



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDRESSA JACQUELINE DE OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DE LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO NA
ANTIBIOSE DE *Fusarium graminearum* E DETOXIFICAÇÃO
DE ZEARALENONA**

Londrina
2016

ANDRESSA JACQUELINE DE OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DE LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO NA
ANTIBIOSE DE *Fusarium graminearum* E DETOXIFICAÇÃO
DE ZEARALENONA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Elisabete Yurie
Sataque Ono

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Oliveira, Andressa Jacqueline de .

APLICAÇÃO DE LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO NA ANTIBIOSE DE *Fusarium graminearum* E DETOXIFICAÇÃO DE ZEARALENONA / Andressa Jacqueline de Oliveira. - Londrina, 2016.
75 f.

Orientador: Elisabete Yurie Sataque Ono.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, , 2016.

Inclui bibliografia.

1. antagonismo - Tese. 2. *Saccharomyces cerevisiae* - Tese. 3. remoção de micotoxina - Tese. I. Ono, Elisabete Yurie Sataque. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. . III. Título.

ANDRESSA JACQUELINE DE OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DE LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO NA ANTIBIOSE DE
Fusarium graminearum E DETOXIFICAÇÃO DE ZEARALENONA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Elisabete Yurie
Sataque Ono
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –
UTFPR

Profa. Dra. Sandra Garcia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 20 de abril de 2016.

*Dedico este trabalho a Deus,
pelas diversas oportunidades que tenho tido na vida.
Aos meus pais, José Benedito de Oliveira e Iracema de Oliveira,
pelo esforço, dedicação, amor e apoio.
Ao meu namorado Rodrigo Jatki,
pela paciência, compreensão e companheirismo.
Aos amigos e colegas,
pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas.
A todos os professores que contribuíram
para meu crescimento intelectual e pessoal.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação, por toda a dedicação e ensinamentos indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, à Fundação Araucária e CAPES pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsa de mestrado.

Ao Prof. Dr. Benedito Corrêa (USP) pela disponibilização das cepas de *Fusarium graminearum*.

Ao Prof. Dr. Mario Augusto Ono pelo apoio e disponibilização de materiais fundamentais para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Célia Guadalupe Tardelli de Jesus, pelos ensinamentos em microscopia eletrônica de varredura.

Ao Prof. Dr. Edio Vizoni pelo auxílio com a análise estatística dos dados do presente trabalho.

Aos professores do Programa do Mestrado em Biotecnologia pelos ensinamentos e colaboração em diversos aspectos.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (BBTEC/UEL): Nelson Rodriguez, Elda Aguiar, Silvia Borba, Sérgio Evangelista, Sandra Aparecida Defende pela colaboração e auxílio.

Ao Osvaldo Capelo, Daiani Barbieri de Andrade e Edson Moreti pelo auxílio na execução da análise de microscopia eletrônica de varredura.

Às colegas de laboratório Danielle Cardoso Gimenes, Melissa Hirozawa e Jaqueline Gozzi Bordini.

A todos que colaboraram para realização deste trabalho.

“Ainda acho que precisamos conhecer o inverno para compreender o verão, assim como é necessário passar por momentos de tristeza profunda para conseguir identificar e valorizar a felicidade quando ela chegar. E não devemos, nunca, nos esquecer das pessoas que amamos.”

A Cabana

Oliveira, Andressa Jacqueline de. **Aplicação de leveduras de panificação na antibiose de *Fusarium graminearum* e detoxificação de zearalenona**. 2016. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

A zearalenona (ZEA) é um metabólito secundário tóxico (micotoxina), produzido principalmente por *Fusarium graminearum*, comumente detectado em trigo e milho. Os efeitos toxicológicos de ZEA estão relacionados com suas propriedades estrogênicas, especialmente em suínos. ZEA é termoestável, não sendo eliminada durante o processamento industrial e persiste em rações. Os métodos de controle de contaminação por micotoxinas são aplicados na pré-colheita, atuando na inibição do desenvolvimento fúngico, ou pós-colheita através da utilização de métodos de detoxificação. O objetivo deste estudo foi avaliar a aplicação de leveduras de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) no antagonismo de *Fusarium graminearum* e na remoção *in vitro* de ZEA. Para este propósito, as leveduras foram isoladas de cinco marcas comerciais de fermento biológico (ScA, ScB, ScC, ScD e ScE). Foram realizados testes de antibiose em meio sólido, onde discos de oito milímetros de crescimento fúngico foram depositados no centro de placas de Petri contendo ágar Sabouraud acrescido de um mililitro de diferentes concentrações celulares de leveduras (10^5 , 10^6 , 10^7 células/mL). As placas foram incubadas durante sete dias a 25 °C. Decorrido o tempo de incubação, o diâmetro do crescimento dos fungos foi medido, e a percentagem de inibição do crescimento fúngico foi calculada. As alterações morfológicas em hifas de *F. graminearum* na presença de *S. cerevisiae* (ScE) foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura. Paralelamente, foi avaliada a capacidade de detoxificação de zearalenona por células de *S. cerevisiae* viáveis e inviáveis (tratamento térmico a 121 °C por 15 min). As células de leveduras foram padronizadas e resuspensas em tampão fosfato salina (pH 7,4), a uma concentração final de ZEA de 500 ng/mL. O ensaio foi incubado a 37 °C, 250 rpm por 60 min. As cepas de levedura apresentaram uma taxa de inibição do crescimento de *F. graminearum* FRS 26 de 48 a 71 %, e para *F. graminearum* FSP 27 de 47 a 64 %. A maior taxa de inibição do crescimento de *F. graminearum* FRS 26 ocorreu na concentração celular de 10^7 células/mL. Para a levedura ScA a taxa de inibição foi proporcional a concentração celular. Por outro lado, as taxas de inibição do crescimento fúngico das leveduras ScC, ScD e ScE não diferiram estatisticamente entre as concentrações de 10^5 e 10^6 células/mL. A maior taxa de inibição do crescimento de *F. graminearum* FSP 27 também ocorreu na concentração de 10^7 células/mL, mas não houve diferença estatística entre as diferentes concentrações celulares de ScA, ScC e ScE. As micrografias eletrônicas revelaram algumas alterações morfológicas em hifas de *F. graminearum* FSP 27, como hifas mais finas e um material extracelular envolvendo as hifas, assemelhando-se a um biofilme. Entretanto, não foram observadas alterações estruturais em hifas de *F. graminearum* FRS 26, indicando que o provável mecanismo antagônico envolvido na antibiose de *F. graminearum* é a competição por nutrientes. A remoção de ZEA *in vitro* por células viáveis de leveduras variou de 67 (ScE) a 76 % (ScD) não havendo diferença estatística entre as diferentes leveduras avaliadas pelo teste de Tukey ($p > 0.05$). As células inviáveis de leveduras

apresentaram uma remoção de zearalenona de 78 (ScE) a 86 % (ScD). Comparando a remoção de ZEA (%) pela mesma cepa de *S. cerevisiae*, as células inviáveis das cepas ScC e ScD apresentaram maior capacidade de remoção do que as células viáveis ($p < 0,05$). Outras cepas não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) na média de remoção de ZEA (%) entre as células viáveis e células inativadas pelo calor. O presente estudo mostrou que leveduras de panificação podem inibir o crescimento de *Fusarium graminearum*, sendo a competição por nutrientes o provável mecanismo envolvido no efeito antagonista. Todas as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* testadas apresentaram potencial para a remoção *in vitro* de ZEA. *Saccharomyces cerevisiae* é *Generally Recognized as Safe* (GRAS), portanto, não há risco de sua aplicação na alimentação humana e animal. Podem ser aplicadas na inibição do crescimento fúngico ou serem incluídas como um novo produto em rações, reduzindo as perdas económicas e minimizando o risco de ZEA entrar na alimentação humana por *carry-over*.

Palavras-chave: Antagonismo. Remoção. *Saccharomyces cerevisiae*. Micotoxina.

Oliveira, Andressa Jacqueline de. **Baker's yeast application in *Fusarium graminearum* antibiosis and zearalenone detoxification**. 2016. 76 p. Dissertation (Master in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina 2016.

ABSTRACT

Zearalenone (ZEA) is a toxic secondary metabolite (mycotoxin), produced mainly by *Fusarium graminearum*, commonly detected in wheat and corn. ZEA toxicological effects are related to their estrogenic properties especially in swine. ZEA is thermostable and is not eliminated during industrial processing then remain in the feed. Control methods for mycotoxin contamination are applied at the pre-harvest, which involve fungal growth inhibition or use of detoxification methods at post-harvest stage. The objective of this study was to evaluate the baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) application in *Fusarium graminearum* antagonism and *in vitro* ZEA removal. For this purpose, the yeasts were isolated from five commercial brands of biological yeast (ScA, ScB, ScC, ScD and ScE). Antibiosis tests were performed on solid medium, an eight millimeters plug of fungal growth were placed on the center of Petri dishes containing Sabouraud agar added by one milliliter of different yeast cell concentrations (10^5 , 10^6 , 10^7 cells/ml). The plates were incubated for seven days at 25 °C. After the incubation time, the diameter of fungal growth was measured, and the percentage of growth inhibition was calculated. Morphological changes in *F. graminearum* hyphae in the presence of *S. cerevisiae* (ScE) were analyzed by scanning electron microscopy. In parallel, *in vitro* ZEA detoxification ability of viable and unviable (heat treatment at 121 °C for 15 min) *S. cerevisiae* strains was evaluated. The yeast cells were standardized and resuspended in phosphate buffered saline (pH 7.4), at a final ZEA concentration of 500 ng/ml. The assay was incubated at 37 °C, 250 rpm for 60 min. The yeast strains showed inhibition rates for *F. graminearum* FRS 26 growth ranging from 48 to 71 %, and for *F. graminearum* FSP 27 growth from 47 to 64 %. The highest inhibition rates for *F. graminearum* FRS 26 growth occurred in 10^7 cells/ml cell concentration. For ScA the inhibition rate was proportional to cell concentration. On the other hand, fungal growth inhibition rates for ScC, ScD and ScE yeast strains did not differ statistically between the concentrations of 10^5 and 10^6 cells/ml. The highest inhibition rate of *F. graminearum* FSP 27 growth also occurred at a concentration of 10^7 cells/ml, but there was no statistical difference between the different cell concentrations for ScA, ScC and ScE. Scanning electron micrographs showed some morphological changes in *F. graminearum* FSP 27 hyphae, such as thinner hyphae and an extracellular material around the hyphae resembling a biofilm. However, no structural changes were observed in *F. graminearum* FRS 26 hyphae, indicating that the probable antagonistic mechanism involved in *F. graminearum* antibiosis is the competition for nutrients. *In vitro* ZEA removal for viable yeast cells ranged from 67 (ScE) to 76 % (ScD) with no statistical difference among the different yeasts evaluated by the Tukey test ($p > 0.05$). The unviable yeast cells showed a zearalenone removal ranging from 78 (ScE) to 86 % (ScD). Comparing the ZEA removal (%) by the same *S. cerevisiae* strain, unviable cells of ScC and ScD strains showed higher ability ($p < 0.05$) than the viable cells. Other strains showed no significant difference ($p > 0.05$) in mean ZEA removal (%) between viable and heat inactivated cells. This study showed that yeast strains isolated from baker's yeast can inhibit the growth of *Fusarium graminearum*

and competition for nutrients was probably the major mechanism involved in antagonistic effect. All the *Saccharomyces cerevisiae* strains tested showed potential for *in vitro* ZEA removal. *Saccharomyces cerevisiae* is Generally Recognized as Safe (GRAS), therefore there is no risk for its application in food and feed. They can be applied for fungal growth inhibition or can be included in a new product for animal feed, reducing economic losses and minimizing risk of ZEA carry-over to human food.

Key Words: Antagonism. Removal. *Saccharomyces cerevisiae*. Mycotoxin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Estrutura química da zearalenona e seus derivados: (a) zearalenona (b) α -zearalenol, (c) β -zearalenol, (d) zearalanona, (e) α -zearalanol e (f) β -zearalanol 18
Figura 2:	Biossíntese de zearalenona. 19
Figura 3:	Biotransformação da zearalenona. 20
Figura 4:	Esquema da parede celular de levedura..... 29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.1.1	Objetivos específicos	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	MILHO: IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	15
3.2	<i>Fusarium graminearum</i>	16
3.3	MICOTOXINAS	16
3.3.1	Zearalenona	17
3.3.1.1	Propriedades físico-químicas	18
3.3.1.2	Biossíntese.....	19
3.3.1.3	Mecanismo de ação, biotransformação e efeitos toxicológicos	20
3.3.1.4	Limites máximos e ocorrência de contaminação de ZEA em alimentos.....	23
3.4	ESTRATÉGIAS PARA A MINIMIZAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE ZEARALENONA	25
3.4.1	Potencial antagonista de leveduras frente a fungos toxigênicos.....	26
3.4.2	Utilização de leveduras na detoxificação de zearalenona.....	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	MICRO-ORGANISMOS	31
4.1.1	Cepas de <i>Fusarium graminearum</i>	31
4.1.2	Isolamento e armazenamento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de fermento biológico comercial.....	31
4.2	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTAGONISTA DE LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO	32
4.2.1	Preparo dos inóculos.....	32
4.2.3	Avaliação do potencial antagonista de leveduras de panificação em meio sólido	32
4.3	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DAS ALTERAÇÕES	

	MORFOLÓGICAS DE <i>F. graminearum</i>	33
4.3.1	Cultivo da interação de <i>Fusarium graminearum</i> X levedura de panificação	33
4.3.2	Preparo da amostra e análise por Microscopia Eletrônica de Varredura	33
4.4	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DETOXIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO	34
4.4.1	Calibração do padrão de zearalenona	34
4.4.2	Preparo das células de leveduras	34
4.4.2.1	Cultivo.....	34
4.4.2.2	Preparo das células de levedura.....	35
4.4.3	Ensaio de detoxificação de zearalenona.....	35
4.4.3.1	Pré-limpeza de zearalenona	35
4.4.3.2	Determinação de zearalenona adsorvida.....	36
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
	ARTIGO A.....	38
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de carne suína, representando 3,3 % da produção mundial. O Paraná é o Estado brasileiro com maior rebanho suíno, representando 16,9 % do total nacional (SEAB, 2015b). No Brasil, aproximadamente 60 % da produção de milho é destinada à produção de rações para suínos e aves (ABIMILHO, 2015). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, com uma produção de 84,8 milhões de toneladas na safra 2014/15. O Estado do Paraná é o segundo maior produtor nacional de milho, representando 20 % da produção nacional (16 milhões de toneladas) (SEAB 2015a; CONAB, 2016).

Devido a sua alta qualidade nutricional, o milho é suscetível ao desenvolvimento de fungos toxigênicos, produtores de metabólitos secundários tóxicos denominados micotoxinas. As micotoxinas constituem um grupo diverso de compostos orgânicos de baixa massa molecular (MOLINA-MOLINA et al., 2014; TATAY et al., 2014).

As espécies produtoras de micotoxinas do gênero *Fusarium* spp estão presentes em todas as zonas climáticas. *Fusarium graminearum* é um importante fitopatógeno, que reduz a produtividade da cultura afetando diretamente os agricultores, além de produzir uma variedade de micotoxinas, que são facilmente transferidos para rações destinadas à alimentação animal ou produtos destinados à alimentação humana. A contaminação de grãos por micotoxinas pode levar a rejeição ou a desclassificação de grãos no mercado, resultando em perda indireta (GLENN, 2007; HUSSEIN, BRASEL, 2001; PLACINTA, D'MELLO, MACDONALD, 1999; GENG et al., 2014).

Zearalenona (ZEA), uma lactona do ácido β -resorcílico, é produzida principalmente por *Fusarium graminearum*, comumente detectada em trigo e milho. A toxicidade de zearalenona e de seus metabólitos está relacionada com suas propriedades estrogênicas tais como infertilidade, vulvovaginite e prolapso retal e vaginal em suínos (KUIPER et al., 1998; MARIN et al., 2013).

ZEA é termoestável e pode resistir ao processamento industrial, persistindo no produto final (alimentos ou rações) (NURYONO et al., 2005; ALMEIDA et al., 2011; QUEIROZ et al., 2012; ALDANA et al., 2014; IQBAL et al., 2014b; IQBAL et al., 2014a).

Existem medidas preventivas de contaminação fúngica pré e pós-colheita (IAMANAK, OLIVEIRA, TANIWAKI, et al., 2010). A aplicação de fungicidas é uma das principais estratégias pré-colheita, no entanto sua utilização pode ser prejudicial ao meio ambiente e à saúde humana e animal (MEDEIROS et al., 2012). Portanto o controle biológico é uma alternativa atraente para a minimização da contaminação de micotoxinas de forma eficiente e segura, mantendo a qualidade da alimentação humana e animal (ALTALHI, 2007).

As leveduras são capazes de sintetizar e excretar compostos antimicrobianos proteicos capazes de atuar na inibição do crescimento de organismos da mesma espécie ou de espécies distintas (LOWES et al., 2000; POLONELLI et al., 1983). Diversos autores relataram a utilização de leveduras na inibição do crescimento de *F. graminearum* (ARMANDO et al., 2013), *Aspergillus carbonarius* (KAPETANAKOU et al., 2012), *Botrytis cinerea* (NALLY et al, 2012) e *F. fujikuroi* (MATIC et al., 2014).

Uma medida pós-colheita de redução na contaminação de micotoxinas consiste na detoxificação de cereais contaminados (ZINEDINE et al., 2007). Diversos autores demonstraram o potencial da utilização de células de leveduras (ARMANDO et al., 2012), ou produtos derivados (FREIMUND, SAUTER, RYS, 2003; FRUHAUF et al., 2012; BORDINI et al., 2014), na detoxificação de micotoxinas.

Considerando a importância econômica do milho, e os riscos que a zearalenona apresenta à saúde humana e animal, o presente trabalho avaliou o potencial de leveduras isoladas de fermento biológico comercial na antibiose de *Fusarium graminearum* e na detoxificação *in vitro* de zearalenona.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicação de leveduras, utilizadas na panificação, como agentes antagonistas de *Fusarium graminearum* e sua capacidade na detoxificação *in vitro* de zearalenona.

2.1.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- Isolar leveduras *Saccharomyces cerevisiae* de diferentes marcas de fermento biológico utilizados na panificação.
- Avaliar a capacidade de antagonismo de leveduras de panificação frente a *Fusarium graminearum*;
- Avaliar as possíveis alterações morfológicas em micélios de *F. graminearum*;
- Avaliar a capacidade de detoxificação de zearalenona por leveduras de panificação viáveis e inviáveis.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MILHO: IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Botanicamente o milho é caracterizado como monocotiledônea pertencente à família das gramíneas (*Poaceae*), subfamília *Panicoideae*, gênero *Zea* e espécie *Zea Mays* L. O peso médio do grão é de 250 a 300 mg. A composição em base seca é de 72 % de amido, 9,5 % proteínas e 4 % de lipídeos, portanto um alimento energético para dietas humana e animal (PAES, 2006).

O milho é uma cultura bastante disseminada no Brasil (MAGALHÃES et al. 2002). Segundo a Secretaria do Estado de Agricultura e Abastecimento - SEAB, os maiores produtores de milho, são respectivamente: Estados Unidos, China e Brasil. No âmbito nacional, o Estado do Paraná é o segundo maior produtor nacional de milho, representando 20 % da produção nacional (16 milhões de toneladas) (SEAB 2015a; CONAB, 2016).

No Brasil, aproximadamente 60 % da produção de milho é destinada à produção de rações para suínos e aves (ABIMILHO, 2015). O milho é amplamente utilizado na dieta de suínos, devido sua disponibilidade comercial e qualidade nutricional (MARQUES et al. 2007). O Brasil, quarto maior produtor, possui uma produção de 3,19 milhões de toneladas de carne representando 3,3 % da produção mundial. O rebanho nacional está estimado em 37.929.357 cabeças, sendo o Paraná o Estado com maior rebanho, (6.920.787 cabeças), representado 20 % do total nacional (SEAB, 2015b).

Devido à qualidade nutricional, volume de produção e fatores climáticos, o milho torna-se suscetível ao desenvolvimento de fungos toxigênicos, que são responsáveis pela podridão em raízes, colmo e espiga e deterioração do grão, gerando prejuízos econômicos (FERROCHIO et al., 2013). Os principais gêneros fúngicos encontrados em milho são *Fusarium* spp, *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp (KAWASHIMA, VALENTE-SOARES, 2006).

3.2 *Fusarium graminearum*

Fusarium graminearum (teleomorfo *Gibberella zaeae*) é um ascomiceto responsável pela doença fusariose em culturas de cereais como o trigo, cevada, arroz e aveia, bem como de podridão de espigas e podridão de colmo do milho (GENG et al., 2014). Por ser um importante fitopatógeno, *Fusarium graminearum* pode causar perdas econômicas. A doença causada por este micro-organismo reduz a produtividade da cultura, afetando diretamente os agricultores. *Fusarium graminearum* é capaz de produzir diversas toxinas, que contaminam grãos e que são facilmente transferidas para rações destinadas à alimentação animal, levando à rejeição ou à desclassificação de grãos no mercado (PLACINTA, D'MELLO, MACDONALD, 1999; HUSSEIN, BRASEL, 2001; GLENN, 2007; GENG et al., 2014).

F. graminearum produz esporos sexuais (ascósporos) e assexuais (conídios), que desempenham papéis importantes no seu desenvolvimento e sua propagação (GENG et al., 2014). Os esporos (ascósporos e conídios) são resistentes a condições de estresse ambiental, portanto os resíduos culturais constituem a principal fonte de inóculo de *F. graminearum* (TRAIL, GAFFOOR, VOGEL, 2005; OSBORNE, STEIN, 2007). Os ascósporos podem ser emitidos para a atmosfera a partir do peritécio, macroconídios podem propagar-se por dispersão durante a chuva e por insetos vetores. Tanto os ascósporos quanto os conídios podem ser encontrados em qualquer momento dos estágios de maturação das culturas de cereais infectados (BEYER, VERREET, RAGAB, 2005; TRAIL, GAFFOOR, VOGEL, 2005).

As espécies produtoras de micotoxinas do gênero *Fusarium* spp estão presentes em todas as zonas climáticas. Diversas espécies de *Fusarium* spp produzem metabólitos tóxicos, incluindo a zearalenona, micotoxina estrogênica não esteroide (STOPA et al., 2014).

3.3 MICOTOXINAS

As micotoxinas constituem um grupo estruturalmente diverso de compostos orgânicos, sintetizadas durante o metabolismo secundário de alguns fungos filamentosos, especialmente aos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp ou *Fusarium* spp. Em condições de temperatura e umidade adequadas, as micotoxinas podem contaminar diversos cereais e rações, representando um grave risco à saúde humana e animal. As micotoxinas mais

frequentes são aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, fumonisinas e zearalenona (SWEENEY, DOBSON, 1998; TOMASEVIC-CANOVIC et al., 2003; LUONGO et al., 2006; MOLINA-MOLINA et al., 2014; TATAY et al., 2014).

As micotoxinas podem entrar na dieta humana diretamente por meio do consumo de cereais, e indiretamente por meio de carnes, leite e ovos de animais que ingerem rações previamente contaminadas (RICHARD, 2007). A ingestão de alimentos contaminados com micotoxinas pode induzir efeitos agudos e crônicos. Os efeitos agudos ocorrem após a exposição única a uma grande concentração de micotoxina, podendo levar a morte. A exposição a pequenas concentrações de micotoxinas, durante um longo período, pode levar a efeitos crônicos, que consistem em efeitos teratogênicos, carcinogênicos, estrogênicos e imunossupressores. As concentrações de micotoxinas e seus efeitos relativos são dependentes da espécie, dose relativa, e fase de vida em que a toxina é ingerida (TOMASEVIC-CANOVIC et al., 2003; ZAIN, 2011).

Uma única espécie de fungo toxigênico é capaz de produzir um ou mais tipos de micotoxina, e uma micotoxina específica pode ser produzida por uma ou mais espécies de fungos. Entretanto, nem todas as espécies fúngicas e nem todos os metabólitos secundários são tóxicos (HUSSEIN, BRASEL, 2001).

3.3.1 Zearalenona

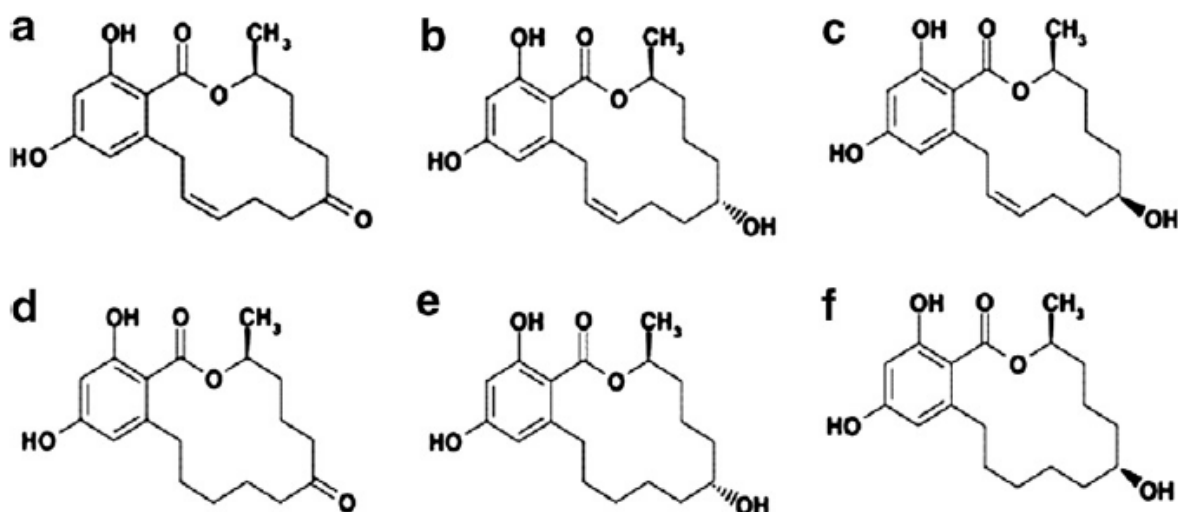
Descrita quimicamente como uma lactona de ácido β -resorcílico, a zearalenona (ZEA) é uma micotoxina estrogênica, biossintetizada por diversas espécies de *Fusarium* spp, particularmente por *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. verticillioides* e *F. incarnatum* (MARIN et al., 2013). Estas espécies de *Fusarium* spp são encontradas no solo de países de clima temperado e quente, sendo contaminante frequente de culturas de cereais em todo o mundo (ZINEDINE et al., 2007; MOLINA-MOLINA et al., 2014).

A contaminação por ZEA ocorre principalmente no campo, entretanto, a produção da micotoxina pode também ocorrer durante o armazenamento inadequado. ZEA é comumente detectada em diversos cereais, com a maior concentração em trigo, milho e seus derivados (ZATECKA et al., 2014; GENG et al., 2014).

3.3.1.1 Propriedades físico-químicas

A zearalenona (Figura 1) pode ser descrita quimicamente como lactona do ácido 6-(10 hidróxi-6oxo-trans-1-undecenilo) β -resorcílico. O nome de zearalenona é derivado da combinação: “zea” de *G. zeae*; “ral” lactona do ácido resorcílico; “eno” para a presença de duplas ligações em C-10 a C-2; e “ona” para a C-60-cetona (ZINEDINE et al., 2007). Possui fórmula molecular $C_{18}H_{22}O_5$, é um composto cristalino branco com ponto de fusão de 164 - 165 °C. O máximo de absorção de UV em metanol ocorre a 236, 274 e 316 nm, a fluorescência máxima ocorre em etanol sobre irradiação a 314 nm, com emissão a 450 nm. Apresenta solubilidade em água 0,002 g / 100 mL; possui ligeira solubilidade em n-hexano e progressiva solubilidade em benzeno, acetonitrila, cloreto de metileno, metanol, etanol e acetona. Possui estabilidade térmica (sem alterações de concentração após aquecimento a 150 °C durante 44 horas) (KUIPER-GODMAN, SCOTT, WATANABE, 1987).

Figura 1: Estrutura química da zearalenona e seus derivados: (a) zearalenona (b) α -zearalenol, (c) β -zearalenol, (d) zearalanona, (e) α -zearalanol e (f) β -zearalanol.

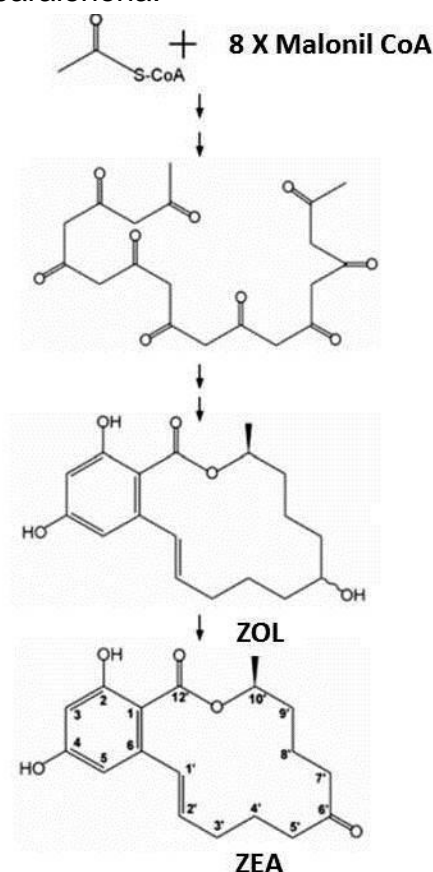


Fonte: Zinedine et al. (2007).

3.3.1.2 Biossíntese

A estrutura química da zearalenona apresenta uma porção não reduzida de policetídeo, sintetizado por meio de reações de condensação catalisada por uma policetídeo sintase não redutora. Inicialmente, cinco unidades de malonil-CoA são condensadas em um hexacetídeo. Em seguida, outra policetídeo sintase (FgPKS13) adiciona 3 unidades de malonil-CoA resultando em um nonacetídeo. Este nonacetídeo é submetido a duas reações de ciclização, resultando na formação de um anel aromático e uma estrutura de anel macrolídeo, com uma ligação de lactona. A conversão final de zearalenol em zearalenona é catalisada por uma oxidase de álcool isoamílico (ZEB1), que converte o macrolídeo ligado a um grupo cetona (KIM, LEE, JIM, 2005; GAFFOOR, TRAIL, 2006).

Figura 2: Biossíntese de zearalenona.



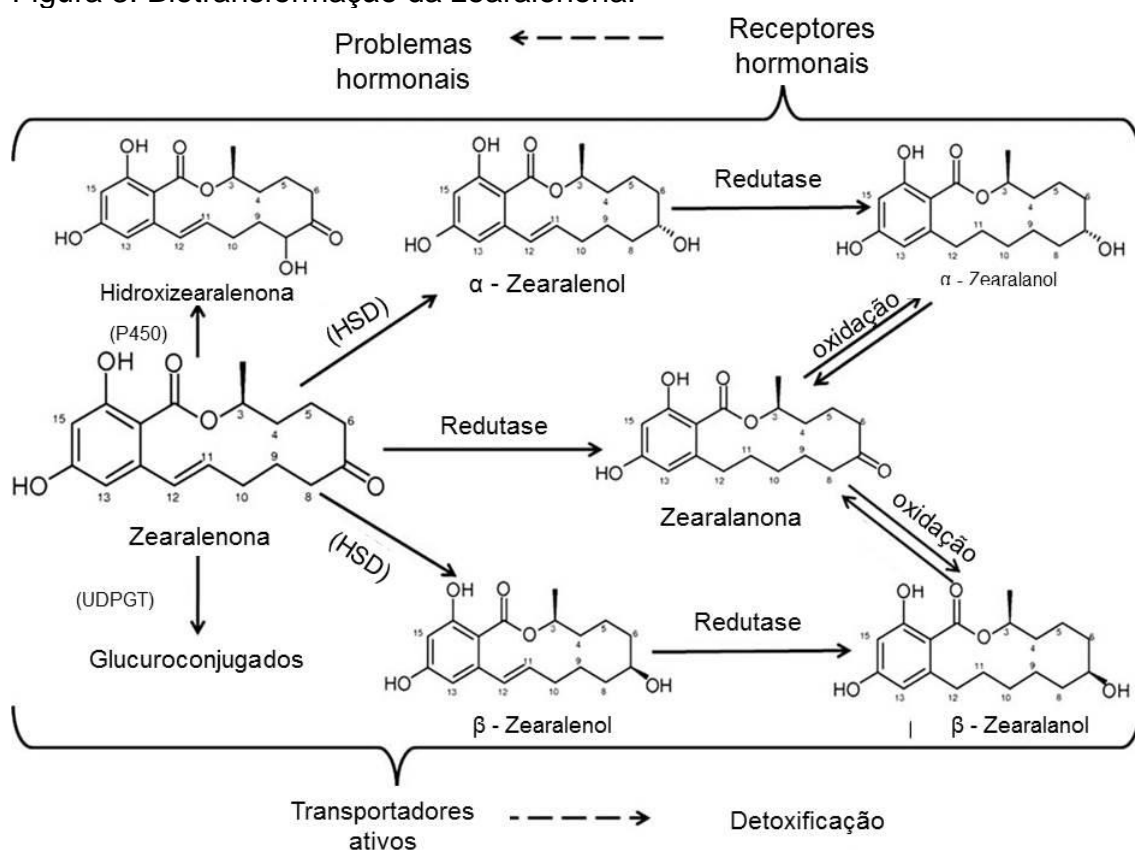
Fonte: adaptado de Kim, Lee, Jim (2005).

3.3.1.3 Mecanismo de ação, biotransformação e efeitos toxicológicos

A toxicidade de ZEA e os seus metabólitos está relacionada com suas propriedades estrogênicas, devido a sua estrutura ser similar a hormônios estrogênicos de ocorrência natural, como estradiol, estrona e estriol (MIKSICEK,

1994; KUIPER et al., 1998). Após administração oral, ZEA é rapidamente absorvida (80 – 85 %), sendo possível detectar ZEA, ou seus produtos de degradação (Figura 3), 30 minutos após a ingestão, ligada a globulinas como hormônios sexuais (OLSEN et al., 1987; BIEHL et al., 1993), As manifestações específicas de ZEA são dependentes da espécie, dose relativa, e fase de vida em que a zearalenona é ingerida(ZATECKA et al., 2014).

Figura 3: Biotransformação da zearalenona.



Fonte: adaptado de Duca et al. (2010).

O metabolismo de zearalenona pode ocorrer através de três mecanismos (Figura 3) (DUCA et al., 2010):

- Enzimas monooxigenases convertem zearalenona em uma forma hidroxilada (carbono 8). Os citocromos capazes de realizarem esta reação são: citocromo humano P450 (CYP), CYP3A4 e CYP2C8 (BRAVIN et al., 2009; PFEIFFER, HEYTING, METZLER, 2007);

- Desidrogenases Hidroxiesteróide convertem ZEA por redução da cetona presente no carbono 7 em dois metabólitos estereoisômeros: α-zearalenol e

β -zearalenol, que podem ser reduzidos a α -zearalanol e β -zearalanol através da redução da dupla ligação entre os carbonos 11 e 12;

- Conjugação com ácido glucurônico catalisada pela uridina difosfato glicuronil transferase (UDPGTs), sendo posteriormente eliminada pela urina (DUCA et al., 2010).

Estudos com zearalenona marcada radioativamente em camundongos detectaram ZEA em tecidos alvos de estrogênio, tais como útero, células intersticiais dos testículos e folículos do ovário. Marcadores radioativos também foram encontrados em tecido adiposo, indicando que o armazenamento no tecido adiposo pode ocorrer (KUIPER-GODMAN, SCOTT, WATANABE, 1987).

Micotoxicoses causadas por ZEA estão relacionadas com efeitos estrogênicos, infertilidade, redução dos níveis de testosterona no soro, redução de esperma e mudança nos níveis de progesterona (SHIER et al., 2001). O metabolismo de zearalenona pode ocorrer no fígado, sendo observada a sua capacidade de indução de lesões hepáticas com posterior desenvolvimento de carcinoma hepatocelular e alterações em parâmetros enzimáticos em ratos (MAAROUFI et al., 1996).

Collins, Sprando, Black (2006) estudaram o efeito de ZEA na dieta de ratos fêmeas Sprague-Dawley grávidas. Doses de ZEA de 0, 1, 2, 4 ou 8 mg / kg corporal foram administradas diariamente. Foram observados desenvolvimento tardio e redução de peso fetal em todos os tratamentos. Nesse estudo, os autores concluíram que ZEA é tóxica para o sistema reprodutivo, resultando em aumento do útero, alterações no trato reprodutivo, redução da ninhada, diminuição da fertilidade e alterações nos níveis de progesterona e estradiol nos animais.

Stopa et al. (2014) avaliaram o efeito de exposição a longo prazo a doses de ZEA na histologia uterina de cadelas pré-púberes. Foram administradas doses de ZEA de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal durante 42 dias. Os resultados do estudo indicaram que a exposição a doses baixas de ZEA, 100 % e 150 % do NOAEL (*No Observable Adverse Effect Level*) provoca a hiperplasia glandular do endométrio simples acompanhado angiogênese e vasodilatação com consequências relacionadas.

Zatecka et al. (2014) avaliaram a exposição de ratos machos a duas concentrações de ZEA dissolvida em água potável (150 $\mu\text{g}/\text{L}$ e 0,15 $\mu\text{g}/\text{L}$). Os resultados apontaram diminuição da concentração de espermatozóides (em 40 %),

aumento do número de espermatozóides morfologicamente anormais e aumento de espermatozóides apoptóticos.

Os suínos são os animais mais sensíveis aos efeitos tóxicos de ZEA, podendo ocorrer hiperestrogenismo em doses acima de 1 µg/g de ZEA na dieta (BENNETT, KLICH, 2003). Matrizes suínas prenhas foram submetidas a uma dieta contendo 4,42 mg DON e 0,05 mg ZEA por kg de ração entre o 35^o e 70^o dia de gestação. Foram analisadas amostras do baço e do fígado dos fetos e das matrizes, não sendo visualizadas alterações macroscópicas. Foi observada uma alta concentração de Fe²⁺ no baço das matrizes, aumento do conteúdo de glicogênio e mudanças na arquitetura de mitocôndrias no fígado dos fetos, indicando que ZEA pode ser transferida via placenta (TIEMANN et al., 2008).

Marin et al. (2010) investigaram os efeitos de ZEA e seus metabólitos (α -zearalenol, β -zearalenol e zearalenona) nas funções de neutrófilos isolados de amostras de sangue de suínos. As concentrações de toxinas necessárias para inibir em 50 % a viabilidade de neutrófilos foram: 73,4 mM para ZEA; 59,0 mM para α -zearalenol; 56,8 mM de β -zearalenol e 53,1 mM para zearalanona. Os resultados indicaram que ZEA era menos tóxica que seus metabólitos.

Taranu et al. (2015) estudaram as alterações moleculares que ocorrem quando o intestino de suínos é exposto a ZEA. Para o estudo, foram utilizadas células epiteliais de suíno (IPEC-1) tratadas com 10 mM de ZEA durante 24 horas. A concentração de ZEA avaliada não afetou a viabilidade das células, mas pode aumentar a expressão de receptores Toll (TLR1-10) e de certas citocinas envolvidas na inflamação. Foi observado o aumento da regulação do gene CD97 e a regulação de genes supressores de tumor (DKK1, PCDH11X e TC531386), demonstrando o potencial carcinogênico de ZEA.

ZEA compete com 17 β -estradiol, ligando-se a receptores estrogênicos humanos desencadeando processos transcricionais (MIKSICEK, 1994). Zearalenona também apresenta sérios riscos à saúde humana. A ingestão de alimentos contaminados com ZEA pode causar hiperestrogenismo em mulheres, diminuição da libido, não ovulação, infertilidade e lesões neoplásicas em todo o sistema reprodutor (SHIER et al., 2001).

Um estudo realizado na Polônia com o objetivo de demonstrar a presença de ZEA no soro de mulheres com lesões neoplásicas do sistema reprodutivo demonstrou que 13,5 % dos casos registrados apresentaram resultados

positivos, indicando a presença desta toxina em conjunto com o seu derivado α -zearalenol (GAJECKI et al., 2004). Rubert et al. (2014) avaliaram 35 amostras de leite materno humano com o propósito de investigar a contaminação por micotoxinas. ZEA foi detectada em 13 amostras (37 %) e as concentrações variaram de 2,1 a 14,3 ng/mL.

Huuskonen, Auriola, Pasanen (2015) relataram que células da placenta humana (JEG-3) são capazes de metabolizar *in vitro* ZEA e zearalenol em metabólitos que possuem maior afinidade com os receptores de estrogênio. Estes metabólitos podem agir na sinalização fisiológica da placenta, levando à interrupção do progresso da gestação.

3.3.1.4 Limites máximos e ocorrência de contaminação de ZEA em alimentos

A ZEA é um contaminante comum de milho, podendo contaminar também cevada, aveia, trigo, sorgo, milheto, arroz, soja e seus derivados como farinhas, malte, cerveja, silagem de milho e farinha de soja. A legislação brasileira (Resolução N^o 7, de 18 de fevereiro de 2011) estabelece limites máximos de contaminação de zearalenona (Tabela 1). A União Europeia determina o teor máximo de zearalenona através do REGULAMENTO N.º 1126/2007 de 28 de Setembro de 2007.

Diversos autores relataram a ocorrência de ZEA em amostras de cereais e derivados destinados a alimentação humana e animal. Na região de Yogyakarta, na Indonésia, um estudo mostrou que 36 % de 89 amostras de milho e derivados apresentaram contaminação por zearalenona, variando de 5,5 - 526 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (NURYONO et al., 2005). Outro estudo realizado em Tlaxcala, México, mostrou que 70 % das 24 amostras de milho destinado à alimentação humana, apresentaram concentração de ZEA, que variou de 3,25 - 83,63 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (BRIONES-REYES, GÓMEZ-MARTINEZ, CUEVA-ROLÓN, 2007).

Cerveró et al. (2007) avaliaram 25 amostras de alimentos a base de milho nos mercados de Valência, Espanha, e relataram que 44 % das amostras foram positivas para ZEA, sendo a maior concentração detectada em amostras de *snack* de milho frito (216 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Em outro estudo realizado na Espanha, na comunidade da Catalunha, as concentrações máximas de ZEA em pão fatiado (20,9

$\mu\text{g/kg}$) e salgadinhos de milho ($22,8 \mu\text{g/kg}$) foram inferiores aos limites máximos estabelecidos ($50 \mu\text{g/kg}$) pela União Europeia (CANO-SANCHO et al., 2012).

Tabela 1: Limites máximos de zearalenona permitidos segundo Resolução Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011.

Produto	$\mu\text{g/kg}$
Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	20
Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo incluindo cevada malteada.	100
Arroz beneficiado e derivados	100
Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e subprodutos à base de milho.	150
Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo.	200
Arroz integral	400
Milho em grão e trigo para posterior processamento	400
Farelo de arroz.	600

Fonte: BRASIL (2011)

Almeida et al. (2011) analisaram 277 amostras de rações destinadas à alimentação de suínos de engorda em Portugal, e detectaram ZEA em 24,9 % das amostras com concentrações variando de 5 a $73 \mu\text{g/kg}$. Das 127 amostras de rações destinadas à alimentação de marrãs (suínos fêmea antes da primeira cria), 29,9 % foram positivas para ZEA ($5 - 57,7 \mu\text{g/kg}$). Aldana et al. (2014) avaliaram 48 amostras de farinhas (trigo, milho e mixes de ambos), coletadas em supermercados de Coimbra (Portugal) e Utrecht (Holanda). Dentre as amostras avaliadas, 37,5 % apresentaram contaminação por ZEA. A maior incidência de contaminação por ZEA foi detectada em farinha de milho (intervalo de $5,9 - 111,7 \mu\text{g/kg}$).

Iqbal et al. (2014a) coletaram um total de 147 produtos derivados de trigo (massas), de diferentes marcas, adquiridos em diferentes estabelecimentos da cidade de Punjab, Paquistão. Destas, 30 amostras apresentaram contaminação de zearalenona superior a $20 \mu\text{g/kg}$ (limite admissível pela União Europeia para alimentação de lactantes e crianças de primeira infância). Em outro trabalho Iqbal et al. (2014b) avaliaram 237 amostras de cereais matinais, onde 53 % das amostras

estavam contaminadas com zearalenona e 19 amostras estavam com contaminação superior a 50 µg/kg.

Sassahara, Yanaka, Netto (2003) avaliaram a ocorrência de ZEA em 189 amostras de alimentos fornecidos a bovinos leiteiros na região norte do Estado do Paraná, Brasil, sendo 32 (16,9 %) amostras positivas e acima do limite de 200 mg/Kg. Oliveira et al. (2006) coletaram 480 amostras de rações avícolas no Estado do Rio de Janeiro – Brasil e detectaram ZEA em 77,1 % das amostras, com níveis de ZEA variando de 0,1 a 7 µg/g. Queiroz et al. (2012) avaliaram zearalenona em 40 amostras milho destinadas à alimentação animal, armazenadas por agricultores familiares da região Central de Minas Gerais. ZEA foi detectada em 38 amostras, sendo a concentração máxima detectada de 99 µg/kg. Tralamazza et al. (2016) coletaram 150 amostras de trigo recém-colhido em três estados brasileiros (São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul). A frequência de ZEA variou entre as regiões, as amostras de trigo do Rio Grande do Sul (84 %) e São Paulo (12 %) apresentaram concentrações médias de 70,9 e 57,9 µg/kg, enquanto que ZEA não foi detectada nas amostras do Paraná.

3.4 ESTRATÉGIAS PARA A MINIMIZAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE ZEARELENONA

Estratégias que auxiliem na minimização da contaminação de micotoxinas devem ser adotadas nos estágios de pré-colheita, durante a colheita, transporte, estocagem e processamento do produto (JOUANY, 2007; IAMANAKA, OLIVEIRA, TANIWAKI, 2010).

Uma das principais estratégias de controle da contaminação pré-colheita é a aplicação de fungicidas, entretanto sua utilização pode ser prejudicial à saúde humana e animal e ao meio ambiente. Com a crescente demanda por produtos isentos de substâncias sintéticas, surge a necessidade do desenvolvimento de tecnologias mais limpas e seguras (LIU et al., 2011; MEDEIROS et al., 2012). O controle biológico de doenças pré e pós-colheita, é uma alternativa eficiente e segura para a redução de contaminação de micotoxinas em alimentos (ALTALHI, 2007; CHANCHAICHAOVIVAT, RUENWONGSA, PANIJAPAN, 2007).

Devido às perdas econômicas, o impacto à saúde humana e animal gerado por zearalenona, diversos autores avaliaram métodos físicos, químicos e

biológicos de detoxificação de alimentos contaminados (BATA, LÁSZTITY, 1999; FANDOHAN et al., 2005; JOUANY, 2007; ZINEDINE et al., 2007). A utilização de adsorventes como aditivos na alimentação animal, reduz o risco de micotoxicoses e minimiza o *carry-over* de micotoxina em produtos de origem animal (SABATER-VILLAR et al., 2007).

3.4.1 Potencial antagonista de leveduras frente a fungos toxigênicos

Diversos micro-organismos com atividade antimicrobiana vêm sendo isolados, identificados e testados. Os mecanismos de atividade antimicrobiana incluem: antibiose, competição, parasitismo e produção de substância extracelular (SCHISLER et al., 2015; KÖHL et al., 2015).

As leveduras são capazes de produzir compostos proteicos, extracelulares, com atividade antimicrobiana, denominados toxinas *killer*. A capacidade de síntese de toxina *killer* representa uma vantagem seletiva entre espécies competidoras em um mesmo *habitat* (SATO, PASTORE, PARK, 1993). O fenômeno *killer* é observado em muitos gêneros de leveduras, como *Sacchamomyces* spp, *Candida* spp, *Cryptococcus* spp, *Debaryomyces* spp, *Hanseniaspora* spp, *Kluyveromyces* spp, *Pichia* spp, *Williopsis* spp, *Zygosacchoromyces* spp, *Hansenula* spp, *Kloeckera* spp, *Metschnikowia* spp, *Rhodothorula* spp, *Schwanniomyces* spp, *Torulopsis* spp, *Ustilago* spp e *Zigowillopsis* spp (CHEN et al., 2000).

Uma toxina *killer* obtida a partir da levedura *Mrakia frigida* 2E00797 (isolada de sedimentos do mar na Antártida) foi purificada e caracterizada. A toxina *killer* purificada possui massa molecular de 55,6 kDa, com atividade *killer* ótima em pH 4,5 e a temperatura de 16 °C. Das oito espécies de leveduras testadas no referido estudo, a toxina *killer* foi capaz de inibir *Metschnikowia bicuspidata*, *Candida tropicalis* e *Candida albicans* (LIU et al., 2012). Villalba et al. (2016) caracterizaram parcialmente uma toxina *killer* (TdKT) produzida por *T. delbrueckii* NPCC 1033. A toxina TdKT apresentou massa molecular inferior a 30 kDa, e atividade enzimática de quitinase e glucanase. A atividade ótima *killer* foi estável em pH 4,2 e 4,8 sendo inativada em temperaturas superiores a 40 °C.

Vários pesquisadores relataram a utilização de leveduras na inibição do crescimento de fungos, sendo a competição por nutrientes o provável mecanismo envolvido no antagonismo de fungos filamentosos (ARMANDO et al., 2013).

Korres et al. (2011) avaliaram o potencial de inibição de *Candida krusei* BT0701, e *Kloeckera apis* BT0703 frente a dois isolados de *Fusarium guttiforme*, um isolado de *F. guttiforme* (E-261) resistente à benzimidazol e outro isolado suscetível (E-203). *Candida krusei* BT0701 inibiu 75,8 % do crescimento de *F. guttiforme* E-261, e 75,3 % de inibição para *F. guttiforme* E-203. *Kloeckera apis* BT0703 apresentou 41,4 % de inibição de *F. guttiforme* E-261 e inibição de 47,9 % para *F. guttiforme* E-203.

Kapetanakou et al. (2012) demonstraram que o crescimento de *A. carbonarius* foi inibido de acordo com os níveis relativos de inoculação de leveduras e fungo: 10^5 UFC/mL 10^2 esporos/mL (61 – 93 %) > 10^5 UFC/mL 10^5 esporos/mL (49 – 85 %) > 10^2 UFC /mL 10^5 esporos/mL (0 – 48 %).

Nally et al. (2012) isolaram 225 leveduras de três ambientes de viniculturas no distrito de Zonda, Argentina. Desses isolados, 65 apresentaram propriedades antagonistas *in vitro* contra *Botrytis cinerea*. Ensaio realizados *in vivo* demonstraram que 16 leveduras das 65 com atividade antagonista *in vitro* (15 cepas de *S. cerevisiae* e uma *Schizosaccharomyces pombe*) reduziram em 70 % ou mais o progresso da doença causada por *Botrytis cinerea*.

Armando et al. (2013) avaliaram a capacidade *in vitro* de duas cepas de *S. cerevisiae* (RC008 e RC016), de inibir o crescimento de *F. graminearum*. *S. cerevisiae* RC016 inibiu completamente o crescimento de *F. graminearum* em todas as condições testadas. *S. cerevisiae* RC008 foi capaz de reduzir significativamente a taxa de crescimento de *F. graminearum* em pH 4 a 25 °C, porém em pH 6 não houve inibição estatisticamente significativa.

Matic et al. (2014) isolaram 66 leveduras de sementes de arroz, das quais quatro apresentaram potencial inibitório do crescimento de *Fusarium fujikuroi*. As quatro leveduras apresentaram redução da doença causada por *F. fujikuroi*, em plantas de arroz cultivadas em casas de vegetação. O tratamento das sementes de arroz com as leveduras antagonistas reduziu o índice da doença de 93,0 % (controle) para 20,0 % em sementes tratadas com *Pichia guilliermondii* R9, e 28,5 % em sementes tratadas com *Metschnikowia pulcherrima* R23.

Schisler et al. (2015) combinaram o agente de controle biológico *Cryptococcus flavescens* OH 182,9 (NRRL Y-30216) com protioconazol (fungicida) na inibição de *Fusarium graminearum*. Foram selecionadas as células de *Cryptococcus flavescens* OH 182,9 (NRRL Y-30216) tolerantes a protioconazol. Em testes em casa de vegetação, *Cryptococcus flavescens* OH 182,9 tolerante a protioconazol reduziu a doença causada por *F. graminearum* em 83 % em comparação com 36 % para a cepa não tolerante.

3.4.2 Utilização de leveduras na detoxificação de zearalenona

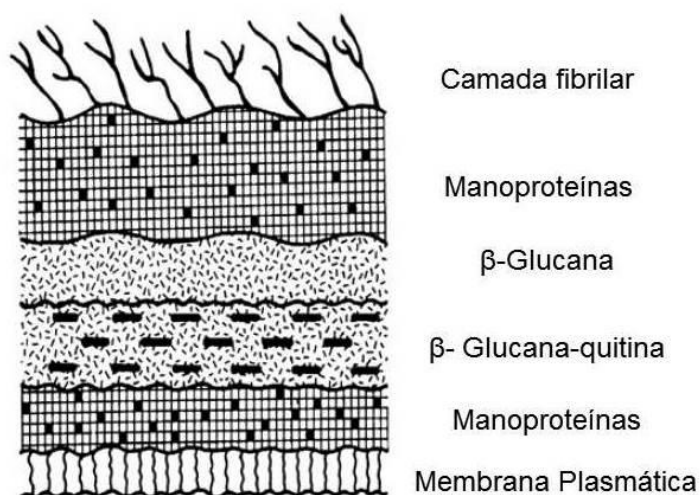
A parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é constituída de duas camadas, compostas principalmente por três macromoléculas: manoproteínas, glucana (um polissacarídeo de β -1,3 e β -1,6 glucano) e quitina (um polímero de β -1,4 N-acetilglicosamina), unidos por ligações covalentes. A manoproteína (30 % do peso seco da parede celular) compõe a camada mais externa da parede, estando ligada covalentemente a cadeias de β -1,6-glucana. Aproximadamente 75 % do peso seco da parede da levedura é constituída por polissacarídeos. A β -1,6-glucana (5 % do peso seco da parede celular) é uma molécula relativamente pequena, com cerca de 140 resíduos de glicose. Mais da metade da parede celular (50 – 60 %) é formada por β -1,3-glucana, que é composta por moléculas lineares com cerca de 1500 resíduos de glicose (KOGAN, KOCHER 2007; SHETTY, JESPERSEN, 2006). O esquema da parede celular de levedura esta representado na Figura 4.

Existem relatos da ligação de diferentes micotoxinas à superfície celular de levedura, que é atribuída às glucanas (HUWIG et al., 2001). A interação ZEA e β -D-glucanas ocorre por complementariedade estereoquímica, que envolve interações de Van Der Waals. Os grupos hidroxil, cetona e lactona de ZEA ligam-se através de ligações de hidrogênio e outras forças moleculares estáveis, aos grupos hidroxil da única hélice da estrutura (1,3) β -D-glucanas (YIANNIKOURIS et al., 2003; YIANNIKOURIS et al., 2004).

Joannis-Cassan et al. (2011) avaliaram produtos a base de parede celular de levedura (5 mg/mL) em diferentes concentrações iniciais de aflatoxina B₁ (AFB₁) (0,005 a 10 μ g/mL), ocratoxina (OTA) (0,005 a 10 μ g/g) e ZEA (0,5 a 10 μ g/g). A adsorção diminuiu conforme o aumento da concentração inicial das

micotoxinas. As percentagens de adsorção variaram de 3 a 49 % AFB₁, 14 a 72 % para OTA e 11 a 68 % para ZEA.

Figura 4: Esquema da parede celular de levedura.



Fonte: Kogan, Kocher (2007).

Armando et al. (2012) avaliaram o potencial de detoxificação de ZEA por cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Em concentrações de 1 e 5 µg/mL de ZEA, a percentagem de ligação variou de 48 a 87 %, enquanto que em concentrações de ZEA mais elevadas (20 e 50 µg/mL) a percentagem de ligação variou de 41 a 68 %. O estudo demonstrou que quanto mais espessa a parede celular da levedura, maior seria o nível de detoxificação.

Fruhauf et al. (2012) correlacionaram a capacidade de produtos a base de parede celular de levedura a se ligarem à AFB₁ e ZEA com o conteúdo de cinzas e glucanas dos produtos. Produtos com teores superiores a 30 % de cinzas apresentaram valores de adsorção de 90 % de AFB₁, enquanto que produtos com menos de 10 % de cinzas não excederam as taxas de adsorção de 20 %. A eficiência de adsorção de ZEA variou entre 10 e 60 %. Produtos com conteúdos de mananoligossacarídeos e β-glucanas inferiores a 10 %, apresentaram menos eficiência de adsorção de ZEA, comparado a produtos com teores de mananoligossacarídeos e β-glucanas superiores a 50 %.

Bordini et al. (2014) testaram o potencial de detoxificação de zearalenona por uma mistura de adsorventes (carvão ativado e parede celular de levedura). A mistura adsorvente de parede celular de levedura/carvão ativado de

75:25 apresentou a maior eficiência de adsorção de ZEA (> 96,1 %). A proporção de 87,5:12,5 (parede celular de levedura/carvão ativado) apresentou adsorção de 81,3-93,7 %. A parede celular de levedura pura foi menos eficiente, apresentando adsorção de 55,7 - 78,1 %.

Faucet-Marquis et al. (2014) analisaram o potencial de derivados de paredes de leveduras na detoxificação de ZEA e OTA. A melhor adsorção de ZEA ocorreu em pH 5 (75 %), enquanto OTA só foi significativamente adsorvida em pH 3 (50 %).

4 MATERIAL E METODOS

4.1 MICRO-ORGANISMOS

4.1.1 Cepas de *Fusarium graminearum*

Foram utilizadas duas cepas de *Fusarium graminearum* (FSP 27 e FRS 26) cedidas pela Micoteca do Laboratório de Fungos Toxigênicos e Micotoxinas do Departamento de Microbiologia do ICB/USP. Ambas as cepas foram mantidas a 4 °C, em tubos de ensaio inclinados contendo Ágar-Batata-Dextrose (BDA).

4.1.2 Isolamento e armazenamento de *Saccharomyces cerevisiae* de fermento biológico comercial

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* foram isoladas de cinco diferentes marcas de fermento biológico utilizados em panificação. Os fermentos biológicos foram adquiridos em mercados da cidade de Londrina – PR.

Uma alíquota de 10 g do fermento foi diluída em 90 mL de água peptonada estéril a 0,1 % (v/v) e submetida a diluições seriadas em água peptonada 0,1 % até a diluição 10^{-10} . Uma alíquota de 100 µL de cada diluição foi semeada em placas de Petri estéril contendo Ágar Sabouraud Dextrose com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 28 °C durante 48 h. As colônias com características de leveduras foram repicadas por esgotamento em ágar Sabouraud e em seguida incubadas a 28 °C durante 48 h.

O isolamento por meio da técnica de semeadura por esgotamento foi realizado sucessivamente até a obtenção de culturas puras. Para o armazenamento, as culturas puras foram repicadas em tubos contendo ágar YPD (peptona 20 g, extrato de levedura 10 g, glucose 20 g e ágar 20 g/L), incubados a 28 °C durante 48 h e armazenados a 5 °C.

As leveduras foram identificadas como ScA, ScB, ScC, ScD e ScE., sendo ScD isolada de fermento biológico fresco, e as demais isoladas de fermento biológico liofilizado.

4.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTAGONISTA DE LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO

4.2.1 Preparo dos inóculos

Ambas as cepas de *F. graminearum* foram repicadas em placas de Petri contendo BDA e incubadas a 25 °C por sete dias.

As leveduras foram repicadas em placas de Petri contendo 20 mL de ágar YPD, incubadas a 25 °C por 48 h. Uma alçada do cultivo de leveduras descrito anteriormente, foi transferido para erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de caldo YPD (peptona 20 g, extrato de levedura 10 g, glucose 20 g/L), incubado a 25 °C, 150 rpm por 24 h. Decorrido o tempo de incubação a concentração celular de leveduras foi padronizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

4.2.3 Avaliação do potencial antagonista de leveduras de panificação em meio sólido

O potencial antagonista foi avaliado de acordo com a metodologia descrita por Zhao et al. (2014), com modificações.

Discos de 8 mm de BDA contendo crescimento fúngico de sete dias, foram depositados no centro de placas de Petri, acrescidas com ágar Sabouraud e 1 mL de caldo YPD contendo três concentrações diferentes de leveduras : 10^5 , 10^6 e 10^7 células/mL. O ensaio foi realizado em triplicata.

As placas contendo levedura e fungo teste foram incubadas durante sete dias, a 25 °C. Decorrido o tempo de incubação, foram medidos dois diâmetros de cada colônia, denominados D_a e D_b . Depois de realizado o cálculo da média do diâmetro do crescimento fúngico, a percentagem de inibição do crescimento fúngico foi calculada por meio da Fórmula 1, onde: D_o = diâmetro da colônia do controle (mm) e D_n = diâmetro da colônia do tratamento (mm)

$$\text{Taxa de inibição (\%)} = [(D_o - D_n) / D_o] \times 100\% \quad (\text{Fórmula 1})$$

4.3 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DE *F. graminearum*

A avaliação das alterações morfológicas de micélios de *F. graminearum* FRS 26 e FSP 27 foi realizada com adaptações das metodologias descritas por Zhao et al. (2014) e Miguel et al. (2015).

4.3.1 Cultivo da interação de *Fusarium graminearum* X levedura de panificação

Os preparos dos pré inóculos de *F. graminearum* e das leveduras de panificação foram realizados conforme descrito no item 4.2.1 . Um disco de 8 mm de diâmetro de crescimento fúngico de sete dias foi inoculado em caldo batata-dextrose acrescido com 1 mL de caldo YPD contendo 10^5 células/mL de levedura. O cultivo foi incubado por 5 dias a 25 °C, 150 rpm. Decorrido o tempo de incubação, o cultivo foi interrompido por centrifugação (9620 x g) por 15 minutos a 0 °C. A biomassa foi lavada três vezes com tampão fosfato salina (PBS) 0,1 M.

4.3.2 Preparo da amostra e análise por Microscopia Eletrônica de Varredura

A preparação para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi realizada conforme descrito por Zhao et al (2014) e Miguel et al. (2015) com adaptações.

O material foi fixado em glutaraldeído 2,5 % com tampão fosfato (0,1 M) pH 7,2 durante 4 horas a temperatura ambiente, sendo posteriormente submetido a três lavagens com tampão fosfato pH 7,2 (duração de 15 minutos cada). A pós-fixação da amostra foi realizada em tetróxido de ósmio 1 %, sendo posteriormente desidratada em série gradual de etanol (três lavagens de etanol 70, 80, 90 e 100 % com duração de 15 minutos cada).

A amostra micelial foi seca ao ponto crítico em aparelho de ponto crítico (CPD 030 Critical Point BALTEC Dryer, Leica Microsystems, Liechtenstein). O material foi montado sobre suporte metálico (*stubs*) e metalizado com ouro (Sputter Coater BALTEC SDC 050, Leica Microsystems, Liechtenstein). As alterações morfológicas de *F. graminearum* foram visualizadas em MEV FEI Quanta 200 do LMEM da Universidade Estadual de Londrina.

4.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DETOXIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO

O ensaio de detoxificação de zearalenona foi realizado conforme descrito por Armando et al. (2013) e Bordini et al. (2014), com modificações.

4.4.1 Calibração do padrão de ZEA

A determinação da concentração do padrão de ZEA foi realizada através da metodologia de calibração do Instituto Adolfo Lutz (2008), utilizando um espectrofotômetro UV/VIS. O padrão de ZEA foi dissolvido em 1 mL de metanol (grau HPLC) e a absorvância da solução foi determinada a 334 nm. A concentração foi calculada através da Fórmula 2:

$$\mu\text{g de micotoxina/mL} = \frac{(A \times FC \times MM \times 1000)}{E} \quad (\text{Fórmula 2})$$

Onde:

A = absorvância

FC = fator de correção do espectrofotômetro

MM = massa molecular de zearalenona (318)

E = absorvidade molar de zearalenona (6000)

4.4.2 Preparo das células de leveduras

4.4.2.1 Cultivo

As leveduras foram repicadas em placas de Petri, contendo 20 mL de ágar YPD, incubadas a 25 °C por 48 horas. Uma alçada do cultivo de leveduras descrito anteriormente foi transferido para erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de caldo YPD, incubado a 25 °C, 150 rpm por 24 h. Os cultivos foram realizados em quadruplicata.

4.4.2.2 Preparo das células de levedura

As células foram divididas em dois grupos: células com tratamento térmico e sem tratamento térmico. Decorrido o tempo de incubação uma alíquota

das células foi autoclavada durante 15 min a 121 °C (células inviáveis), separada por centrifugação (9620 x g por 15 min a 0 °C), enquanto que as células sem tratamento foram centrifugadas para interrupção do cultivo (viáveis). Os pellets de levedura foram resuspenso em tampão PBS (0,1 M, pH 7,4), submetidos a 3 lavagens sucessivas com o mesmo tampão e 3 lavagens com água ultrapura estéril. Em seguida, o pellet foi ressuspenso em água ultrapura estéril, padronizado com o auxílio de câmara de Neubauer a uma concentração de 10^8 células/mL, em um volume final de 25 mL.

4.4.3 Ensaio de detoxificação de zearalenona

A suspensão de células descrita no item 4.4.2 foi centrifugada (9620 x g por 15 min a 0°C) e ressuspensa em 10 mL de tampão PBS (pH 7,4) a uma concentração de zearalenona de 500 ng/mL. O ensaio de detoxificação foi incubado a 37 °C, sob agitação de 250 rpm, por 1 h. Decorrido o tempo de incubação, o ensaio foi interrompido por meio de centrifugação (9620 x g por 15 minutos a 0 °C). Foram realizados controles livres de leveduras. O ensaio foi realizado em duplicata.

4.4.3.1 Pré-limpeza de zearalenona

A extração de ZEA foi realizada de acordo com a instrução do fabricante de colunas de imunoafinidade Zearalatest® WB, com adaptações. Uma alíquota de 5 mL do sobrenadante do ensaio 4.4.2.2 foi diluído 1:5 com água ultrapura, 10 mL desta diluição foi aplicada a coluna de imunoafinidade com fluxo de 1-2 gotas/s, em seguida a coluna foi lavada com 10 mL de água ultrapura (1-2 gotas/s). ZEA foi eluída com 1,5 mL de metanol grau HPLC. O eluato foi seco sob fluxo de gás N₂ a 45 °C. As amostras foram acondicionadas a -20 °C para posterior análise.

4.4.3.2 Determinação de zearalenona adsorvida

ZEA foi determinada de acordo com Bordini et al. (2014). As amostras acondicionadas foram ressuspenso em 200 µL de metanol:água (70:30 v/v) e 20 µL foi injetada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, com sistema isocrático de

fase reversa (bomba shimadzu LC-10 AD e detector de fluorescência RF-10A XL), utilizando coluna C18 Luna 5 μ 100 Å (4,6 x 250 mm, Phenomenex). Os comprimentos de excitação e emissão foram 280 e 460 nm (respectivamente). A fase móvel foi constituída de metanol:água (70:30, v/v) com fluxo de 1 mL/min. A concentração de zearalenona adsorvida foi calculada subtraindo a concentração determinada nos tratamentos da concentração determinada no controle.

O limite de detecção e o limite de quantificação foram calculados como 3 vezes e 5 vezes o desvio padrão de 7 replicatas do branco de uma amostra (INMETRO, 2007).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias das taxas de inibição de *F. graminearum* (%) foram avaliadas estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05$). Diferenças na remoção ZEA média (%) foram avaliados estatisticamente utilizando ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey e as diferenças na média de remoção ZEA (%) entre células viáveis e inviáveis (células inativadas pelo calor) por meio do teste t ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão foram redigidos sob a forma de artigo científico a ser submetido para publicação. O artigo foi redigido de acordo com as normas do periódico *Journal of Applied Microbiology*.

ARTIGO A

5.1 Baker's yeast application in *Fusarium graminearum* antibiosis and zearalenone detoxification

Abstract

Aims: Considering the serious economic losses and the health hazards caused by the natural occurrence of zearalenone (ZEA), a toxic secondary metabolite produced by *Fusarium graminearum*, this study evaluated the ability of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from baker's yeast to inhibit fungal growth and remove ZEA *in vitro*.

Methods and Results: The antagonistic effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains was evaluated against two strains of *F. graminearum* (FRS 26 and FSP 27) by the agar diffusion method. In addition, the interaction between the fungi and yeast in liquid medium was evaluated by scanning electron microscopy (SEM). The ability to remove ZEA by viable and heat inactivated yeast cells was analyzed *in vitro*. All the yeast strains tested inhibited the fungus with inhibition rates ranging from 47 to 71 %, and were able to remove ZEA *in vitro* from 70 to 87 %. Electron micrographs showed some slight morphological abnormalities caused by *S. cerevisiae* strains.

Conclusions: All the *S. cerevisiae* strains inhibited *F. graminearum* growth and competition for nutrients was the probable antagonistic mechanism. In addition, yeast strains showed potential for *in vitro* ZEA removal.

Significance and Impact of the Study: This study suggests potential application of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from baker's yeast to inhibit *F. graminearum* and remove ZEA *in vitro*.

Keywords: antagonism, adsorption, *Saccharomyces cerevisiae*, antifungal activity, decontamination.

1. Introduction

Brazil is the third largest producer of pork worldwide accounting for 3.3 % of production. Paraná state, Southern Brazil, has the largest swine herd, representing 16.9 % of the national total (SEAB 2015a). By the third quarter of 2015, Brazil exported 355.822 tons of fresh pork, and the largest exporting states were: Santa Catarina, Rio Grande do Sul and Paraná. The main importing countries were Russia (55.6 %), Hong Kong (15.3 %) and Angola (6.7 %) (Brazil 2015).

In Brazil, approximately 60 % of corn production is intended for feed production for swine and poultry (ABIMILHO, 2015). Corn production was 84.4 million tons in the 2014/2015 harvest season, ranking Brazil as the third largest corn producer in the world. Paraná State is the second main corn producer accounting for 20 % (16 million tons) of national production (SEAB 2014; SEAB 2015b; CONAB 2016).

Because of the nutritional quality corn becomes a good substratum for development of toxigenic fungi, producers of toxic secondary metabolites (mycotoxins) (Ferrochio *et al.* 2013). Zearalenone (ZEA), a lactone of β -resorcylic acid, is a mycotoxin produced mainly by *Fusarium graminearum* commonly detected in wheat and corn. The toxicity of ZEA and its metabolites is related to their estrogenic properties such as infertility, vulvovaginitis and rectal and vaginal prolapse in swine (Kuiper *et al.* 1998; Marin *et al.* 2013).

The main control strategy for minimizing pre-harvest mycotoxin contamination is fungicide application, but its use can be hazardous to human and animal health and to environment. The increasing demand for pesticide free agricultural products require cleaner and safer technologies (Liu *et al.* 2011; Medeiros *et al.* 2012). Biological control of pre and post-harvest diseases is an effective and safe alternative for minimizing mycotoxins in food production chain (Altalhi 2007; Chanchaichaovivat *et al.* 2007).

Yeasts can produce extracellular compounds with antimicrobial activity called "killer" toxins (Chanchaichaovivat *et al.* 2007, Medeiros *et al.* 2012), but the most probable mechanism involved in biological control of filamentous fungi is competition for nutrients and space (Cavaglieri *et al.* 2004). Several studies have shown the potential of yeasts to inhibit fungal growth such as *Aspergillus carbonarius* (Kapetanakou *et al.* 2012), *Botrytis cinerea* (Nally *et al.* 2012), *Fusarium graminearum* (Armando *et al.* 2013) and *F. fujikuroi* (Matic *et al.* 2014).

A post-harvest approach to minimize mycotoxin contamination is detoxification of contaminated cereals (Zinedine *et al.* 2007). The use of adsorbents as additives in animal feed reduces the risk of mycotoxicosis and minimizes carry-over of mycotoxins in products of animal origin (meat, eggs and milk) (Sabater-Villar *et al.* 2007).

Several authors have reported the application of yeasts in the detoxification of ZEA, ochratoxin A and aflatoxin B₁ (Joannis-Cassan *et al.* 2011; Fruhauf *et al.* 2012; Faucet-Marquis *et al.* 2014). The cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* has an inner layer constituted by β -D-glucans and chitin, with an outer layer formed by heavily glycosylated mannoproteins. The mannoprotein and glucan provide numerous binding sites readily accessible with different connection mechanisms, such as

hydrogen bonds, hydrophobic or ionic interactions (Huwig *et al.* 2001; Yiannikouris *et al.* 2004).

Considering the potential of yeasts, especially *Saccharomyces cerevisiae*, as well as the demand for pesticide-free products, the aim of this study was to isolate baker's yeast and evaluate their application in *Fusarium graminearum* antibiosis and their ability for ZEA removal.

2. Materials and Methods

2.1 Yeast and fungal strains

Saccharomyces cerevisiae strains were obtained from fresh baker's yeast, acquired at Londrina markets, Paraná, Brazil. A total of five yeast strains were obtained, denominated ScA, ScB, ScC, ScD e ScE.

Two strains of *Fusarium graminearum* (FSP 27 and FRS 26) used as fungal test were provided by the Mycological collection of Laboratory of Toxigenic Fungi and Mycotoxins of the Department of Microbiology of Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo (São Paulo-Brazil).

2.2 Evaluation of antifungal activity

Evaluation of antifungal activity was performed according to Zhao *et al.* (2014), Velluti *et al.* (2004) and Matic *et al.* (2014) with some modifications. Yeast cells were reactivated in YPD (yeast, peptone, dextrose) agar, incubated at 25 ± 1 °C for 24 h. Then an aliquot of the inoculum subculture was transferred to Erlenmeyer flasks

containing 50 ml YPD broth, the culture was incubated at $25^{\circ} \pm 1$ °C, 150 rpm for 48 h. Yeasts cell concentrations were standardized at 10^5 , 10^6 and 10^7 cells/ml . One milliliter of cell suspension was mixed and poured into 20 ml of Sabouraud agar. An 8-mm agar plug from an actively grown mycelium of *F. graminearum* FRS 26 and *F. graminearum* FSP 27 was placed on the center of the Petri dish. All the plates were incubated at 25 ± 1 °C for 7 days and the diameters of fungal colonies were measured. Experiments were performed in triplicate. The inhibition ratios of *F. graminearum* mycelium growth were calculated according to the following formula:

$$\text{Inhibition ratio (\%)} = \frac{(C - T)}{C} \times 100\%$$

Where:

C = the diameter of the control colony;

T = the diameter of treatment colony.

2.3 *F. graminearum* mycelium preparation for ultrastructural study

For this experiment, the yeast strain which showed the best antifungal activity on solid medium was selected. The methodology used was adapted from Zhao *et al.* (2014) and Miguel *et al.* (2015). The yeast culture was reactivated in erlenmeyer flasks containing 50 ml YPD broth, and shaken at 150 rpm, 25 ± 1 °C for 24 h. The yeast cell concentration was standardized at 10^5 cell/ml. An 8-mm potato dextrose agar (PDA) plug of *F. graminearum* actively grown for seven days at 25 ± 1 °C was added to the culture. The Erlenmeyer flasks were incubated at 150 rpm, 25 ± 1 °C for five days. After the incubation time the culture was stopped by centrifugation ($9620 \times g$ for 15 minutes at 0 °C). The *F. graminearum* mycelium was collected for scanning electron microscopy analysis.

2.4 Scanning electron microscopy (SEM)

The methodology used was adapted from Zhao *et al.* (2014) and Miguel *et al.* (2015). Samples of *F. graminearum* mycelium were fixed with 2.5 % glutaraldehyde at 25 °C for 4 h, rinsed 4 times with phosphate-saline buffer (PBS) (0.1 M) and subsequently treated with 1 % osmium tetroxide for 1 h at $20 \pm 1^\circ\text{C}$. The samples were subjected to gradual dehydration in ethanol concentrations (70 %, 80 %, 90 % and 100 %) for 15 min each and dried to the critical point (CPD 030 Critical Point BALTEC Dryer, Leica Microsystems, Liechtenstein). After drying, the samples were glued on stubs using carbon tape and coated with gold (Sputter Coater BALTEC SDC 050, Leica Microsystems, Liechtenstein). The mycelia were analyzed using a FEI Quanta 200 scanning electron microscope.

2.5 Detoxification assay

ZEA detoxification assay was performed according to Bordini *et al.* (2014) and Armando *et al.* (2012) with some modification. Yeast strains were grown in YPD agar and incubated at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 h. Subsequently, the culture was transferred to an erlenmeyer flask containing 50 ml of sterile YPD broth and incubated at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 150 rpm for 24 h. The experiments were divided into two groups: viable cells (no heat treatment) and unviable cells (heated at 121°C for 15 min). After treatment, the cell suspensions (viable and unviable) were centrifuged ($9620 \times g$ at 0°C for 15 min). The resulting pellet was washed three times with PBS solution, pH 7.4 and four more times using ultrapure sterile water. The suspension was standardized at 10^8 cells/ml in a final volume of 25 ml. This suspension was centrifuged, the pellet was suspended in 10 ml PBS (7.4) to a ZEA final concentration of 500 ng/ml. The assays

were then incubated at 37 °C, 250 rpm for 1 h. The experiment was discontinued by centrifugation (9620 xg at 0 °C for 15 min). The supernatant was used to determine the ZEA adsorbed. Controls (without yeast) were prepared simultaneously and yeast cells and the ZEA concentration adsorbed was calculated subtracting the concentration determined in controls and the supernatant of tests with yeast cells, according to the formula:

$$\text{Adsorption ratio (\%)} = \frac{(Z - Z^t)}{Z} \times 100\%$$

Where:

Z = ZEA concentration detected in control tests (ng/ml);

Z^t = ZEA concentration detected in supernatant of adsorption tests (ng/ml).

2.6 Zearalenone determination

The supernatant was subjected to clean up with immunoaffinity column (ZearalaTest®; VICAM, Milfort, MA, USA), according to the manufacturer's instructions (with adaptations). An aliquot of 5 ml of the supernatant was diluted 1:5 with ultrapure water, then 10 ml of this dilution was applied to the immunoaffinity column. The column was washed with ultrapure water, and ZEA was eluted with 1.5 ml of methanol, dried under nitrogen stream at 45 °C and stored at -20 °C.

ZEA was determined according to Bordini *et al.* (2014). The samples were dissolved in 200 μ l methanol:water (70:30, v/v) and 20 μ l were injected into a reversed phase high performance liquid chromatography system (Shimadzu LC-10 AD pump and RF-10A XL fluorescence detector, Shimadzu, Tokyo, Japan), using a C-18 Luna Phenomenex column (250 x 4.6 mm, 5 μ m, Scharlau, Barcelona, Spain).

The excitation and emission wavelengths were 280 and 460 nm, respectively. The mobile phase was methanol:water (70:30, v/v) at a flow rate of 1 ml/min.

The limits of detection and quantification were 1.3 ng/ml and 2.35 ng/ml, respectively, defined as 3 fold and 5 fold the standard deviation of 7 replications of an unspiked sample (INMETRO 2007).

2.7 Statistical analysis

Differences in mean inhibition ratio of yeast strains against *F. graminearum* isolates were evaluated statistically using ANOVA followed by the Tukey multiple comparison test ($p < 0.05$). Differences in mean ZEA removal (%) were evaluated statistically using ANOVA followed by the Tukey multiple comparison test and differences in mean ZEA removal (%) between viable and unviable (heated inactivated cells) using t test ($p < 0.05$).

3. Results

Evaluation of antifungal activity of yeast strains on solid medium

The antifungal activity of yeast strains against *F. graminearum* FRS 26 and FSP 27 is shown in Tables 1 and 2, respectively. The yeast strains showed different degrees of inhibition against *F. graminearum* FRS 26 (from 48 to 71 %) and *F. graminearum* FSP 27 (from 47 to 64 %). Regarding *F. graminearum* FRS 26, all the yeast strains showed the highest inhibition rate at 10^7 cells/ml. For ScA strain, the inhibition rate was proportional to the cell concentration. On the other hand, for ScC,

ScD and ScE strains the inhibition rate did not differ significantly between 10^5 and 10^6 cells/ml. Regarding *F. graminearum* FSP 27, all the strains also showed the highest inhibition rate at 10^7 cells/ml, but there was no significant difference among the cell concentrations for ScA, ScC and ScE strains.

Physical interaction of yeasts and fungal strains

S. cerevisiae ScE strain was used to study the possible morphological changes in *F. graminearum* mycelia. The electron micrographs (**Figure 1**) revealed some morphological changes of *F. graminearum* FSP 27 mycelia such as thinner hyphae and an extracellular material around the hyphae resembling a biofilm (**Figure 1 C**). On the other hand, no structural changes were observed in *F. graminearum* FRS 26 (**Figure 1 D**).

Zearalenone detoxification

In vitro ZEA removal by viable yeast cells ranged from 67 (ScE) to 76 % (ScD). There was no significant difference in mean ZEA removal among the viable yeast strains. Unviable cells showed ZEA detoxification ranging from 78 (ScE) to 86 % (ScD) (**Table 3**).

Comparing the ZEA removal (%) by the same *S. cerevisiae* strain, unviable cells of ScC and ScD strains showed higher ability ($p < 0.05$) than the viable cells. Other strains showed no significant difference ($p > 0.05$) in mean ZEA removal (%) between viable and heat inactivated cells.

4. Discussion

The biological control of toxigenic fungi is extensively studied. Several authors have studied the application of yeasts for antagonism of *Aspergillus carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. tubingensis*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium fujikuroi*, *F. graminearum*, *F. guttiforme* and *Penicillium digitatum* (Korres *et al.* 2011; Platania *et al.* 2012; Armando *et al.* 2013; Matic *et al.* 2014; Aloui *et al.* 2015; Pantelides *et al.* 2015; Parafati *et al.* 2015; Schisler *et al.* 2015; Zhu *et al.* 2015).

Walker *et al.* (1995) associated the antagonistic activity of yeast with the ability to synthesize killer toxins. However, other authors associated the antagonistic effect with the competition for nutrients (Armando *et al.* 2013).

The present study evaluated the potential of five *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from baker's yeast for *Fusarium graminearum* antagonism. The inhibition rate for *F. graminearum* FRS 26 ranged from 48 to 71 %, whereas for *F. graminearum* FSP 27 from 47 to 64 %. *F. graminearum* FRS 26 was more sensitive to differences in yeast cell concentration. These results were similar to those reported by Korres *et al.* (2011) who demonstrated that *Candida krusei* BT0701 inhibited 75.8 % of *Fusarium guttiforme* E-261 growth (resistant to a fungicide), while *Kloeckera apis* BT0703 showed 41.4 % inhibition of *F. guttiforme* E-261 growth. The *Saccharomyces cerevisiae* strains evaluated in this study (**Table 1** and **2**) were not as efficient as the *Saccharomyces cerevisiae* strain studied by Armando *et al.* (2013). *S. cerevisiae* RC016 completely inhibited *F. graminearum* growth in all conditions tested (water activity 0.95 and 0.99; pH 4 and 6; temperature 25 and 37 °C and oxygen availability normal and reduced (microaerophilia)) (Armando *et al.* 2013).

Evaluation of morphological changes can be applied for the study of antagonistic mechanism. Some yeasts with antagonistic potential can synthesize enzymes (glucanase, chitinase, and others) that cause morphological changes in hyphae (Janisiewicz and Korsten 2002). The scanning electron microscopy (SEM) analysis showed that *Saccharomyces cerevisiae* ScE caused defects on hyphae morphology of *F. graminearum* FSP 27 (**Figure 1 C**) such as thinner hyphae (**Figure 1 A**). The mycelia organization revealed by SEM also showed an extracellular material around the hyphae, resembling a biofilm. However, it was not possible to observe morphological changes in *Fusarium graminearum* FRS 26 mycelia of in the presence of yeast ScE. These results suggest that the antagonistic mechanism of yeast against the fungi is based on competition for nutrients. On the other hand, Korres *et al.* (2011) reported that yeasts *Kloeckera apis* BT0703 and *Candida krusei* BT0701 caused changes in *Fusarium guttiforme* hyphae and were able to adhere to the surface of the hyphae indicating that the mode of action was associated with hyperparasitaemia.

The application of fungicides is a key strategy for reducing pathogenic fungi, but the chemical control has serious drawback caused by increasing resistance of fungal pathogens and its use can be harmful to the environment, animal and human health (Medeiros *et al.* 2012; Wang *et al.* 2015). A potentially cleaner and safer alternative is the biological control using antagonistic microorganisms. Yeasts with potential antagonistic activity against the pathogen can be used as an alternative treatment to fungicides. Epiphytic yeasts are the major component of the microbiota on the surface of plants and they are easily adaptable to these ecosystems (Pantelides *et al.* 2015).

Some researchers have reported the application of yeast or yeast's cell wall for mycotoxin adsorption (Freimund *et al.* 2003; Fruhauf *et al.* 2012; Bordini *et al.* 2014).

The cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* is composed of two layers, comprising mainly mannoproteins, glucan (a β -1,3 and β -1,6 glucan polysaccharide) and chitin (a polymer of β -1,4 N-acetylglucosamine) bound by covalent bonds (Kogan and Kocher 2007; Shetty *et al.* 2007). The different ability of the yeast cell wall for mycotoxin adsorption is assigned to glucans present in its structure (Huwig *et al.* 2001). The interaction between ZEA and β -D-glucans occurs by stereochemical complementarity, involving Van Der Waals interactions. The hydroxyl and ketone groups of ZEA bind via hydrogen bonds, and other stable molecular forces, to the hydroxyl groups of the single helix structure of (1,3) β -D-glucan (Yiannikouris *et al.* 2003; Yiannikouris *et al.* 2004).

In this study, viable yeast cells showed ZEA adsorption ranging from 67 to 76 %, while unviable yeast cells from 78 to 86 % (Table 3). In all the tested *S. cerevisiae* strains, unviable yeast cells (heat treated at 121 °C for 15 min) showed higher detoxification rates than viable yeast cells, and there were significant differences for *S. cerevisiae*, ScC and ScD strains. This result reinforces the hypothesis that the ZEA removal from the medium does not occur by enzymatic degradation but by adsorption of the cell wall, since the heat treated cells were more efficient in removing ZEA. The heat treatment may have altered the conformation of the yeast cell wall, making the hydroxyl groups present in β -D-glucan, more available for the formation of toxin-glucan complex.

ZEA removal (%) was similar for those reported by Faucet-Marquis *et al.* (2014), but higher than those obtained by Armando *et al.* (2012) and Bordini *et al.*

(2014) (pure yeast cell wall). Faucet-Marquis *et al.* (2014) obtained maximum values of 75 % ZEA detoxification using 5 mg of yeast cell wall derivative (ZEA concentration of 20 µg/ml, at pH 5). Armando *et al.* (2012) evaluated the potential of *Saccharomyces cerevisiae* strains for ZEA detoxification and reported binding percentage ranging from 56.7 to 74.2 % at 0.5 µg/ml ZEA concentration. Bordini *et al.* (2014) evaluated ZEA adsorption capacity by a mixture of organic (yeast cell wall) and inorganic (activated charcoal) adsorbents. The adsorbent mixture at 75:25 ratio showed higher efficiency for ZEA adsorption (> 96.1 %) than the pure yeast cell wall (55.7 - 78.1 %).

This study showed that yeast strains isolated from baker's yeast can inhibit the growth of *Fusarium graminearum* and competition for nutrients was probably the major mechanism involved in antagonistic effect. All the *Saccharomyces cerevisiae* strains tested showed potential for *in vitro* ZEA removal. *Saccharomyces cerevisiae* is Generally Recognized as Safe (GRAS), therefore there is no risk for its application in food and feed. They can be applied for fungal growth, inhibition or can be included in a new product for animal feed, reducing economic losses and minimizing risk of ZEA carry-over to human food.

Acknowledgements

The authors thank CNPq and CAPES for financial support. The authors also thank the Coordination for the Improvement of Higher Education (CAPES-Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for granting a masters' scholarship and the Masters and Doctoral Program in Biotechnology of the State University of Londrina (Paraná , Brazil).

References

- ABIMILHO. Associação Brasileira das Indústrias do Milho. Estatísticas 2015.
available in: em <<http://www.abimilho.com.br/estatisticas>> accessed in October 2015.
- Aloui, H., Licciardello, F., Khwaldia, K., Hamdi, M., Restuccia, C. (2015) Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest greenmold caused by *Penicillium digitatum*. *International Journal of Food Microbiology*, **200**, 22–30.
- Altalhi, A. D., Deeb, B. (2009) Plasmid-mediated detoxification of mycotoxin zearalenone in *Pseudomonas* sp. ZEA-1. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, **161**, 1166–1172 .
- Armando, M.R., Pizzolitto R.P., Dogi, C.A., Cristofolini A., Merkis, C., Poloni, V., Dalcerro, A.M., Cavaglieri L.R. (2012) Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. *Journal of Applied Microbiology*, **113**, 256–264.
- Armando, M.R., Dogi, C.A., Poloni, V., Rosa, C.A.R., Dalcerro, A.M., Cavaglier, L.R. (2013) *In vitro* study on the effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Fusarium graminearum*. *International Journal of Food Microbiology*, **161**, 182–188.

Bordini, J. G., Borsato, D., Oliveira, A. S., Ono, M. A., Zaninelli, T. H., Hirooka, E. Y., Ono, E.Y.S. (2014) *In vitro* zearalenone adsorption by a mixture of organic and inorganic adsorbents application of the Box Behnken approach. *World Mycotoxin Journal*, **1**, 283-289, 2014.

Brazil. (2015) Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária - Dezembro de 2015, available in:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201503_publ_completa.pdf> accessed in January 2016.

Cavaglieri, L., Passone, A., Etcheverry, M. (2004) Screening procedures for selecting rhizobacteria with biocontrol effects upon *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production. *Research in Microbiology*, **155**, 747–754.

Chanchaichaovivat, A., Ruenwongsa, P., Panijpan, B. (2007) Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). *Biological Control*, **42**, 326–335, 2007.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. (2016) SAFRA 2015/2016 v.3, n.9 - Quarto Levantamento Janeiro/2016. available in

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_01_12_14_17_16_boletim_graos_janeiro_2016.pdf> accessed in January 2016.

Faucet-Marquis, V., Joannis-Cassan, C., Hadjeba-Medjdoub, K., Ballet, N., Pfohl-Leszkowicz, A. (2014) Development of an *in vitro* method for the prediction of mycotoxin binding on yeast-based products: case of aflatoxin B1, zearalenone and ochratoxin A. *Applied Microbiol Biotechnology*, 98, 7583–7596.

Ferrochio, L., Cendoya, E., Farnochi, M.C., Massad, W., Ramirez, M.L. (2013) Evaluation of ability of ferulic acid to control growth and fumonisin production of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on maize based media. *International Journal of Food Microbiology*, 167, 215-220.

Freimund, S., Sauter, M., Rys, P. (2003) Efficient Adsorption of the Mycotoxins Zearalenone and T-2 Toxin on a Modified Yeast Glucan Swiss. *Journal Of Environmental Science And Health*, B38, 243–255.

Fruhauf, S., Schwartz, H., Ottner, F., Krska, R., Vekiru, E. (2012) Yeast cell based feed additives: studies on aflatoxin B1 and zearalenone. *Food Additives and Contaminants*. 29, 217–231.

Huwig, A., Freimund, S., Kappeli, O., Dutler, H. (2001) Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*, 122, 179–188.

Janisiewicz W. J., Korsten L. (2002) Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review Phytopathology*, 40, 411- 441.

Joannis-Cassan, C., Tozlovanu, M., Hadjeba-Medjdoub, K., Ballet, N., Pfohl-Leszkowicz, A. (2011) Binding of Zearalenone, Aflatoxin B1, and Ochratoxin A by Yeast-Based Products: A Method for Quantification of Adsorption Performance. *Journal of Food Protection*, **74**, p. 1175–1185.

Kapetanakou, A. E., Kollias, J. N., Drosinos, E. H., Skandamis, P.N. (2012) Inhibition of *A. carbonarius* growth and reduction of ochratoxin A by bacteria and yeast composites of technological importance in culture media and beverages. *International Journal of Food Microbiology*, **152**, 91–99.

KUIPER, G. J.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B.; CORTON, C.; SAFE, S. H.; VAN DER SAAG, P. T. (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor b. *Endocrinology*, **139**, 4252–4263.

Kogan, G., Kocher, A. (2007) Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livestock Science*, **109**, 161–165.

Korres, A. M. N., Buss, D. S., Ventura, J. A., Fernandes, P. M. B. (2011) *Candida krusei* and *Kloeckera apis* inhibit the causal agent of pineapple fusariosis, *Fusarium guttiforme*. *Fungal Biology*, **115**, 1251- 1258.

Liu, J., Wisniewski, M., Droby, S., Vero, S., Tian, S., Hershkovitz, V. (2011) Glycine betaine improves oxidative stress tolerance and biocontrol efficacy of the antagonistic yeast *Cystofilobasidium infirmominiatu*. *International Journal of Food Microbiology*, **146**, 76–83.

Miguel, T. Á., Bordini, J. G., Saito, G. H., Andrade, C. G.T., Ono, M. A., Hirooka, E.Y., Vizoni, É., Ono, E Y.S. (2015) Effect of fungicide on *Fusarium verticillioides* mycelial morphology and fumonisin B1 production. *Brazilian Journal of Microbiology*, **46**, 293-299.

Matic, S., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M. L. (2014) Antagonistic yeasts and thermotherapy as seed treatments to control *Fusarium fujikuroi* on rice. *Biological Control*, **73**, 59–67.

Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V. (2013) Review Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, **60**, 218–237.

Medeiros, F. H. V., Martins, S. J., Zucchi, T. D., Melo, I. S., Batista, L. R., Machado, J. C. (2012) Review Biological Control Of Mycotoxin-Producing Molds. *Ciênc. agrotec*, **36**, 483-497.

Nally, M. C., Pesce, V. M., Maturano, Y. P., Muñoz, C. J., Combina M., Toro, M. E., Figuero, C., L. I., Vazqueza, F. (2012) Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. *Postharvest Biology and Technology* , **64**, 40–48.

Pantelides, I. S., Christou, O., Tsolakidou, M. D., Tsaltas, D., Ioannou, N. (2015) Isolation, identification and *in vitro* screening of grapevine yeasts for the control of black aspergilli on grapes. *Biological Control*, **88**, 46–53.

Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., Cirvilleri, G. (2015) Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*, **47**, 85-92.

Platania, C., Restuccia, C., Muccilli, S., Cirvilleri, G. (2012) Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). *Food Microbiology*, **30**, 219-225.

Sabater-Vilar, M., Malekinejad, H., Selman, M.H.J., Doelen M.A.M., Fink-Gremmels, J. (2007) *In vitro* assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone micotoxins. *Mycopathologia*, **163**, 81–90.

SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. (2014) DERAL - Departamento de Economia Rural . Milho Paranense - Safra 2013/14, available in <www.agricultura.pr.gov.br_arquivos_File_deral_Prognosticos_milho_2013_14> accessed in June 2014.

SEAB (2015a) – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento DERAL - Departamento de Economia Rural, Suinocultura Paranaense, available in <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/suinocultura/11_novembro_informe_suinos_completo_15.pdf> accessed in January 2016.

SEAB (2015b) – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento DERAL - Departamento de Economia Rural, Suinocultura Paranaense, available in <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/suinocultura/11_novembro_informe_suinos_completo_15.pdf> accessed in January 2016.

Shetty, P. H., Hald, B., Jespersen, L. (2007) Surface binding of aflatoxin B1 by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*, **113**, 41–46.

Schisler, D. A., Boehm, M. J., Paul, P. A., Rooney, A. P., Dunlap, C. A. (2015) Reduction of Fusarium head blight using prothioconazole and prothioconazole-tolerant variants of the Fusarium head blight antagonist *Cryptococcus flaveszens* OH 182.9. *Biological Control*, **86**, 36–45.

Velluti, A., Marín, S., Gonzalez, P., Ramos, A. J., Sanchis V. (2004) Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* on maize-based agar media. *Food Microbiology*, **21**, 649–656.

Walker, G. M., Mcleod A. H., Hodgson, V. J. (1995) Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, **127**, 213-222.

Wang, L. Y., Xie, Y. S., Cui, Y. Y., Xu, J., He, W., Chen, H. G., Guo, J. H. (2015) Conjunctively screening of biocontrol agents (BCAs) against fusarium root rot and

fusarium head blight caused by *Fusarium graminearum*. *Microbiological Research*, **177**, 34–42.

Yiannikouris, A., Poughon, L., Cameleyre, X., Dussap, C. G., François, J., Bertin G., Jouany, J. P. (2003) A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. *Biotechnology Letters*, **25**, 783–789.

Yiannikouris, A., Francois, J., Poughon, L., Dussap, C. G., Jeminet, G., Bertin, G., et al (2004). Influence of pH on complexing of model β -D-glucans with zearalenone. *Journal of Food Protection*, **67**, 2741–2746.

Zhao, Y., Selvaraj, J. N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Song, H., Tan, X., Sun, L., Sangare, L., Folly, Y. M. E., Liu, Y. (2014) Antagonistic Action of *Bacillus subtilis* Strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PLOS ONE*, **9**, 1-11.

Zhu, C., Shi, J., Jiang, C., Liu, Y. (2015) Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* *in vitro* and *in vivo* through antagonistic yeasts. *Food Control*, **50**, 125-132.

Zinedine, A., Soriano, J. M., Molto, J. C., Mañes, J. (2007) Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin . *Food and Chemical Toxicology*, **45**, 1–18.

Table 1: Inhibition ratio (%) of yeast strains at different cell concentrations against *F. graminearum* FRS 26.

Yeast strains	Cell concentration (cell/ml)		
	10^5	10^6	10^7
	Inhibition ratio (%)		
ScA	53 ^{a b C}	59 ^{a b c B}	71 ^{a A}
ScB	51 ^{a b B}	64 ^{a A}	70 ^{a A}
ScC	52 ^{a b B}	54 ^{c d B}	70 ^{a A}
ScD	48 ^{b B}	52 ^{d B}	71 ^{a A}
ScE	56 ^{a B}	57 ^{b c B}	71 ^{a A}

* Means followed by a different lowercase letter in the same column are significantly different by the Tukey test ($p < 0.05$) for each yeast strain.

* Means followed by uppercase different letter in the same line are significantly different by the Tukey test ($p < 0.05$) between the three cell concentrations of the same yeast strain.

Table 2: Inhibition ratio (%) of yeast strains at different cell concentrations against *F. graminearum* FSP 27.

Yeast strain	Cell concentration (cell/ml)		
	10^5	10^6	10^7
	Inhibition ratio (%)		
ScA	54 ^{abA}	56 ^{aA}	64 ^{aA}
ScB	51 ^{dB}	53 ^{aA}	59 ^{aA}
ScC	49 ^{bcdA}	53 ^{aA}	59 ^{aA}
ScD	47 ^{cdB}	56 ^{aAB}	59 ^{aA}
ScE	57 ^{aA}	58 ^{aA}	59 ^{aA}

* Means followed by a different lowercase letter in the same column are significantly different by the Tukey test ($p < 0.05$) for each yeast strain.

* Means followed by uppercase different letter in the same line are significantly different by the Tukey test ($p < 0.05$) between the three cell concentrations of the same yeast strain.

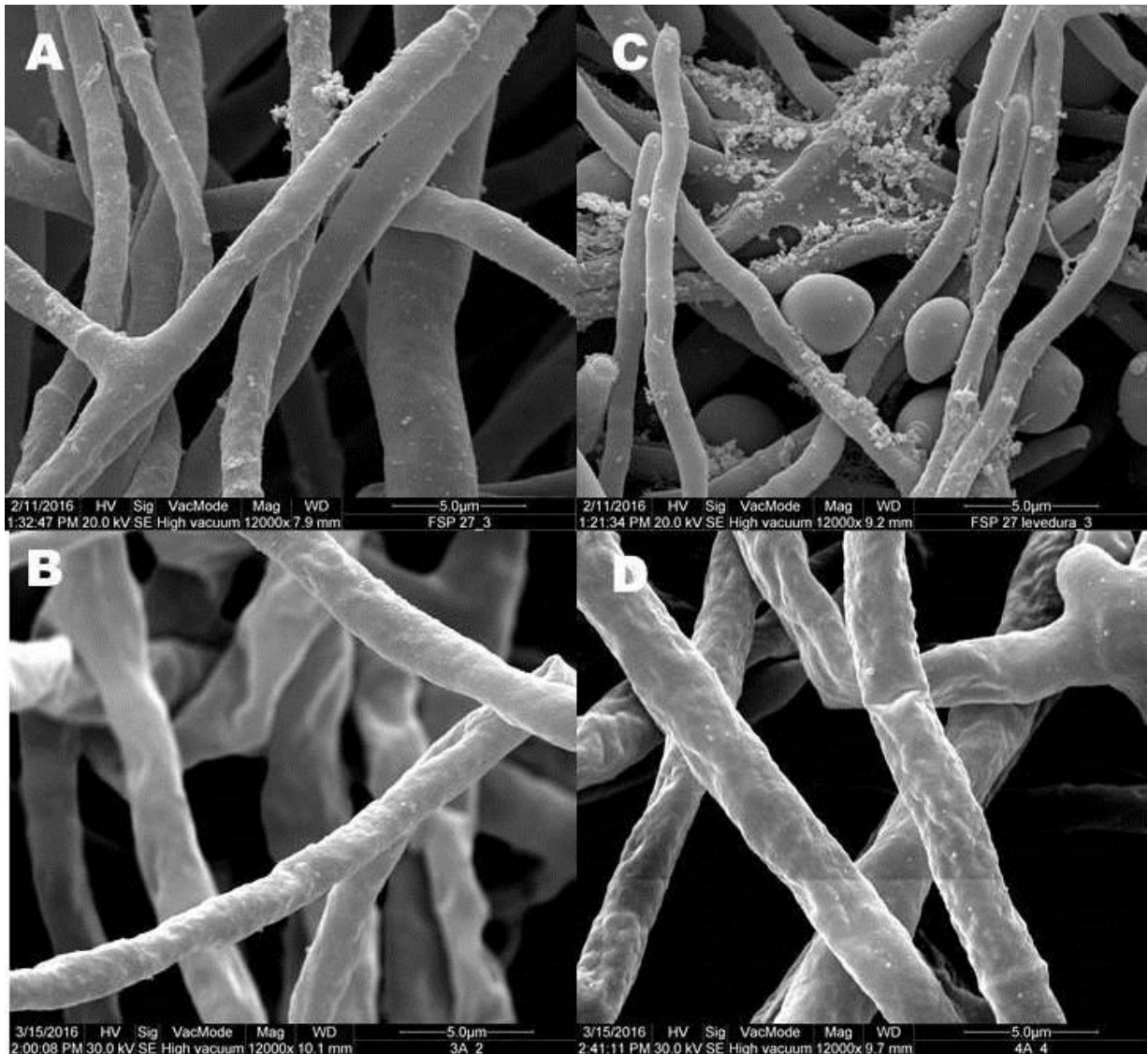


Figure 1: Electron micrographs of *F. graminearum* mycelia FSP 27 and FRS 26 on 5th day incubation at 25 °C on the absence (control) - A (*F. graminearum* FSP 27) and B (*F. graminearum* FRS 26), and presence (treatment) - C (*F. graminearum* FSP 27) and D (*F. graminearum* FRS 26) of ScE yeast strains.

Table 3: *In vitro* ZEA removal (%) by viable and unviable yeast cells (10^8 cells/ml) at the same ZEA concentration (500 ng/mL).

Yeast strains	% ZEA removal	
	Viable cells	Unviable cells**
ScA	76 ^{a A}	82 ^{a b A}
ScB	76 ^{a A}	80 ^{a b A}
ScC	76 ^{a B}	85 ^{a b A}
ScD	71 ^{a B}	86 ^{a A}
ScE	67 ^{a A}	78 ^{b A}

* Means followed by a different lowercase letter in the same column are significantly different by the Tukey test ($p < 0.05$) for each yeast strain.

* Means followed by uppercase different letter in the same line are significantly different by the t test ($p < 0.05$)

** Unviable cells: heat treatment (121 °C for 15 min).

REFERÊNCIAS

- ABIMILHO. Associação Brasileira das Indústrias do Milho. Estatísticas 2015. Disponível em <<http://www.abimilho.com.br/estatisticas>> acessado em outubro de 2015.
- ALMEIDA, I.; MARTINS, H. M.; SANTOS, S.; COSTA, J. M.; BERNARDO, F. Co-occurrence of mycotoxins in swine feed produced in Portugal. **Mycotoxin Research** v. 27, p. 177–181, 2011.
- ALTALHI, A. D. Plasmid-mediated detoxification of mycotoxin zearalenone in *Pseudomonas* sp. ZEA-1. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 3, 2007.
- ALDANA, J. R. SILVA, L. J.G.; PENA, A.; MAÑES, J.; LINO, C. M. Occurrence and risk assessment of zearalenone in flours from Portuguese and Dutch markets. **Food Control**, v.45, p.51-55, 2014.
- ARMANDO, M.R.; PIZZOLITTO R.P.; DOGI, C.A.; CRISTOFOLINI A.; MERKIS, C.; POLONI, V.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI L.R. Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, p. 256–264, 2012.
- ARMANDO, M. R.; DOGI, C. A.; POLONI, V.; ROSA, C. A. R.; DALCERO, A. M.; CAVAGLIER, L. R. *In vitro* study on the effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Fusarium graminearum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, p. 182–188, 2013.
- BATA, A.; LÁSZTITY, R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. **Trends in Food Science & Technology**, v.10, p.223-228, 1999.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 497–516 2003.

BEYER, M.; VERREET, J. A.; RAGAB, W. S. M. Effect of relative humidity on germination of ascospores and macroconidia of *Gibberella zeae* and deoxynivalenol production. **International Journal of Food Microbiology**, v.98, p. 233–240, 2005.

BIEHL, M. L.; PRELUSKY, D. B.; KORITZ, G. D.; HARTIN, K. E.; BUCK, W. B.; TRENHOLM, H. L. Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.121, p. 152–159. 1993.

BORDINI, J. G.; BORSATO, D.; OLIVEIRA, A. S.; ONO, M. A.; ZANINELLI, T. H.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E.Y.S. *In vitro* zearalenone adsorption by a mixture of organic and inorganic adsorbents application of the Box Behnken approach. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, p. 283-289, 2014.

BRASIL. Resolução - RDC No- 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Diário Oficial da União**, nº 46, p. 66-67, 2011.

BRAVIN, F.; DUCA, R. C.; BALAGUER, P.; DELAFORGE, M. *In Vitro* Cytochrome P450 Formation of a Mono-Hydroxylated Metabolite of Zearalenone Exhibiting Estrogenic Activities: Possible Occurrence of This Metabolite *in vivo*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 1824–1837 2009.

BRIONES-REYES, D.; GÓMEZ-MARTINEZ, L.; CUEVA-ROLÓN, R. Zearalenone contamination in corn for human consumption in the state of Tlaxcala, Mexico . **Food Chemistry**, v. 100, p. 693–698, 2007.

CANO-SANCHO, G.; MARIN S.; RAMOS, A.J.; SANCHIS V. Occurrence of zearalenone, an oestrogenic mycotoxin, in Catalonia (Spain) and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p.835–839, 2012.

CHANCHAICHAOVIVAT, A. RUENWONGSA, P. PANIJPAN, B. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). **Biological Control**, v.42, p. 326–335, 2007.

CHEN, W.; HAN, Y.; JONG, S.; CHANG, S. Isolation, purification, and characterization of a *killer* protein from *Schwanniomyces occidentalis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p. 5348-5352, 2000.

CERVERÓ, M. C.; CASTILLO, M. Á.; MONTES, R.; HERNÁNDEZ, E. Determination of trichothecenes, zearalenone and zearalenols in commercially available corn-based foods in Spain. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, p. 52-55, 2007.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. SAFRA 2015/2016 v.3, n.9 - Quarto Levantamento Janeiro/2016. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_01_12_14_17_16_boletim_graos_janeiro_2016.pdf> acessado em janeiro de 2016.

COLLINS, T. F. X.; SPRANDO, R. L.; BLACK, T. N. Effects of aminopentol on in utero development in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 161–169, 2006.

DUCA, R. C.; MABONDZO, A.; BRAVIN, F.; DELAFORGE, M. *In vivo* effects of zearalenone on the expression of proteins involved in the detoxification of rat xenobiotics. **Environmental Toxicology**, v. 27, p. 98 – 108. 2010.

FANDOHAN, P.; GNONLONFINA, B.; HELLB, K.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, M. J. Natural occurrence of *Fusarium* and subsequent fumonisin contamination in preharvest and stored maize in Benin, West Africa. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 173-183, 2005.

FAUCET-MARQUIS, V.; JOANNIS-CASSAN, C.; HADJEBA-MEDJDOUB, K.; BALLEST, N.; PFOHL-LESZKOWICZ, A. Development of an *in vitro* method for the prediction of mycotoxin binding on yeast-based products: case of aflatoxin B₁, zearalenone and ochratoxin A. **Applied Microbiol Biotechnology**, v. 98, p. 7583–7596, 2014.

FERROCHIO, L.; CENDOYA, E.; FARNOCHI, M. C.; MASSAD, W.; RAMIREZ, M. L. Evaluation of ability of ferulic acid to control growth and fumonisin production of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on maize based media.

International Journal of Food Microbiology, v.167, p.215-220, 2013.

FREIMUND, S.; SAUTER, M.; RYS, P. Efficient Adsorption of the Mycotoxins Zearalenone and T-2 Toxin on a Modified Yeast Glucan. **Journal of Environmental Science And Health**, v. B38, n. 3, p. 243–255, 2003.

FRUHAUF, S.; SCHWARTZ, H.; OTTNER, F.; KRŠKA, R.; VEKIRU, E. Yeast cell based feed additives: studies on aflatoxin B₁ and zearalenone. **Food Additives and Contaminants**, v. 29, n. 2, p. 217–231 2012.

GAFFOOR, I.; TRAIL, F. Characterization of Two Polyketide Synthase Genes Involved in Zearalenone Biosynthesis in *Gibberella zeae*. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 72, p. 1793–1799, 2006.

GAJECKI, M.; PRZYBYLOWICZ, M.; ZIELONKA, Q.; ZWIERZCHOWSKI, W.; OBREMSKI, K.; SKORKA-WYSZYNSKA, E.; GAJECKA, M.; POLAK, M.; JAKIMIUK, E. Preliminary results of monitoring research over zearalenone presence in blond of women with neoplastic lesions in reproductive system. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 7, p. 153–146, 2004.

GENG, Z.; ZHU, W.; SU, H.; ZHAO, Y.; ZHANG, K.-Q.; YANG, J. Recent advances in genes involved in secondary metabolite synthesis, hyphal development, energy metabolism and pathogenicity in *Fusarium graminearum* (teleomorph *Gibberella zeae*). **Biotechnology Advances**, v. 32, p.390–402, 2014.

GLENN, A.E. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 213-240, 2007.

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

HUWIG, A.; FREIMUND, S.; KAPPELI, O.; DUTLER, H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, v. 122, p. 179–188, 2001.

HUUSKONEN, P.; AURIOLA, S.; PASANEN, M. Zearalenone metabolism in human placental subcellular organelles, JEG-3 cells, and recombinant CYP19A1. **Placenta**, v. 36, p. 1052-1055, 2015.

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas Em Alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 7, p.138-161, 2010.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia e Qualidade Industrial. DOQ-CGRE-008. **Orientações sobre validação de métodos e ensaios químicos**. Revisão julho/2007.

IQBAL, S. Z.; ASI, M. R.; JINAP, S., RASHID, U. Detection of aflatoxins and zearalenone contamination in wheat derived products. **Food Control**, v. 35, p. 223-226, 2014 a.

IQBAL, S. Z.; RABBANI, T.; ASI, M. R.; JINAP, S. Assessment of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals. **Food Chemistry**, v. 157, p. 257–262, 2014 b.

JOANNIS-CASSAN, C.; TOZLOVANU, M.; HADJEBBA-MEDJDOUB, K.; BALLEST, N.; PFOHL-LESZKOWICZ, A. Binding of Zearalenone, Aflatoxin B1, and Ochratoxin A by Yeast-Based Products: A Method for Quantification of Adsorption Performance. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 7, p. 1175–1185, 2011.

JOUANY, J. P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal feed science and technology**. v.137, n. 3, p. 342-362, 2007.

KAPETANAKOU, A. E.; KOLLIAS, J. N.; DROSINOS, E. H. ; SKANDAMIS, P. N. Inhibition of *A. carbonarius* growth and reduction of ochratoxin A by bacteria and yeast composites of technological importance in culture media and beverages.

International Journal of Food Microbiology, v. 152, p. 91–99, 2012.

KAWASHIMA, L. M. ; VALENTE-SOARES, L. M. incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho.

Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 26, p. 516-521, 2006.

KIM, Y. T.; LEE, Y. R.; JIN, J.; et al., Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. **Molecular Microbiology** , v. 58, p. 1102–1113, 2005.

KÖHL, J.; LOMBAERS, C.; MORETTI, A.; BANDYOPADHYAY, R.; SOMMA, S.; KASTELEIN, P. Analysis of microbial taxonomical groups present in maize stalks suppressive to colonization by toxigenic *Fusarium* spp.: A strategy for the identification of potential antagonists. **Biological Control**, v. 83, p. 20–28, 2015.

KORRES, A. M. N.; BUSS, D. S.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. *Candida krusei* and *Kloeckera apis* inhibit the causal agent of pineapple fusariosis, *Fusarium guttiforme*. **Fungal Biology**, v. 115, p. 1251- 1258, 2011.

KOGAN, G.; KOCHER, A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. **Livestock Science**, v. 109, p. 161–165, 2007.

KUIPER-GODMAN, T.; SCOTT, P. M.; WATANABE, H. Risk Assessment of the Mycotoxin Zearalenone. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, v. 7, p. 253-306, 1987.

KUIPER, G. J.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B.; CORTON, C.; SAFE, S. H.; VAN DER SAAG, P. T. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor b. **Endocrinology**, v.139, p. 4252–4263, 1998.

LIU, J.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.; VERO, S.; TIAN, S.; HERSHKOVITZ, V. Glycine betaine improves oxidative stress tolerance and biocontrol efficacy of the antagonistic yeast *Cystofilobasidium infirmominiatu*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p.76–83, 2011.

LIU, G. L.; WANG, K.; HUA, M. X.; BUZDAR, M. A.; CHI, Z. M. Purification and characterization of the cold-active killer toxin from the psychrotolerant yeast *Mrakia frigida* isolated from sea sediments in Antarctica. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 822–827, 2012.

LOWES, K. F.; SHEARMAN, C. A.; PAYNE, J.; MACKENZIE, D.; ARCHER, D. B.; MERRY, R. J.; GASSON, M. J. Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1066–1076, 2000.

LUONGO, D.; SEVERINO, L.; BERGAMO, P.; DE LUNA, R.; LUCISANO, A.; ROSSI, M. Interactive effects of fumonisin B1 and a-zearalenol on proliferation and cytokine expression in jurkat T cells. **Toxicology in Vitro**, v. 20, p. 1403–1410, 2006.

MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. Fisiologia do Milho. **Circular Técnica**, 22- Embrapa milho e sorgo: Sete Lagoas, MG. Dezembro de 2002.

MAAROUFI, K.; CHEKIR, L.; CREPPY, E.E.; ELLOUZ, F.; BACHA, H. Zearalenone induces modifications of haematological and biochemical parameters in rats. **Toxicon**, v. 34, p. 535–540, 1996.

MATIC, S.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Antagonistic yeasts and thermotherapy as seed treatments to control *Fusarium fujikuroi* on rice. **Biological Control**, v. 73, p. 59–67, 2014.

MARIN, D. E.; PISTOL, G. C.; NEAGOE, I. V.; CALIN, L.; TARANU, I. Effects of zearalenone on oxidative stress and inflammation in weanling piglets. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 408–415, 2013.

MARIN, D. E.; TARANU, I.; BURLACU, R.; TUDOR, D. S. Effects of zearalenone and its derivatives on the innate immune response of swine. **Toxicon**, v. 56, p. 956–963, 2010.

MARIN, S.; RAMOS, A. J.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS, V. *Review* Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 218–237, 2013.

MEDEIROS, F. H. V.; MARTINS, S. J.; ZUCCHI, T. D.; MELO, I. S.; BATISTA, L. R.; MACHADO, J. C. *Review* Biological Control Of Mycotoxin-Producing Molds. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 5, p. 483-497, 2012.

MIKSICEK, R.J. Interaction of naturally occurring non-steroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v. 49, p. 153–160, 1994.

MIGUEL, T. Á.; BORDINI, J. G.; SAITO, GERVÁSI. H.; ANDRADE C. G.T.; ONO, M. A.; HIROOKA, E.Y.; VIZONI, É.; ONO, E Y.S. Effect of fungicide on *Fusarium verticillioides* mycelial morphology and fumonisin B1 production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 293-299, 2015.

MOLINA-MOLINA, J.M.; REAL, M.; JIMENEZ-DIAZ, I.; BELHASSEN, H.; HEDHILI, A.; TORNÉ, P.; e, FERNÁNDEZ, M. F.; OLEA N. Assessment of estrogenic and anti-androgenic activities of the mycotoxin zearalenone and its metabolites using *in vitro* receptor-specific bioassays. **Food and Chemical Toxicology**, v. 74, p. 233-239, 2014.

NALLY, M. C.; PESCE, V.M.; MATURANO, Y.P.; MUÑOZ, C.J.; COMBINA M.; TORO, M.E.; CASTELLANOS DE FIGUERO, L.I.; VAZQUEZA, F. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. **Postharvest Biology and Technology** , v. 64, p. 40–48, 2012.

NURYONO, N.; NOVIANDI, C.T.; BÖHM, J.; RAZZAZI-FAZELI, E. A limited survey of zearalenone in Indonesian maize-based food and feed by ELISA and high performance liquid chromatography. **Food Control**, v. 16, p. 65–71, 2005.

OLIVEIRA, G. R.; RIBEIRO, J. M.; FRAGA M. E.; CAVAGLIERI, L. R.; DIREITO, G. M.; KELLER K. M.; DALCERO, A. M.; ROSA, C. A. Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 162, p. 355–362, 2006.

OSBORNE, L. E.; STEIN, J.M. Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. **International Journal of Food Microbiology**, v. 8, p.119-103, 2007.

OLSEN, M.; PETTERSSON, H.; SANDHOLM, K.; VISCONTI, A.; KIESSLING, K. H. Metabolism of zearalenone by sow intestinal mucosa *in vitro*. **Food Chem. Toxic.** v. 25, p. 681-683, 1987.

PAES, M. C. D. Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 6p. (Informe Técnico).

PFEIFFER, E.; HEYTING, A.; METZLER, M. Novel oxidative metabolites of the mycoestrogen zearalenone *in vitro*. **Molecular Nutrition and Food Research.**, v. 51, p. 867-871, 2007.

PLACINTA, C. M.; D'MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology** v. 78, p. 21-37, 1999.

POLONELLI, L. et al. Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 17, n. 5, p. 774-780, 1983.

QUEIROZ, V. A. V.; ALVES, G. L. O.; CONCEIÇÃO, R. R. P.; GUIMARÃES, L. J. M.; MENDES, S. M.; RIBEIRO, P. E. A.; COSTA, R. V. Occurrence of fumonisins and zearalenone in maize stored in family farm in Minas Gerais, Brazil. **Food Control**, v. 28, p. 83-86, 2012.

SABATER-VILAR, M.; MALEKINEJAD, H.; SELMAN, M.H.J.; DOELEN M.A.M.; FINK-GREMMELS, J. *In vitro* assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone micotoxins. **Mycopathologia**, v. 163, p. 81–90, 2007.

SASSAHARA, M.; YANAKA, E. K.; NETTO, D. P. Ocorrência de aflatoxina e zearalenona em alimentos destinados ao gado leiteiro na Região Norte do Estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, p. 63-72, 2003.

SATO, H. H.; PASTORE, G. M.; PARK, Y. K. Study of some characteristics of newly isolated *killer* yeast. **Revista de Microbiologia**, v.24, p.71-72, 1993.

SCHISLER, D. A.; BOEHM, M. J.; PAUL, P. A.; ROONEY, A. P.; DUNLAP, C. A. Reduction of Fusarium head blight using prothioconazole and prothioconazole-tolerant variants of the Fusarium head blight antagonist *Cryptococcus flavescens* OH 182.9. **Biological Control**, v. 86, p. 36–45, 2015.

SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. DERAL - Departamento de Economia Rural . Milho Paranaense - Safra 2013/14. <www.agricultura.pr.gov.br_arquivos_File_deral_Prognosticos_milho_2013_14> acessado em junho de 2014.

SEAB (a) – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. DERAL - Departamento de Economia Rural . Milho Paranaense - Safra 2015/16. <<http://www.agricultura.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=240>> acessado em janeiro de 2016.

SEAB (b) – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento DERAL - Departamento de Economia Rural, Suinocultura Paranaense, disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/suinocultura/11_novembro_informe_suinos_completo_15.pdf> acessado em janeiro de 2016.

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

SHIER, W. T.; SIER, A. C., XIE, W.; MIROCHA, C. J. Structure activity relationships for human oestrogenic activity in zearalenone mycotoxins. **Toxicon**, v. 39, p. 1435–1438, 2001.

STOPA, E.; GAJE, M.; BABINSKA, I.; ZIELONKA, L.; GAJEŃKI, M. The effect of experimental exposure to low doses of zearalenone on uterine histology and morphometry in prepubertal bitches. **Theriogenology**, v. 82, p. 537–545, 2014.

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

RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 3–10, 2007.

RUBERT, J.; LEÓN, R.; SÁEZ, C.; MARTINS, C. P.B.; GODULA, M.; YUSÀ, V.; MAÑES, J.; SORIANO, J. M.; SOLER, C. Evaluation of mycotoxins and their metabolites in human breast milk using liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 820, p. 39–46, 2014.

TATAY, E.; MECA, G.; FONT, G.; RUIZ, M.J. Interactive effects of zearalenone and its metabolites on cytotoxicity and metabolization in ovarian CHO-K1 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 28, p. 95–103, 2014.

TARANU, I.; BRAICU, C.; MARIN, D. E.; PISTOL, G. C.; MOTIU, M.; BALACESCU, L.; NEAGOE, I. B.; BURLACU, R. Exposure to zearalenone mycotoxin alters in vitro porcine intestinal epithelial cells by differential gene expression. **Toxicology Letters**, v. 232, p. 310–325, 2015.

TIEMANN, U.; BRÜSSOW, K.P.; KÜCHENMEISTER, U.; JONAS, L.; PÖHLAND, R.; REISCHAUER, A.; JÄGER, K.; DÄNICKE, S. Changes in the spleen and liver of pregnant sows and full-term piglets after feeding diets naturally contaminated with deoxynivalenol and zearalenone. **The Veterinary Journal**, v.176, p. 188–196, 2008.

TOMASEVIC-CANOVIC, M.; DAKOVIC, A.; ROTTINGHAUS, G.; MATIJASEVIC, S.; DURICIC, M. Surfactant modified zeolites—new efficient adsorbents for mycotoxins. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 61, p. 173–180, 2003.

TRAIL, F.; GAFFOOR, I.; VOGEL, S. Ejection mechanics and trajectory of the ascospores of *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, p. 528–533, 2005.

TRALAMAZZA, S. M.; BEMVENUTI, R. H.; ZORZETE, P.; GARCIA, F. S.; BENEDITO C. Fungal diversity and natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in freshly harvested wheat grains from Brazil. **Food Chemistry**, v. 196, p. 445–450, 2016.

UNIÃO EUROPEIA <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.2007.255.01.0014.01.POR> acessado em 20.11.2014

VILLALBA, M. L.; SÁEZ, J. S.; MONACO, S. D.; LOPES, C. A.; SANGORRÍN, M. P. TdKT, a new killer toxin produced by *Torulaspota delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 217, p. 94–100, 2016.

YIANNIKOURIS, A.; POUGHON, L.; CAMELEYRE, X.; DUSSAP, C. G.; FRANÇOIS, J.; BERTIN G.; JOUANY, J. P. A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 783–789, 2003.

YIANNIKOURIS, A.; FRANCOIS, J.; POUGHON, L.; DUSSAP, C. G.; JEMINET, G.; BERTIN, G. Influence of pH on complexing of model β -D-glucans with zearalenone. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 2741–2746, 2004.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, p.129–144, 2011.

ZATECKA, E.; DED, L.; ELZEINOVA, F.; KUBATOVA, A.; DOROSH, A.; MARGARYAN, H.; DOSTALOVA, P.; KORENKOVA, V.; HOSKOVA, K.; PEKNICOVA, J. Effect of zearalenone on reproductive parameters and expression of selected testicular genes in mice. **Reproductive Toxicology** . v. 45, p. 20–30 2014.

ZHAO, Y.; SELVARAJ, J. N.; XING, F.; ZHOU, L.; WANG, Y.; SONG, H.; TAN, X.; SUN, L.; SANGARE, L.; FOLLY, Y. M. E.; LIU, Y. Antagonistic Action of *Bacillus subtilis* Strain SG6 on *Fusarium graminearum*. **PLOS ONE**, v. 9, p. 1-11, 2014.

ZINEDINE, A.; SORIANO, J. M.; MOLTO, J. C., MAÑES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1–18, 2007.