GYMP (glicose 1%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 0,3% e fosfato monobásico de potássio 0,2%) foram repicadas para ágar Sabouraud (glicose 2%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5% agar 1,5%) suplementado com cloranfenicol (100 mg.L⁻¹) e mantidas a 25°C por 4 dias. Em seguida foram novamente repicadas no mesmo meio para obtenção de biomassa e incubadas por 48 h a 25°C. Após este procedimento as células foram retiradas com o auxílio de uma alça bacteriológica e transferidas para tubos de ensaio contendo caldo GY (extrato de levedura 0,01%, glicose 1%)²⁷. A concentração celular foi estimada com uma Câmara de Neubauer e ajustada para 1,6 x 10⁸ células.mL⁻¹.

A. parasiticus foi crescido em placa com meio Czapek (nitrato de sódio 4%, cloreto de potássio 1%, sulfato de magnésio 1%, sulfato ferroso 0,02%, fosfato de potássio dibásico 2%, sacarose 3%, sulfato de zinco 1%, sulfato de cobre 0,5%, agar 2%) a 25°C por 7 dias. Seguiu-se inoculação para o meio GYEP (glicose 2%, extrato de levedura 0,3% e peptona 1%) e incubação a 25°C por 7 dias⁹. A suspensão de esporos foi preparada adicionando-se Tween 80 0,1% e a concentração foi determinada em Câmara de Neubauer e ajustada para 1,6 x 10⁶ esporos.mL⁻¹.

Inoculação

Grãos de amendoim (15g) *in natura* ou autoclavados a 120°C por 15 min foram inoculados com 2,5 mL da suspensão de *S. schoenii* e 2,5 mL da suspensão de esporos de *A. parasiticus*. A adição da suspensão de *A. parasiticus* foi realizada imediatamente após a inoculação da cultura de levedura (experimento 1) e após 3h da inoculação da mesma (experimento 2). Estas etapas foram realizadas com 5 repetições cada. O mesmo procedimento foi adotado com a linhagem de *S. crataegensis*.

Também foi incluído nas avaliações um grupo controle constituído somente da inoculação de suspensão de esporos de *A. parasiticus*, em grãos de amendoim *in natura* e autoclavados.

Extração e quantificação das aflatoxinas

A extração das aflatoxinas B₁ e G₁ e a purificação dos extratos foram feitas segundo o método descrito por Valente Soares e Rodriguez-Amaya²⁸. Posteriormente, as aflatoxinas foram separadas, identificadas e quantificadas por cromatografia em camada delgada (CCD), em placas de sílica gel 60G, 20 x 20 cm (Merck), sem indicador fluorescente, espessura de 0,25 mm, utilizando-se como fase móvel tolueno:acetato de etila:clorofórmio:ácido fórmico (70:50:50:20, v/v/v/v), recomendado por Gimeno²⁹. Os extratos das amostras foram ressuspensos em benzeno:acetoneitrila (98:2), em volumes que variavam de 100 a 1000µL. Para aplicação na placa de CCD foram utilizados volumes que variaram de 2 a 10µL. Para elaboração da curva de calibração das aflatoxinas foram utilizados volumes das soluções padrão de concentração conhecida (Sigma Chemicals Co, St. Louis, MO), sempre com um mínimo de 4 pontos. A quantificação das aflatoxinas foi feita por medidas das intensidades das fluorescências dos spots das amostras e de padrões, em Densitômetro Shimadzu, modelo CS9301PC, Japão, com lâmpada de xenônio, em leitura linear, com feixe 0,4 x 5,0 mm e alta sensibilidade de fluorescência. Os níveis de aflatoxinas nas amostras foram calculados a partir do cálculo das áreas dos picos das aflatoxinas referentes aos extratos das amostras e das soluções padrão de aflatoxinas.

Nestas condições de análise, Prado³⁰ verificou que os limites de detecção e quantificação para a aflatoxina B₁ foram 0,90µg.kg⁻¹ e 1,1µg.kg⁻¹ e para aflatoxina G₁ 1,0µg.kg⁻¹ e 1,2µg.kg⁻¹, respectivamente. Valores médios de recuperação e coeficientes de variação para aflatoxina B₁ foram 97,2% e 11,7% e para aflatoxina G₁ 99,8% e 15,0%, respectivamente.

Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e 10 tratamentos. Os tratamentos foram instalados em um esquema fatorial constituído por cinco formas de inoculação (1) Controle: somente o fungo; (2) Fungo + *S. schoenii* tempo 0; (3) Fungo + *S. schoenii* tempo T; (4) Fungo + *S. crataegensis* tempo 0; (5) *S. crataegensis* tempo T e em dois tipos de amostra: *in natura* e autoclavada. Os resultados obtidos de aflatoxina B₁ e G₁ sofreram transformações logarítmicas, uma vez que foi observada instabilidade da resposta, isto é, aumento da proporcionalidade entre as médias dos grupos experimentais e seus respectivos desvios padrões, configurando a não conformidade com os pré-requisitos exigidos para a análise de variância. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparação das médias pelo teste de Tuckey (p<0,05)³¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se que a produção das aflatoxinas B₁ e G₁ foi reduzida na presença das leveduras (Tabela 1).

Tabela 1. Médias de aflatoxinas B₁ e G₁ (µg.kg⁻¹) produzidas por *Aspergillus parasiticus* (Ap) IMI 242695 após inoculação de *Saccharomycopsis schoenii* (Sc) e *S. crataegensis* (Cr), em amendoim IAC Caiapó, *in natura* e autoclavado, em diferentes formas de inoculação.

| Formas de inoculação | Aflatoxina B ₁ (µg.kg ⁻¹)* | | Aflatoxina G ₁ (µg.kg ⁻¹)* | |
|----------------------|---|--------------------|---|----------------------|
| | <i>In natura</i> | Autoclavado | <i>In natura</i> | Autoclavado |
| Controle (Ap) | 1374 Cb | 8483 Aa | 2914 Cb | 19861 Aa |
| Ap + Sc tempo 0 | 769 Bb (44%) | 6469 Aa (23,9%) | 1861 Cb (36,1%) | 18387 ABa (7,4%) |
| Ap + Sc tempo T | 205 Ab (89,3%) | 5863 Aa (30,9%) | 256 Ab (91,2%) | 17442 ABa (12,2%) |
| Ap + Cr tempo 0 | 444 Bb (67,7%) | 6238 Aa (26,5%) | 697 Bb (76%) | 10617 Aa (46,5%) |
| Ap + Cr tempo T | 238 Ab (82,6%) | 4566 Aa (46,2%) | 199 Ab (93,2%) | 8358 Ba (57,9%) |

Tempo 0: Inoculação simultânea das suspensões do fungo filamentoso e levedura;

Tempo T: Inoculação da suspensão da levedura 3 h antes da suspensão do fungo filamentoso;

Na linha as médias seguidas pela mesma letra minúscula, e na coluna, pela mesma letra maiúscula, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

* Média de 5 repetições

(%): Porcentagem de redução de aflatoxina

No tratamento que envolveu grãos de amendoim *in natura* a produção de aflatoxina B₁ e G₁ foi reduzida na presença de leveduras, independente do tempo de adição das suspensões do fungo filamentoso e das leveduras predadoras. Entretanto, a porcentagem de redução da concentração das aflatoxinas foi maior quando se adicionou a suspensão do fungo após 3h da suspensão das leveduras. A redução da concentração da aflatoxina B₁ atingiu 89,3% e 82,6%, na presença da *S. schoenii* e *S. crataegensis*, respectivamente. Os níveis da aflatoxina G₁ foram reduzidos em 91,2% na presença da *S. schoenii* e 93,2% quando da inoculação da *S. crataegensis*. No tratamento em que houve a autoclavação dos grãos de amendoim, antes do processo de inoculação das cepas dos fungos, observou-se também uma redução dos níveis de aflatoxinas. A maior redução ocorreu quando as suspensões das leveduras foram adicionadas após 3h antes da adição do fungo filamentoso. A redução da concentração da aflatoxina B₁ atingiu 30,9% e 46,2%, na presença de *S. schoenii* e *S. crataegensis*, respectivamente. Os níveis da aflatoxina G₁ foram reduzidos em 12,2% na presença de *S. schoenii* e 57,9% quando da inoculação da *S. crataegensis*. De uma forma geral, a *S. crataegensis* apresentou uma maior eficiência na redução dos níveis de aflatoxinas quando comparada à *S. schoenii*. Este fato pode ser interpretado como resultado de uma maior capacidade de permanência da *S. crataegensis* nos grãos de amendoim, em relação à *S. schoenii*.

A eficiência das leveduras predadoras foi maior nas amostras *in natura* quanto comparada com amostras autoclavadas. Estes resultados sugerem que a microbiota natural e/ou algum componente químico, destruídos ou modificados no processo de autoclavação dos grãos, podem influenciar o processo de competição entre o *A. parasiticus* e as leveduras

predadoras. Resultados semelhantes foram observados por Pimenta³² quando foi inoculado em amendoim, cultivar Tatu Vermelho, a *S. javanensis* e o *A. flavus* IMI 190443 produtor de aflatoxina B₁. O autor observou redução dos níveis de toxina na faixa de 56,7% a 73,5% e não foi detectada nenhuma alteração visível nos grãos de amendoim. Recentemente, Pimenta et al³³ avaliaram a capacidade da levedura *S. schoenii* UWO-PS 80-91, levedura utilizada neste trabalho, em controlar o crescimento dos fungos patogênicos *Penicillium expansum*, *P. italicum* e *P. digitatum* em laranjas. Os autores observaram que a *S. schoenii* reduziu a severidade da doença em laranjas inoculadas com todos os fitopatógenos testados.

O mecanismo de ação da levedura não foi esclarecido neste trabalho. Entretanto, sugere-se que a redução dos níveis de aflatoxinas pode ser devida a um desses mecanismos: (1) a levedura inibe a produção de aflatoxina por *A. parasiticus*; (2) a levedura degrada a toxina; (3) a levedura compete com o fungo filamentoso por espaço e nutrientes; (4) ocorre a penetração da levedura predadora no hospedeiro, através de estruturas denominadas “peg” de infecção e conseqüente diminuição da viabilidade do fungo filamentoso; (5) ocorre a adsorção da toxina pela parede celular da levedura.

Estudos prévios têm revelado a eficiência de alguns microrganismos em agirem como agentes de controle do crescimento e produção de aflatoxina por cepas toxigênicas.

Kusumaningtyas et al³⁴ observaram que *S. cerevisiae* inoculada em ração para frango e em presença de uma cepa toxigênica de *Aspergillus flavus*, foi capaz de reduzir a produção de aflatoxina B₁ (60,7%).

Diferentes isolados de leveduras do gênero *Kluyveromyces* revelaram atividade antagonista contra *A. flavus*

e *A. parasiticus* em meios de cultura, em diferentes atividades de água, após incubação durante sete dias a 25°C. As porcentagens de inibição do crescimento fúngico e produção de aflatoxina B₁ variaram de 75 a 100%¹⁴.

Três linhagens de *S. cerevisiae* foram capazes de degradar parcialmente, durante processo de fermentação alcoólica de mosto, ocratoxina A, toxina do *Aspergillus alutaceus* e *Penicillium expansum* e fumonisina B₁ e B₂, toxinas do *Fusarium verticillioides*, resultando em cerveja com menores níveis destas toxinas³⁵. Bejaouli et al.³⁶ observaram redução (45%) dos níveis de ocratoxina A em meios sintéticos e suco de uva na presença de diferentes linhagens de *S. cerevisiae*. A ausência de produtos de degradação sugere que adsorção e não um processo de metabolismo possa estar envolvido neste processo. A levedura *Pichia anomala* foi capaz de reduzir a deterioração por *Penicillium roquerfortii* (fungo filamentosso produtor de diferentes toxinas) em cereais úmidos contidos em sistema de armazenamento hermeticamente fechado. A linhagem de *P. anomala* JI 121 não cresce acima de 37°C e foi capaz de impedir o crescimento de fungos durante 14 meses de armazenamento de trigo, por meio de sua habilidade de consumir rapidamente o oxigênio e de sintetizar o acetato de etila, agente antifúngico³⁷⁻³⁸. A utilização de *Pichia ohmeri* e *S. cerevisiae* como possíveis agentes de controle biológico foi observado por Coelho et al.³⁹ em meio de cultura e suco de maçã. Os autores detectaram uma eliminação de 90% na concentração de patulina, toxina normalmente encontrada em maçã e produzida por *P. expansum*.

Apesar de se mostrar promissor, o controle biológico do acúmulo de aflatoxinas e outras toxinas em alimentos necessita de trabalhos suplementares para sua implantação. Além do efeito inibitório, alguns aspectos devem ser avaliados, como: (1) habilidade do organismo ser adequadamente formulado, ou seja, se o microrganismo permanece viável após formulação; (2) realização de testes de toxicidade; (3) identificação dos mecanismos de ação; (4) impacto ao meio ambiente. O fato de as leveduras predadoras serem encontradas em ambientes naturais aonde se deseja realizar o controle biológico fazem destes microrganismos um agente em potencial.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos revelaram que as duas espécies de leveduras estudadas, a *Saccharomyces schoenii* e a *S. crataegensis* foram capazes de controlar a produção de aflatoxinas pelo *Aspergillus parasiticus*. A redução da formação de aflatoxinas foi mais significativa quando as leveduras foram inoculadas nos grãos de amendoim antes do fungo filamentosso.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) o apoio financeiro para

o desenvolvimento da pesquisa – CBB 1375/05 e a bolsa de Iniciação Científica Institucional para Robson de Assis Souza. Os autores também agradecem o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

1. Atroshi F, Rizzo A, Westermarck T, Ali-vehmas T. Antioxidant nutrients and mycotoxins. *Toxicol.*2002; 180 (2): 151-67.
2. Yu J, Bhatnagar D, Ehrlich KC. Aflatoxin biosynthesis. *Rev Iberoamer Micol.*2002; 19: 191-200.
3. Council for Agricultural Science and Technology - CAST. Mycotoxins: economics and health risks. Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Technology, 2003; Task Force Report 139.
4. Sylos CM, Amaya-Farfan J. Aflatoxin destruction during heat processing of contaminated peanuts. A reevaluation. *Boletim Soc Bras Ciênc Tecnol Aliment.*1992; 26(2): 89-96.
5. Prado G, Oliveira MS. Efeito do forno de microondas na destruição de aflatoxinas em amendoim. *Rev Inst Adolfo Lutz.*1996;56(2):21-4.
6. Rustom IYS. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Control.*1997;59(1):57-67.
7. Santurio JM. Experiência brasileira no uso de adsorventes para aflatoxinas. In: Scussel VM. Editor. Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos. Florianópolis, 2000.
8. Galvez FCF, Francisco MLDL, Villarino BJ, Lustre AO, Resurreccion AVA. Manual sorting to eliminate aflatoxin from peanuts. *J Food Prot.* 2003;66(10):1879-84.
9. Prado G, Carvalho EP, Oliveira MS, Gazzinelli JECM, Moraes VAD, Corrêa RF, Cardoso VN, Soares TV. Influência da irradiação gama na produção de aflatoxina B₁ e no crescimento de cepa toxigênica de *Aspergillus flavus* em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). *Rev Inst Adolfo Lutz.*2005;64(1):85-90.
10. Spadaro D, Gullino ML. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *Int J Food Microbiol.*2004;91:185-94.
11. Faraj MK, Smith JE, Harran G. Aflatoxin biodegradation: effects of temperature and microbes. *Mycol Res.*1993; 97(11):1388-92.
12. Paster N, Droby S, Chalutz E, Menasherov M, Nitzan R, Wilson CL. Evaluation of the potential of the yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent against *Aspergillus flavus* and fungi of stored soya beans. *Mycol Res.*1993; 97(10):1201-6.
13. Shantha T. Fungal degradation of aflatoxin B₁. *Natural Tox.*1999;7:175-8.
14. Penna M, Nesci A, Etcheverry M. *In vitro* studies on the potential for biological control on *Aspergillus* section Flavi by *Kluyveromyces* spp. *Lett Appl Microbiol.*2004;38:257-64.
15. Bueno DJ, Silva JO, Oliver G, Gonzalez SN. *Lactobacillus casei* CRL 431 and *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1224 as biological controls for *Aspergillus flavus* strains. *J Food Prot.*2006; 69(10):2544-8.
16. Janisiewicz WJ, Korsten L. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu Rev Phytopathol.*2002;40:411-41.
17. Cartwright DK, Spurr Jr HW. Biological control of *Phytophthora parasitica* var. *nicotiane* on tobacco seedlings with non pathogenic binucleate *Rhizoctonia* fungi. *Soil Biol Biochem.*1998;30:1879-84.
18. Droby S, Lischinski S, Cohen L, Weiss V, Daus A, Chandgoyal T, Eckert JW, Manulis S. Characterization of an epiphytic yeast population of grapefruit capable of suppression of green mold decay caused by *Penicillium digitatum*. *Biol Control.*1999;16:27-34.
19. Janisiewicz WJ, Tworowski TJ, Kurtzman CP. Biocontrol potential of *Metchnikowia pulcherrima* strains against blue mold of apple. *Biol Control.*2001;91:1098-108.
20. Jijakli MH, Lepoivre P. Characterization of an exo-2,1,3 glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathology.*1998;88:335-43.

21. Masih EI, Alie I, Paul B. Can the grey mould disease of the grape vine be controlled by yeasts? *FEMS Microbiol Lett.*2000;189:233-7.
22. Masih EI, Slezack-Deschaumes S, Marmaras I, Ait-Barka E, Vernet G, Charpentier C, Adholeya A, Paul B. Characterization of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevine. *FEMS Microbiol Lett.*2001;202:227-32.
23. Wilson CL, Wisniewski ME, Biles CL, McLaughlin R, Chalutz E, Drobny S. Biological control of postharvest diseases of fruits: alternatives to synthetic fungicides. *Crop Prot.*1991; 10: 172-7.
24. Kreger-van Rij NJW, Veenhuis M. Electron microscopy of some special cell contacts in yeasts. *J Bacteriol.*1973;113:350-6.
25. Lachance MA, Pang WM. Predacious yeasts. *Yeast.*1997;13: 225-32.
26. Lachance MA, Pupovac-Velikonja A, Natarajan S, Schlag-Edler B. Nutrition and phylogeny of predacious yeasts. *Can J Microbiol.*2000;46:495-505.
27. Pimenta RS. Utilização de leveduras predadoras como agentes de controle biológico de doenças pós-colheita [Tese de doutorado]. Belo Horizonte, Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais, 2004. 130p.
28. Valente Soares LM, Rodriguez-Amaya DB. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. *J Assoc Off Anal Chem.*1989;72(1): 22-5.
29. Gimeno A. Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin and penitrem A. *J Assoc Off Anal Chem.*1979;62:579-85.
30. Prado G. Influência da irradiação gama (⁶⁰Co) na microbiota fúngica e na aflatoxina B₁ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). [Tese de doutorado]. Lavras, Minas Gerais: Universidade Federal de Lavras, 2005. 186p.
31. Ferreira DF. Sistema de análise estatística – SISVAR. Versão 5.0 Lavras: DEX/UFLA, 2000.
32. Pimenta RS. Utilização de leveduras predadoras como agentes de controle biológico de fungos filamentosos causadores de doenças pós-colheita. [Tese de doutorado]. Instituto de Ciências Biológicas. Belo Horizonte, Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais, 2004. 108p.
33. Pimenta RS, Silva FLS, Silva JFM, Morais PB, Braga DT, Rosa CA, Correa Junior A. Biological control of *Penicillium italicum*, *P. digitatum* e *P. expansum* by the predacious yeast *Saccharomycopsis schoenii* on oranges. *Braz J Microbiol.*2008;39:85-90.
34. Kusumaningtyas E, Widiastuti R, Maryam R. Reduction of aflatoxin B₁ in chicken feed by using *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus oligosporus* and their combination. *Mycopath.*2006;162:307-11.
35. Scott PM, Kanhere SR, Lawrence GA, Daley EF, Farber JM.. Fermentation of wort containing added ochratoxin A and fumonisins B₁ and B₂. *Food Addit Contam.*1995; 12(1):31-40.
36. Bejaoui H, Mathieu F, Taillandier P, Lebrihi A. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *J Appl Microbiol.*2004; 97:1038-44.
37. Druvefors UA. Yeast biocontrol of grain spoilage moulds. [Thesis – Doctoral] – University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 2004. 44p.
38. Petersson S, Schnürer J. *Pichia anomala* as a biocontrol agent of *Penicillium roqueforti* in high-moisture wheat, rye, barley and oats stored under airtight conditions. *Can J Microbiol.*1998;44(5):471-6.
39. Coelho AR, Celli MG, Ono EYS, Hoffmann FL, Pagnocca FC, Garcia S, Sabino M, Harada KI, Wosiacki G, Hirooka EY. Patulin biodegradation using *Pichia ohmeri* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World Mycotoxin Journal*. No prelo 2008.