



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TALITA SZLAPAK FRANCO

**BACTÉRIAS LÁTICAS NO BIOCONTROLE DE *Fusarium*
graminearum E NA DETOXIFICAÇÃO DE
DESOXINIVALENOL**

Londrina
2010

TALITA SZLAPAK FRANCO

**BACTÉRIAS LÁTICAS NO BIOCONTROLE DE *Fusarium*
graminearum E NA DETOXIFICAÇÃO DE
DESOXINIVALENOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Dra. Sandra Garcia.

Londrina
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F825b Franco, Talita Szlapak
Bactérias lácticas no biocontrole de *Fusarium graminearum*
e na detoxificação de deoxinifalenol / Talita Szlapak Franco –
Londrina, 2010
108 f. : il.

Orientadora: Sandra Garcia
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina.
Programa de pós-graduação em Ciência de Alimentos. Londrina,
2010
Inclui bibliografia

1. Descontaminação. 2. Atividade antifúngica. 3. Lactobacillus.
I. Universidade Estadual de Londrina. Programa de pós-graduação
em Ciência de Alimentos. II. Título

CDD 664.001579

Catálogo na fonte: Iuri Daudt Rodrigues -CRB-9/1657

TALITA SZLPAK FRANCO

**BACTÉRIAS LÁTICAS NO BIOCONTROLE DE *Fusarium graminearum*
E NA DETOXIFICAÇÃO DE DESOXINIVALENOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dr^ª Sandra Garcia
UEL – Londrina – PR

Prof^ª Dr^ª Elisa Yoko Hirooka
UEL – Londrina – PR

Prof^ª Dr^ª Margarida Masami Yamaguchi
UTFPR – Londrina – PR

Londrina, 07 de Outubro de 2010.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho primeiramente
a Deus pela dádiva da vida e pelas oportunidades ofertadas.
Aos meus pais José Ari (sempre presente) e Marizete pelo amor incondicional,
exemplo de vida, determinação, garra e coragem, por sempre
primarem pela educação e por incentivarem para que eu alcançasse meus sonhos.
Ao meu esposo Guilherme por todo o amor, carinho, paciência e compreensão.
Ao meu irmão Gustavo pelo amor e pelos momentos de alegria e descontração.*

AGRADECIMENTOS

A Professora Dra. Sandra Garcia pela amizade, orientação, incentivo, calma e compreensão nas horas mais difíceis, bem como toda a atenção e carinho.

A Professora Dra. Elisa Yoko Hirooka pela oportunidade oferecida, pelo exemplo em dedicação a Pesquisa bem como a chance de participar do grupo de pesquisa.

À Universidade Estadual de Londrina e aos professores e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos pelos ensinamentos e colaboração durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

Aos companheiros de laboratório, especialmente os de Microbiologia que sempre tornaram o convívio muito animado, transformando assim em momentos alegres as horas duras de trabalho.

Aos colegas da Turma de Mestrado 2008 pela troca de experiências e conhecimentos.

A Joice pelos ensinamentos repassados e pelo auxílio nas etapas mais complicadas deste trabalho.

As minhas florzinhas amadas (Beatriz C. Bolanho, Débora R. Ferreira, Flávia D. Montanucci, Patrícia S. Garcia) que estavam comigo nas horas mais difíceis, nos momentos onde tudo dava errado e que me deram suporte, ânimo e força. Pelos nossos momentos de descontração e de desespero em grupo, por partilharmos juntas essa etapa marcante nas nossas vidas e principalmente pelos laços de amizade que se intensificam a cada dia.

A CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado.

E a todos que de alguma forma contribuíram com o andamento e finalização desse projeto.

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

Leonardo da Vinci.

FRANCO, Talita Szlapak. **Bactérias lácticas no biocontrole de *Fusarium graminearum* e na detoxificação de desoxinivalenol**. 2010. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

Os prejuízos causados pela contaminação de alimentos por *Fusarium graminearum* e o perigo que micotoxinas como desoxinivalenol apresentam a seres humanos e animais, tornam constante a procura por métodos que visam o controle da contaminação fúngica, bem como a detoxificação de micotoxinas. Por sua habilidade de produção de compostos com atividade antifúngica aliada a capacidade de detoxificação, as bactérias lácticas constituem uma alternativa promissora para a descontaminação de alimentos por métodos biológicos. O objetivo principal deste trabalho foi o de avaliar a atividade antifúngica e a capacidade de descontaminação da micotoxina desoxinivalenol em meio líquido por cepas de bactérias lácticas comerciais e isoladas. As bactérias lácticas presentes em amostras de grãos de trigo, germen de trigo, farelo de trigo, farinha de trigo para quibe, farinha de trigo branca e integral, grãos de kefir e sourdough foram avaliadas através da contagem em placas por semeadura em profundidade. Kefir seguido de sourdough apresentaram maiores contagens ($8,89 \pm 0,02$ e $6,77 \pm 0,02$ log UFC. g⁻¹) que os produtos derivados do trigo (entre $3,06 \pm 0,04$ e $3,78 \pm 0,02$ log UFC. g⁻¹) e os grãos de trigo, a menor contagem ($2,05 \pm 0,03$ log UFC. g⁻¹). Cepas isoladas destes produtos foram identificadas através do kit API 50 CH[®] e juntamente às culturas de bactérias lácticas comerciais, tiveram sua atividade antifúngica frente a *F. graminearum* IAPAR2218 avaliada pelo método de difusão em Agar. Todas apresentaram inibição ao crescimento fúngico com diâmetros de halos que variaram entre 13 ± 2 a 47 ± 2 mm, sendo a cultura Lyofast LPRA, Sacco (*L. plantarum* e *L. rhamnosus*), a responsável pela maior atividade e a Yo flex YC-180, Chr. Hansen (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*) pela menor inibição. A variação de pH, a concentração do meio de cultura e a ação dos ácidos láctico e acético não exerceram qualquer inibição sobre o fungo testado, indicando que a atividade antifúngica ocorreu por ação de outros agentes. Todas as cepas testadas na presença da micotoxina demonstraram potencial para a diminuição de desoxinivalenol em meio líquido, apresentando taxas de redução que variaram de 16,41% para células viáveis de *L. plantarum* FB VII a 71,19% para a cultura Lyofast BG 112 (*L. plantarum*), inviabilizadas por esterilização. De uma maneira geral, as células inviabilizadas por esterilização apresentaram maiores percentuais de descontaminação que as inviabilizadas por pasteurização, sendo as células viáveis as que apresentaram as menores taxas, indicando que o mecanismo de detoxificação seja melhor explicado pela captura da micotoxina pela parede celular das bactérias, do que pela degradação pelo metabolismo microbiano. Todas as cepas estudadas apresentaram atividade antifúngica e capacidade de descontaminação de DON em meio líquido, podendo ser utilizadas em futuras pesquisas para suas aplicações a nível comercial.

Palavras-chave: Lactobacillus. Atividade antifúngica. Descontaminação. Micotoxina. DON.

FRANCO, Talita Szlapak. **Lactic acid bacteria in *Fusarium graminearum* biocontrol and in the detoxification of deoxynivalenol.** 2010. 105 f. Dissertation (Master's Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2010.

ABSTRACT

The damage caused by food contamination by *Fusarium graminearum* and the danger that mycotoxins such as deoxynivalenol present to human beings and animals become a constant concern of methods aimed at controlling fungal growth and detoxification of mycotoxins. For its ability to produce compounds with antifungal activity combined with detoxification capacity, lactic acid bacteria are a promising alternative for the decontamination of foods by biological methods. The main objective of this study was to evaluate the antifungal activity and the ability to decontaminate deoxynivalenol in liquid medium by isolated and commercial strains of lactic acid bacteria. Lactic acid bacteria present in samples of wheat, wheat germ, wheat bran, wheat flour for kibbeh, white and whole wheat flour, sourdough and kefir grains were evaluated by double layer plate Agar assay. Kefir followed by sourdough had higher scores ($8,89 \pm 0,02$ and $6,77 \pm 0,02$ log CFU. g⁻¹) that the wheat products (between $3,06 \pm 0,04$ and $3,78 \pm 0,02$ log CFU. g⁻¹) and wheat grains, the lowest count ($2,05 \pm 0,03$ log CFU. g⁻¹). Isolated strains by these products were identified by API 50 CH[®] kit and along with the commercial lactic acid bacteria cultures, had their antifungal activity against *F. graminearum* IAPAR2218 evaluated with diffusion plate Agar assay. All of them inhibited the fungal growth with diameter halos ranging from 13 ± 2 to 47 ± 2 mm, where the Lyofast LPRA, Sacco (*L. plantarum* and *L. rhamnosus*), was the culture responsible for increased activity and Yo flex YC-180, Chr.Hansen (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*), by smaller inhibition. The pH variation, the concentration of culture medium and the action of lactic acid and acetic acid did not exert any inhibition on the tested fungus, indicating that the antifungal activity occurred by action of other agents. All strains tested in the presence of mycotoxin demonstrated potential for reduction of deoxynivalenol in liquid medium, with reduction rates ranging from 16,41% for viable cells of *L. plantarum* FB VII to 71,19% for Lyofast BG 112 culture (*L. plantarum*), heat inactivated by sterilization. In general, cells inactivated by sterilization showed higher percentages of decontamination than pasteurized cells, where the viable cells had the lowest rates, indicating that the mechanism of detoxification is best explained by the capture of mycotoxin by the bacterial cell wall, instead of degradation by microbial metabolism. All the strains showed antifungal activity and decontamination capacity of DON in liquid medium and might be used for future research to its commercial applications.

Keywords: Lactobacillus. Antifungal activity. Decontamination. Mycotoxin. DON.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural do desoxinivalenol	21
Figura 2 – Isolamento de colônias de bactérias lácticas por esgotamento em Agar MRS	46
Figura 3 – Método de difusão em Agar.....	49
Figura 4 – Visualização da modificação da coloração do indicador púrpura de bromocresol de azul para amarelo e do teste de esculina na galeria 25.....	52
Figura 5 – Escala de inibição onde: (-): nenhuma inibição; (+): inibição muito fraca com halos de 1 a 15 mm; (++) : inibição moderada com halos de 16 a 30 mm; (+++) : inibição média com halos de 31 a 45 mm e (++++): inibição extensiva com halos maiores que 45 mm	60
Figura 6 – Cromatogramas correspondentes ao (I) controle negativo (biomassa sem DON), (II) controle positivo (DON sem biomassa) e (III) ensaio de detoxificação por células viáveis de <i>L. plantarum</i> (FI IX)	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Contagem de bactérias láticas presentes em produtos derivados do trigo e em grãos de kefir	57
Tabela 2 – Percentual de bactérias láticas isoladas dos produtos derivados do trigo e grãos de kefir	60
Tabela 3 – Distribuição percentual de microrganismos inibidores de <i>F. graminearum</i> segundo a morfologia das bactérias isoladas	61
Tabela 4 – Classificação das bactérias láticas isoladas através do kit API 50 CHL.....	63
Tabela 5 – Influência da concentração de caldo MRS, pH do meio de cultura e concentração de ácido acético e ácido lático sobre a atividade inibidora	64
Tabela 6 – Atividade antagônica de bactérias láticas isoladas e identificadas e de culturas comerciais frente a <i>F. graminearum</i> IAPAR2218	66
Tabela 7 – Percentual de redução da micotoxina desoxinivalenol por células de bactérias láticas viáveis, inviabilizadas por pasteurização e por esterilização	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RNA	ácido ribonucléico
RNAr	ácido ribonucléico ribossômico
PCR	reação da polimerase em cadeia
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
a.C	antes de Cristo
BAL	bactérias do ácido lático ou bactérias lácticas
pKa	constante de dissociação do ácido
UFC	unidades formadoras de colônias
pH	potencial hidrogeniônico
HPLC	high performance liquid chromatography
DON	desoxinivalenol
AFB₁	aflatoxina B ₁
AFB₂	aflatoxina B ₂
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	DETERIORAÇÃO FÚNGICA DE ALIMENTOS	15
2.2	<i>Fusarium graminearum</i> E FUSARIOSE	16
2.3	DESOXINIVALENOL(DON)	20
2.4	BACTÉRIAS LÁTICAS	25
2.4.1	Metabolismo das Bactérias Láticas	28
2.4.2	Metabólitos com Atividade Antagonística ao Desenvolvimento Fúngico	30
2.4.2.1	Produtos da fermentação	30
2.4.2.1.1	Ácidos orgânicos	31
2.4.2.1.2	Outros produtos finais da fermentação	32
2.4.2.2	Compostos antimicrobianos de baixa massa molecular	33
2.4.2.2.1	<i>Reuterina</i>	34
2.4.2.2.2	<i>Reuter ciclina</i>	35
2.4.2.3	Ácido fenilático	35
2.4.2.4	Ácidos graxos	36
2.4.2.5	Dipeptídeos cíclicos	37
2.4.2.6	Compostos protéicos	38
2.4.3	Potencial Aplicação de Bactérias Láticas na Detoxificação de Micotoxinas	40
3	OBJETIVOS	44
3.1	OBJETIVO GERAL	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	CONTAGEM, ISOLAMENTO E ARMAZENAMENTO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS	45
4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGÔNICA DAS BACTÉRIAS LÁTICAS AO DESENVOLVIMENTO DO FUNGO MICOTOXIGÊNICO <i>Fusarium graminearum</i>	
4.2.1	Método de Difusão em Agar	47
4.2.1.1	Preparo da suspensão de propágulos	48
4.2.1.2	Preparo da suspensão bacteriana	49

4.3	TESTES SOBRE INFLUÊNCIA DE OUTRAS SUBSTÂNCIAS NO ANTAGONISMO AO DESENVOLVIMENTO DO FUNGO <i>Fusarium graminearum</i>	50
4.3.1	Influência do pH do Meio	50
4.3.2	Influência da Concentração do Caldo MRS	50
4.3.3	Influência do Ácido Lático e do Ácido Acético	51
4.4	CLASSIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS PELO PADRÃO FERMENTATIVO ATRAVÉS DO KIT API 50 CHL	51
4.5	ENSAIO DE DETOXIFICAÇÃO DO TRICOTECENO DESOXINIVALENOL	51
4.5.1	Preparo dos Padrões de Desoxinivalenol	53
4.5.2	Preparo das Culturas de Bactérias Láticas	53
4.5.3	Ensaio de Detoxificação	54
4.5.4	Extração de Desoxinivalenol	54
4.5.5	Quantificação da Concentração de Desoxinivalenol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	55
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1	CONTAGEM E ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS	57
5.2	IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS	61
5.3	INFLUÊNCIA DE OUTRAS SUBSTÂNCIAS NO ANTAGONISMO AO <i>Fusarium graminearum</i>	63
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGÔNICA DAS BACTÉRIAS LÁTICAS AO DESENVOLVIMENTO DO FUNGO MICOTOXIGÊNICO <i>Fusarium graminearum</i>	65
5.5	Detoxificação do Tricoteceno Desoxinivalenol	68
6	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS	77
	ANEXOS	96
	ANEXO A	97
	ANEXO B	99
	ANEXO C	102
	ANEXO D	103
	ANEXO E	104
	ANEXO F	105

1 INTRODUÇÃO

A deterioração fúngica é um problema que acompanha o homem durante séculos, além de provocar alterações físicas, químicas e sensoriais nos alimentos tornando-os impróprios para o consumo, também expõe o consumidor ao perigo de intoxicação por micotoxinas, sem contar os prejuízos financeiros em consequência das perdas na lavoura, no armazenamento, a nível tecnológico e comercial

Fusarium graminearum é mundialmente reconhecido como o mais importante fungo patogênico de grãos e cereais por causar grandes perdas na agricultura e por ser o principal agente causador de uma doença de campo extremamente destrutiva e capaz de devastar colheitas inteiras, conhecida como giberela ou fusariose. A fusariose interfere na qualidade do grão destruindo suas reservas de celulose, amilose e proteína, alterando o rendimento industrial do grão e diminuindo a produtividade, consequentemente causando grandes prejuízos aos produtores agrícolas e industriais.

Além do impacto negativo na economia a depreciação de grãos por *Fusarium graminearum* é agravada pelo fato destes grãos geralmente conterem altas doses de micotoxinas, principalmente o tricoteceno desoxinivalenol, uma constante preocupação para a segurança alimentar e uma grave ameaça para a saúde de humanos e animais por causar recusa de alimento, disfunções gastrointestinais, vômito e depressão da função imune.

Apesar do fato de que várias práticas agrícolas e a aplicação de compostos químicos possam prevenir e tratar a contaminação fúngica das culturas, nem mesmo as melhores estratégias podem erradicar totalmente a contaminação por micotoxinas e com a sua presença na matéria-prima tornam-se necessárias medidas que tenham um foco de ação específico contra certos grupos de toxinas. A abordagem mais utilizada nas indústrias de alimentos consiste na inserção de materiais adsorventes na alimentação, para uma remoção parcialmente seletiva de toxinas por meio de adsorção na rota do trato gastrointestinal ou a adição de enzimas ou bactérias capazes da desintoxicação de certos grupos de micotoxinas.

Nos últimos anos pelo aumento da preocupação em reduzir a utilização de aditivos químicos e fungicidas em alimentos ampliou-se o mercado para métodos biológicos que visam o controle de fungos e consequentemente de micotoxinas e inúmeras são as pesquisas realizadas para a procura de agentes biológicos com potencial antifúngico, sendo que as bactérias lácticas apresentam grande potencial tanto para a inibição do crescimento fúngico bem como para a detoxificação de micotoxinas.

A atividade antimicrobiana das bactérias lácticas pode estar relacionada à competição por nutrientes no meio, à produção de ácidos orgânicos como ácido láctico e acético e à produção de compostos antagonistas como peróxido de hidrogênio, ácido fenilático, reuterina, dipeptídeos cíclicos, ácidos graxos e outros compostos metabolizados.

Sua capacidade de detoxificação pode estar relacionada à captura das micotoxinas pela estrutura celular bacteriana ou degradação através do metabolismo das bactérias lácticas.

Pela capacidade de inibição do desenvolvimento fúngico e da detoxificação de variadas micotoxinas, aliada ao status GRAS (generally recognized as safe) e ao potencial probiótico, as bactérias lácticas são promissoras para o controle biológico de fungos micotoxigênicos como *Fusarium graminearum* tanto na lavoura ou mesmo depois durante o processo tecnológico de produção de alimentos.

Considerando o potencial antifúngico e de detoxificação apresentado pelas bactérias lácticas, bem como a crescente exigência dos consumidores por alimentos com teores reduzidos de aditivos químicos e livres de qualquer contaminação, justifica-se a proposta deste trabalho de isolar bactérias lácticas, avaliar a atividade antifúngica de diferentes cepas frente ao *Fusarium graminearum* e a capacidade destas de remoção da micotoxina desoxinivalenol em meio líquido.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DETERIORAÇÃO FÚNGICA DE ALIMENTOS

Desde o tempo em que o homem primitivo começou a cultivar e a armazenar os alimentos, a deterioração por fungos causava estragos e exigia uma solução. Filamentosos ou limosos, brancos ou pretos, verdes, alaranjados, vermelhos e marrons, esses microrganismos invadiam silenciosamente acidificando, fermentando, descolorindo e deteriorando, transformando saborosos e nutritivos alimentos em material impróprio para o consumo (BARKAI-GOLAN; PASTER, 2008).

Dentre os microrganismos deterioradores de alimentos os fungos geram maiores preocupações por sua capacidade de produção de micotoxinas tóxicas e carcinogênicas que constituem um grande perigo para a saúde pública, por isso a grande atenção que a indústria de alimentos direciona para a prevenção da entrada destes microrganismos na cadeia alimentícia (KABAK et al., 2006; JOUANY, 2007). A contaminação fúngica dos alimentos causa perdas econômicas significativas, principalmente na armazenagem de grãos, que chegam a atingir de 5-10% da produção mundial, e também é responsável pela perda de 20-25% das frutas e vegetais no período de pós-colheita (PITT; HOCKING, 1999; PAOLESSE et al., 2006).

Os fungos são capazes de se desenvolver nos mais variados alimentos como cereais, produtos de panificação, carne, leite, frutas, vegetais, oleaginosas, óleos e gorduras. O crescimento destes microrganismos pode resultar na formação de sabores e odores indesejáveis, toxinas e alergênicos, descoloração, apodrecimento e a constituição de propágulos patogênicos ou alergênicos (FILTENBORG et al., 1996; GIBSON; HOCKING, 1997; TUCKER, 2008).

Bolores e leveduras podem ser encontrados nos mais variados ambientes devido a sua capacidade de poder utilizar os mais diferentes substratos para o seu crescimento e pela sua relativa tolerância a condições desfavoráveis como baixo pH, baixa Aw (atividade da água), e a baixas temperaturas (HUIS IN'T VELD, 1996).

A degradação das propriedades sensoriais dos alimentos é causada geralmente pela produção de enzimas durante o crescimento do microrganismo, sendo lipases, proteases e carbohidrases as mais comumente produzidas por bolores. Uma vez produzidas

essas enzimas continuam com suas atividades, mesmo após a remoção ou destruição do micélio (CARLILE et al., 2001).

Os alimentos são geralmente substratos perfeitos para a multiplicação de diversos microrganismos devido a variação de fatores intrínsecos como o pH, nutrientes e a atividade da água (aw) e de fatores extrínsecos como as condições de estocagem e presença de outros microrganismos (STRANKS, 2007). Em consequência destas condições, a deterioração fúngica é dependente da natureza do alimento ou se ele está em seu estado natural ou já processado (ONAYE, 2004).

É importante destacar que diferentes espécies de fungos possuem características especiais que as tornam mais ou menos adaptadas a um determinado sistema alimentício (GADD *et al.*, 2007).

Muitas espécies de bolores são hábeis na utilização de variadas fontes de carbono derivadas de alimentos e outras podem utilizar nitrato, amônia, e nitrogênio orgânico, o que as habilita a se desenvolverem em uma grande gama de produtos alimentícios (PITT; HOCKING, 1999). Espécies de *Penicillium*, como *Penicillium commune*, *Penicillium nalgiovense* e *Penicillium roqueforti* usualmente são deterioradoras de variados alimentos como queijo, pães e produtos cárneos (LUND et al., 1995; FILTENBORG et al., 1996). *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. são usuais deterioradores de grãos estocados, enquanto que *Fusarium* sp. são deterioradores comuns de plantações, também conhecidos como fungos de campo (FILTENBORG et al., 1996; PITT; HOCKING, 2009).

A deterioração de alimentos causada por bolores e leveduras pode muitas vezes ser reduzida pelo processamento do alimento ou pela aplicação de métodos de conservação. A conservação é adquirida pela adição de preservativos químicos ou pela biopreservação, que consiste na utilização de outros microrganismos ou de seus metabólitos. Nos últimos anos o interesse pela biopreservação aumentou devido a uma demanda por alimentos com teores reduzidos de conservantes químicos (ROSS et al., 2002; DEVLIEGHIERE et al., 2004; HOCKING et al., 2006).

2.2 *Fusarium graminearum* E FUSARIOSE

O gênero *Fusarium* foi introduzido por Link em 1809, e depois de mais de 200 anos é considerado um dos gêneros que engloba o maior número de espécies patogênicas

e devastadoras de plantas. Os membros deste gênero podem também afetar diretamente a saúde de vegetais, animais e seres humanos, além de produzirem metabólitos secundários que são associados a doenças em plantas, câncer e má formação em humanos e animais domésticos (PARRY et al., 1995; GLENN, 2007).

Dentro do gênero *Fusarium*, *Fusarium graminearum* é uma espécie monofilética composta de pelo menos 9 linhagens filogenéticas, algumas das quais estão distribuídas em determinadas regiões geográficas, sendo geralmente as que apresentam um clima temperado ou semi-tropical (O'DONNELL, 2004; TÓTH, 2008).

Fusarium graminearum Swabe [teleomorfo *Giberella zeae* (SCW.) Petch] é um ascomiceto haplóide, mundialmente reconhecido como o mais importante fungo patogênico de grãos e cereais por causar grandes perdas na agricultura (TANAKA et al., 1988; PARRY et al., 1995; MIEDANER et al., 2010). Este microrganismo é o principal agente causador de uma séria doença conhecida como fusariose ou giberela, que é de difícil controle químico, agrônomico ou mesmo genético (SUTTON, 1982; HOPE et al., 2005).

A fusariose é uma doença de infecção floral, extremamente destrutiva, que tem a capacidade de devastar totalmente um ambiente extremamente produtivo a poucas semanas da colheita. Não apresenta especificidade em seu hospedeiro, podendo infectar cereais como trigo, centeio, triticale, cevada, milho e outros pequenos grãos em regiões de clima temperado e semi-árido pelo mundo inteiro, sendo que a infecção pode se tornar mais grave e constante em regiões que combinem uma temperatura maior que 20°C e umidade excessiva, relacionada a períodos prolongados de chuva (mais que 72 horas) (ARGYRIS et al., 2003; CAST, 2003; DEL PONTE et al., 2007; ISEBAERT et al., 2009).

A giberela interfere na qualidade do grão por destruir suas reservas de celulose, amilose e proteína e diminuir significativamente a produtividade por reduzir o tamanho e a quantidade dos grãos, causando extensos prejuízos aos produtores agrícolas, dentre esses, o aumento de despesas e a redução da renda devido a perdas na plantação e ao baixo preço de mercado dos produtos contaminados. Além das perdas econômicas geradas aos agricultores, existem também as perdas tecnológicas na indústria de alimentos, pois grãos contaminados, que tiveram seus grânulos de amido, reservas protéicas (gluteninas) e parede celular destruídas pelo fungo, têm um baixo rendimento na moagem, panificação e fabricação de massas alimentícias (DEXTER et al., 1996, 1997; MC MULLEN et al., 1997; NIGHTINGALE et al., 1999; PLACINTA et al., 1999).

Apesar da fusariose ser uma doença de campo, o grão pode sofrer alterações pós-colheita pelo *F.graminearum* se a sua umidade não for retirada de maneira eficiente e

rápida, tornando-se assim necessários métodos eficientes de secagem e armazenamento adequado, com condições controladas de umidade, ventilação e temperatura (MAGAN et al., 2003; BAPTISTA et al., 2004; SCUDAMORE et al., 2008).

F. graminearum é considerado um fungo competidor e um dos principais fitopatógenos de plantas cultivadas, pois ele possui grande variação na sua virulência por apresentar durante seu ciclo de vida a fase saprofítica e a fase parasitária (SNIDJERS, 1990; YUN et al., 2000; CARTER et al., 2002). Durante a fase saprofítica sobrevive na forma teleomórfica, também chamada de sexual, e recebe o nome de “*Giberella zeae*”, caracterizada pela formação de peritécios (corpos de frutificação). Na presença do hospedeiro, a partir do espigamento (estádio inicial de susceptibilidade) e sob condições climáticas favoráveis, os peritécios liberam os ascósporos que, ao atingirem as espigas, germinam, dando início a fase parasitária, que se transforma na fase anamórfica ou assexual, denominada *F. graminearum* (BOWDEN; LESLIE, 1999). Tanto os macronídios (fase assexual) quanto os ascósporos (sexual) infectam os tecidos vegetais. Na antese, a infecção por *F. graminearum* tem início nas anteras, propagando-se sistematicamente até atingir toda a espiga, porém o fungo também pode infectar por penetração direta na gluma, no germe ou no mesocarpo (SUTTON, 1982).

Pelo fato do fungo sobreviver em sua forma saprofítica, os restos de culturas, particularmente palhas de milho e resíduos de pequenos cereais, dão origem ao inóculo na forma de ascósporos e conídios quando colonizados por *Giberella zeae*, podendo permanecer no solo por aproximadamente 104 semanas (WINDELS; KOMMEDAHL, 1984; DILL-MACKY; JONES, 2000; SROBÁROVÁ et al., 2008). O predomínio de ascósporos no ar tem sido associado a fatores como elevada precipitação pluviométrica, umidade excessiva e principalmente devido a manutenção dos restos culturais sobre a superfície do solo no sistema plantio direto. Para um surto ter a capacidade de dizimar uma cultura é necessário apenas um ambiente com condições climáticas adequadas para a dispersão do inóculo e desenvolvimento da doença, aliado a uma plantação em estágio crítico de maturação (da antese para a formação inicial do grão) (KHONGA; SUTTON, 1988; CLEAR; PATRICK, 2000; MARKELL; FRANCL, 2003).

Além do impacto negativo na economia, a depreciação de grãos contaminados por *F. graminearum* é agravada pelo fato destes grãos geralmente conterem altas doses de micotoxinas, principalmente o tricoteceno desoxinivalenol (DON), que constitui uma constante preocupação para a segurança alimentar e uma grave ameaça para a saúde de humanos e animais por causar recusa de alimento, depressão da função imune e vômito (MILLER, 1995; WINDELS, 2000; FUNG; CLARK, 2004).

Embora a presença de tricotecenos esteja principalmente associada com a contaminação de campo, freqüentes chuvas e alta umidade durante o período de floração provocam um aumento na contaminação pelo fungo e da síntese de DON e um armazenamento inadequado acompanhado de altas temperaturas e elevado teor de umidade do grão infectado favorecem a continuação da síntese de micotoxinas levando a uma redução da qualidade destes grãos durante a estocagem (SCOTT et al., 1984; BIRZELE et al., 2000; HOMDORK et al., 2000).

Além da toxicidade animal (PESTKA, 2007), os tricotecenos também são fitotóxicos para uma grande variedade de plantas, sendo que a produção de DON por *F. graminearum* mostrou ser um fator de virulência por aumentar o desenvolvimento da doença em várias espécies de hospedeiros, incluindo a ferrugem em trigo e a podridão de espigas de milho (SCHOLBROCK et al., 1992; PROCTOR et al., 1995; DESJARDINS; HOHN, 1997; HARRIS et al., 1999; BAI et al., 2001).

O mecanismo de toxicidade baseia-se na inibição da enzima peptidiltransferase, inibindo então a síntese protéica do hospedeiro, podendo suprimir ou retardar a resposta de defesa da planta contra o fungo (SNIDJERS; PERKOWSKI, 1990; GLENN, 2007).

Apesar de ainda não ter sido encontrada uma forma eficiente para o controle da fusariose, algumas práticas têm sido adotadas no intuito de no mínimo amenizar o impacto dessa enfermidade, sendo que as mais comuns são a rotação de culturas e o controle químico (NOUROZIAN et al., 2006; MAIORANO et al., 2008; XUE et al., 2008). O controle por meio de rotação de culturas, embora recomendado, é ineficiente uma vez que o fungo sobrevive nas sementes e nos restos das culturas de um grande número de hospedeiros e a aplicação de fungicidas, por sua vez, resulta no acúmulo de resíduos químicos nos grãos após a colheita e também pode promover um aumento da produção das micotoxinas desoxinivalenol e nivalenol pela baixa eficiência no controle do desenvolvimento do fungo (D'MELLO et al., 1999; MAGAN et al., 2002; RAMIREZ et al., 2004). O uso de genótipos resistentes a doença é a forma mais correta do controle da doença, porém existem poucas fontes de resistência genética conhecidas e a incorporação de genes de resistência é uma tarefa muito difícil pelo fato de haver uma variação muito alta de virulência de isolados dentro e entre espécies (MIEDANER; SCHILING, 1996; CARTER et al., 2002; WALTER et al., 2010).

O controle biológico pode ser uma abordagem promissora para a gestão da fusariose, especialmente nos casos em que o fungo é resistente aos fungicidas (HE et al.,

2009). Bactérias e leveduras demonstraram efeitos antagônicos frente *Giberella zeae*, e com um corpo considerável de estudos envolvendo esse assunto, a utilização de microrganismos para o controle biológico de *F. graminearum* oferece a promessa de ser uma ferramenta eficaz para a redução da severidade da giberela e da contaminação de DON em grãos na agricultura comercial (SCHISLER et al., 2002, GILBERT; FERNANDO, 2004).

2.3 DESOXINIVALENOL (DON)

Desoxinivalenol é uma micotoxina pertencente ao grupo dos tricotecenos, produzida na maioria das vezes por *Fusarium graminearum* e excepcionalmente por *Fusarium culmorum*, dependendo da área geográfica, com *F. graminearum* prevalecendo em regiões de clima morno e úmido. Essa micotoxina é normalmente detectada em cereais e grãos, sendo o contaminante que mais afeta as produções na Europa e América do Norte (BIRZELE et al., 2000; RICHARD, 2000; PESTKA; SMOLINSKI, 2005; PINTON et al., 2009).

Tricotecenos são as principais micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium* e constituem um grupo de mais de 80 análogos de sesquiterpenos, derivados de um sistema cíclico chamado tricotecano. Todos os tricotecenos contêm um esqueleto principal formado por 12,13-epoxitricotecano que é o responsável por sua toxicidade e uma ligação olefínica no Carbono 9-10 com variadas cadeias laterais (BIRZELE et al., 2000; BENNETT; KLICH, 2003; OMAYE, 2004). De acordo com a presença ou não de grupos funcionais ligados ao anel aromático os tricotecenos podem ser classificados como A, B, C ou D (WHO, 2002; OMURTAG; BEYOGLU, 2007).

Desoxinivalenol (DON, vomitoxina, 3a, 7a, 15-trihidroxi-12,13-epoxitricotec-9-en-8 eno) um dos tricotecenos mais conhecido, tem massa molecular de 296,3 g. mol⁻¹ correspondente a uma fórmula molecular C₁₅H₂₀O₆, representada estruturalmente na Figura 1. O DON cristaliza na forma de agulhas sob um ponto de fusão de 151-153 °C e a sua rotação específica é $[\alpha]_D^{20} = +6,35$. As suas funções insaturadas alfa e beta epóxido são as responsáveis pela absorção da radiação ultravioleta em comprimentos de onda curtos. Pelo fato do DON ser um tricoteceno do tipo B, ele é solúvel tanto em água e solventes polares quanto em soluções aquosas de metanol e acetonitrila e em solução de acetato de etila. Ele é

estável em solventes orgânicos, porém os solventes mais indicados são o acetato de etila e a acetonitrila, principalmente para longos períodos de armazenamento. Apresenta alta estabilidade a 120 °C, estabilidade moderada a 180 °C e se decompõe quando exposto por 30-40 minutos a uma temperatura de 210 °C. Sob condições fracamente ácidas continua estável, porém não resiste a condições extremamente alcalinas (SHEPHERD; GILBERT, 1988; JECFA, 2001; WIDESTRAND; PETTERSON, 2001; KRŠKA et al., 2007, RICHARD, 2007).

Apesar de ser menos tóxico do que outros importantes tricotecenos, DON se destaca por ser encontrado em grandes quantidades em cereais e grãos como aveia, cevada, centeio, milho, trigo e cártamo, que são utilizados diretamente na alimentação de animais como gado, suínos e eqüinos (BIRZELE et al., 2002; TOMCZAK et al., 2002; EDWARDS, 2004; TUTELYAN, 2004).

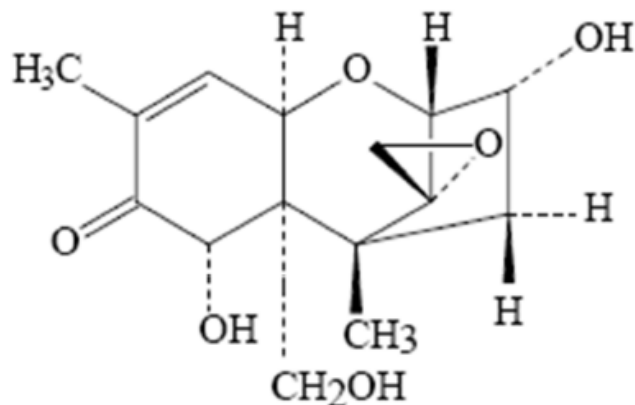


Figura 1-Fórmula estrutural do desoxinivalenol.

Fonte: EFSA, 2004.

Por ser estável sob as condições normais de processamento de alimentos, bem como a temperaturas de esterilização (120°C), durante o processo de moagem do trigo para a manufatura da farinha, fabricação de cerveja, extrusão, bem como durante o processo de panificação, DON está constantemente presente na alimentação de animais de pequeno porte como cães e gatos e também na alimentação humana se a matéria-prima utilizada no processamento dos alimentos for contaminada por essa micotoxina (NEIRA et al., 1997;

HUGHES et al., 1999; MOLTÓ et al., 2000; HAZEL; PATEL, 2004; VISCONTI et al., 2004; SAMAR et al., 2007; PACIN et al., 2010).

DON exibe efeitos tóxicos em humanos bem como em animais. Dentre as espécies de animais investigadas os suínos são os que demonstram maior similaridade ao sistema imune e ao trato gastrointestinal dos seres humanos, sendo por isso muito utilizados em analogia a seres humanos nas pesquisas da toxicocinética de DON (ROTHKÖTTER et al., 2002; ERIKSEN et al., 2003; PINTON et al., 2008).

Apenas alguns casos de ingestão de alimentos contaminados por DON por seres humanos foram relatados, dentre eles dois ocorreram na Ásia, um correlacionado com o consumo de grãos contaminados por *F. graminearum* e outro pela utilização de grãos que continham DON nas concentrações de 3 000-93 000 $\mu\text{g. kg}^{-1}$, existindo também um surto de desordem gastrointestinal que ocorreu no Vale do Kashmir, Índia, pelo consumo de pão embolorado. Os sintomas relatados mais comuns são: falta de apetite, dores abdominais, flatulência, náusea, vertigens, vômito, diarreia, sangue nas fezes; dor de cabeça e irritação da garganta, sendo todos eles rapidamente reversíveis após a eliminação do alimento contaminado da dieta, pois DON é rápida e eficientemente absorvido por porções superiores do intestino delgado e excretado principalmente através da urina, sem ocorrência de acúmulo em tecidos (BHAT et al., 1989; CREPPY, 2002; LI et al., 2002; SUDAKIN, 2003; PESTKA; SMOLINSKI, 2005).

O primeiro efeito adverso observado na maioria dos animais e também em seres humanos é a redução do consumo de alimentos, sendo que muitas vezes a intoxicação por DON é confundida por uma gastroenterite devido aos sintomas comuns como náusea, vômito, diarreia, anorexia e hemorragia gastrointestinal. Devido ao fato de vômito ser um dos sintomas mais acentuados, DON é comumente conhecido como vomitoxina (D'MELLO; MACDONALD, 1997; GAJECKI et al., 2007; WU, 2007; PINTON et al., 2009).

Dentre os animais de granja, os suínos são os mais susceptíveis aos efeitos do DON pelo fato de que mesmo quando ingerem baixas doses da micotoxina, os sintomas de redução de apetite e perda de peso são acentuados (OSWEDER, 2001; WU, 2004; RICHARD, 2007). Estudos com suínos indicaram que DON é um potente inibidor de apetite e conseqüentemente do crescimento, sendo que os níveis de redução podem variar entre 20% e 13% respectivamente, para uma concentração de 4 mg de DON. kg^{-1} na dieta diária (GOYARTS et al., 2006).

Em cães e gatos alimentados com rações produzidas a partir de grãos contaminados por DON houve uma redução na ingestão de alimentos em concentrações de DON acima de $4,5 \pm 1,7 \text{ mg. kg}^{-1}$ para cães e superior a $7,7 \pm 1,1 \text{ mg. kg}^{-1}$ para gatos. Vômitos para cães e gatos foram observados em níveis de DON entre 8-10 mg (HUGHES et al., 1999).

Deve-se ressaltar o fato que a exposição ao DON para animais sensíveis a esta micotoxina não resulta apenas em perdas econômicas devido a redução do ganho de peso, mas também em alterações nas funções do sistema imune e conseqüentemente diminuição da resistência a patógenos (ATKINS; NORMAN, 1998).

Estudos realizados com eqüinos constataram que a exposição a concentrações naturais de DON (grãos de cevada contaminados naturalmente com 36-44 ppm) não constituíram perigo a saúde destes, pois não foram evidenciados efeitos negativos no consumo de alimentos nem no desempenho dos animais não sendo encontrada nenhuma anomalia nos exames clínicos e hematológicos (JOHNSON et al., 1997).

Os ruminantes são considerados mais resistentes ao DON por ele não afetar no consumo de alimentos e não haver redução da produção de leite por vacas leiteiras que consumiram grãos contaminados, isso ocorre porque em ruminantes DON é convertido pelos microrganismos presentes no rúmen por uma forma relativamente menos tóxica por não conter grupamento epóxi, conhecida como DOM-1 ($3\alpha, 7\alpha, 15$ -trihidroxitricotec-9,12-dien-8-one) (KING et al., 1984; SWANSON et al., 1987; CHARMLEY et al., 1993).

A toxicidade dos tricotecenos deve-se principalmente a existência do grupo epóxi que confere a habilidade em inibir a síntese protéica. Tricotecenos como o DON têm a capacidade de capturar a subunidade ribossômica 60S de células eucarióticas juntamente com a enzima peptidiltransferase, interferindo no início do pareamento e na elongação das cadeias peptídicas (RIZZO et al., 1992; PESTKA; SMOLINSKI, 2005; DÖLL et al., 2009).

Altas doses de tricotecenos como DON podem comprometer a atividade reconstrutora dos tecidos, incluindo medula óssea, gânglios linfáticos, baço, timo e a mucosa do intestino resultando em imunossupressão expressa com a diminuição dos linfócitos e da resistência à patógenos e também supressão ou atraso da resposta dos anticorpos aos antígenos (BONDY; PESTKA, 2000; SCHLATTER, 2004).

Por DON ter sido firmemente apontado como uma micotoxina extremamente clastogênica e potencialmente promotora de tumores *in vivo*, por sua atividade altamente citotóxica associada à recusa de alimentos, emesis, distúrbios no sistema nervoso, depreciação do glicogênio hepático, irritação do trato gastrointestinal e da epiderme, diarreia,

redução do ganho de peso, vômito, refluxo, inibição da síntese de proteínas e de DNA, efeitos imunotóxicos e hemorragia, é cada vez mais crescente a preocupação em evitar a presença desta micotoxina na alimentação humana e animal (LUO et al., 1990; STEYN, 1995; BONDY; PESTKA, 2000; PINTON et al., 2009).

Dentre as abordagens para a prevenção da presença de micotoxinas na alimentação humana e animal são incluídas estratégias de pré e pós-colheita, sendo as últimas freqüentemente classificadas em físicas, químicas e biológicas (JOUANY, 2007).

As etapas de prevenção que são as mais eficazes são aquelas realizadas ainda no campo, antes da infestação do fungo e da produção das micotoxinas, como as práticas de aplicação de fungicidas citadas para a prevenção e eliminação de *F. graminearum* (ALDRED; MAGAN, 2004).

Apesar do fato de que várias práticas agrícolas possam prevenir a contaminação das culturas, nem mesmo as melhores estratégias de gerenciamento da produção agrícola podem erradicar totalmente a contaminação por micotoxinas e havendo continuidade da presença das micotoxinas na matéria-prima, são necessárias medidas que tenham um foco de ação específico contra certos grupos de toxinas. A abordagem mais utilizada nas indústrias de alimentos consiste na inserção de materiais adsorventes na alimentação, para uma remoção parcialmente seletiva de toxinas por meio de adsorção na rota do trato gastrointestinal ou a adição de enzimas ou bactérias capazes da desintoxicação de certos grupos de micotoxinas (BATA; LÁSZTITY, 1999; HUWIG et al., 2001; HAZEL ; PATEL, 2004; BINDER et al., 2007).

Nos últimos anos, pelo aumento da preocupação em reduzir a utilização de aditivos químicos e fungicidas em alimentos, ampliou-se o mercado para métodos biológicos que visam o controle de fungos e conseqüentemente de micotoxinas e inúmeras são as pesquisas realizadas para a procura de agentes biológicos com potencial antifúngico, sendo que as bactérias lácticas, apresentam grande potencial tanto para a inibição do crescimento fúngico bem como para a detoxificação de micotoxinas (GOURAMA; BULLERMAN, 1995a; HOCKING et al., 2006).

Pela capacidade de inibição do desenvolvimento fúngico e de detoxificação de variadas micotoxinas, aliado ao status GRAS (generally recognized as safe) e ao potencial probiótico, as bactérias lácticas são potencialmente promissoras para o controle biológico de fungos micotoxigênicos como *F. graminearum* tanto na lavoura ou mesmo depois durante o processo tecnológico de produção de alimentos (LEROY; DE VUYST, 2004; YANG; CLAUSEN, 2004).

A utilização de bactérias lácticas pode ocorrer ainda no campo, como na aplicação de culturas iniciadoras de bactérias lácticas em plantações de cevada durante o estágio de floração, que resulta em inúmeros benefícios na qualidade por diminuir a quantidade de grãos danificados por *F. graminearum* e contaminados por micotoxinas, aumentando a quantidade de proteínas e carboidratos dos grãos, bem como melhorando várias características tecnológicas (LOWE; ARENDT, 2004).

A nível tecnológico e industrial constatou-se que durante várias etapas de produção de cerveja a aplicação de culturas iniciadoras de bactérias lácticas resultou na inibição da contaminação por fungos do gênero *Fusarium* e também na prevenção da produção de micotoxinas como zearalenona e desoxinivalenol, melhorando características sensoriais e qualidade do produto final (NUMMER, 1996). A combinação de bactérias lácticas homo e heterofermentativas na fabricação de silagens acarretou uma redução dos níveis de DON (ZHANG et al., 2009). A utilização de cepas de *Lactobacillus plantarum* FST 1.7 na fermentação de pães aumentou a vida útil do produto final pela habilidade da bactéria em inibir o crescimento de cepas de *F. culmorum* e *F. graminearum*, diminuindo também o perigo de contaminação por DON (DAL BELLO et al., 2007).

2.4 BACTÉRIAS LÁCTICAS

Inicialmente as bactérias lácticas (BAL) eram definidas e associadas apenas como microrganismos acidificantes do leite, devido ao leite fermentado produzido pela ação do ácido láctico que produziam como metabólito principal. Elas constituem um grupo de bactérias diversificado, mas estritamente relacionado por uma série de características morfológicas, fisiológicas e metabólicas (MARTH; STEELE, 2001).

Taxonomicamente, o termo bactérias lácticas reporta a um diverso grupo de bactérias que partilham as seguintes características: cocos ou bacilos Gram positivos, não esporuladas, catalase negativas, desprovidas de citocromos, porém aerotolerantes, exigentes nutricionalmente, ácido-tolerantes e fermentadoras, tendo o ácido láctico como o principal produto final da fermentação dos açúcares (STILES; HOLZAPFEL, 1997; AXELSSON, 2004).

Entretanto podem ocorrer exceções para essa descrição geral do gênero, porque algumas espécies podem formar catalase ou citocromos em meios que contenham

hematina ou compostos relacionados. A produção de catalase não heme, chamada de pseudocatalase por algumas espécies de lactobacilos também pode causar confusão na identificação de bactérias ácido lácticas (WHITTENBURY, 1964; WOLF et al., 1991).

Baseando-se na ampla definição fisiológica, as bactérias lácticas estão compreendidas em um grupo com aproximadamente 20 gêneros, no entanto, se for levado em conta apenas o ponto de vista tecnológico os gêneros mais importantes são: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (DAVIDSON et al., 1995; AXELSSON, 2004). Destes, os *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Streptococcus* historicamente representam os principais gêneros, reconhecidos desde 1940 e os *Lactobacillus* os mais encontrados, compreendendo cerca de 80 espécies reconhecidas (AXELSSON, 2004).

O gênero *Bifidobacterium* foi considerado durante muito tempo como pertencente ao grupo das bactérias lácticas por compartilhar algumas de suas características típicas, como produção de ácido, porém é filogeneticamente independente e apresenta apenas um único modo de fermentação do açúcar (WESSELS et al., 2004).

A classificação das bactérias do ácido láctico em diferentes gêneros é em grande parte baseada na morfologia, modo de fermentação da glicose, crescimento a diferentes temperaturas, configuração do ácido láctico produzido, capacidade de crescer sob altas concentrações de sais, ácidos ou bases e por marcadores quimiotaxônomicos como a composição de ácidos graxos e constituintes da parede celular. Além disso, a taxonomia atual também utiliza relações filogenéticas que têm sido divulgadas a partir de extensos trabalhos de revelação de seqüências de RNA ribossômico (RNAr) através de técnicas como a da transcriptase reversa ou pela tecnologia de PCR (reação em cadeia de polimerase) e recentemente pelo seqüenciamento genômico das espécies e gêneros catalogados (WOESE, 1987; KLAENHAMMER et al., 2002; ERCOLINI, 2004; TRINGE; HUGENHOLTZ, 2008).

Pelo fato das bactérias lácticas serem encontradas normalmente em ambientes ricos em nutrientes como carboidratos fermentáveis, aminoácidos, ácidos graxos, sais e vitaminas, a contagem destes microrganismos em alimentos é baseada principalmente na seleção de condições ótimas para o seu crescimento (condições microaerófilas e meios enriquecidos, para atender às grandes exigências nutricionais), havendo pouca ênfase na criação de condições seletivas, uma vez que nos alimentos onde sua enumeração é relevante, a microbiota competidora restringe-se quase que exclusivamente a bolores e leveduras (SILVA et al., 1997; HOLZAPFEL et al., 2001).

Desde há muito tempo se utiliza a fermentação por bactérias lácticas para melhorar a conservação e qualidade de alimentos, sendo a produção de alimentos fermentados uma das mais antigas técnicas de processamento de alimentos conhecida. Desde os primórdios da civilização o homem vem aplicando a técnica em grãos, cereais, leites, carnes e vegetais com primeiros registros que datam de gravuras em murais egípcios do ano de 6000 a.C. Certamente os processos de fermentação eram totalmente artesanais e empíricos, passados de gerações em gerações sem que houvesse noção do papel fundamental dos microrganismos no resultado final (ALLEN, 1926; ROSS et al., 2002; FARNWORTH, 2008). A devida importância dos microrganismos no processo fermentativo e também o entendimento dos processos metabólicos envolvidos, só começaram a ser compreendidos e desvendados em meados do século 19, a partir da ampliação do estudo da microbiologia de alimentos (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

Atualmente a principal finalidade da adição de bactérias lácticas na produção de alimentos não é apenas conservação, mas também fornecer ao alimento características desejáveis como aroma, sabor e textura e assim aumentar seu valor comercial. A fermentação por bactérias lácticas age essencialmente na produção de vários tipos de alimentos consumidos como leites fermentados, iogurtes, queijos, pepinos e outros vegetais fermentados, produtos cárneos maturados, além de alimentos destinados a alimentação animal como silagens de variados grãos e cereais (TOBÍA et al., 2003; TAMINE, 2006; TOLDRÁ, 2007). O processo fermentativo dessas bactérias resulta em um produto principal, o ácido láctico, que, além de propriedades conservantes, melhora as características sensoriais dos alimentos (BRUL; COOTE, 1999). Cepas específicas são também adicionadas a alimentos probióticos com o intuito de adicionarem efeitos benéficos à saúde dos hospedeiros sejam eles seres humanos ou animais (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

A partir do fato de que as bactérias do ácido láctico ocorrem naturalmente em vários alimentos e vêm fazendo parte da dieta dos humanos durante séculos elas podem ser consideradas microrganismos seguros para o consumo humano ou animal, e, além disso, apresentam um grande potencial para serem usadas na biopreservação de alimentos (WOOD; HOLZAPFEL, 1995).

A biopreservação consiste na utilização de uma microbiota natural ou controlada ou a adição de seus metabólitos antimicrobianos para estender a vida útil e aumentar a segurança dos alimentos, diminuindo assim a quantidade de compostos químicos utilizados acompanhando a exigência atual dos consumidores por alimentos mais naturais e livres de aditivos e conservantes (STILES, 1996; HASSAN; BULLERMAN, 2008).

O primeiro efeito preservativo adquirido pela adição de BAL é devido a produção de ácido lático que diretamente diminui o pH e por isso inibe diversos microrganismos patogênicos ou deterioradores (BRUL; COOTE, 1999). Além da produção de ácido lático as bactérias lácticas produzem outras substâncias com potencial antagonístico como o ácido acético, peróxido de hidrogênio, diacetil, reuterina e bacteriocinas que desempenham um papel fundamental na preservação de alimentos (SCHILLINGER et al., 1996; CAPLICE; FITZGERALD, 1999; ANANOU et al., 2007).

A fisiologia das bactérias lácticas tem sido de grande interesse desde o momento em que foi reconhecido que estas bactérias estão envolvidas na acidificação de alimentos. Estudos sobre o metabolismo e a fisiologia destes microrganismos têm sido uma forma de controle sobre sua utilização (AXELSSON, 2004).

2.4.1 Metabolismo das Bactérias Lácticas

As bactérias lácticas apresentam propriedades fisiológicas e aplicações tecnológicas muito atrativas, como resistência a bacteriófagos, atividade proteolítica, fermentação da lactose e do citrato, produção de polissacarídeos, alta resistência a liofilização e ao congelamento, capacidade de adesão e colonização da mucosa do trato gastrointestinal e a produção de substâncias antimicrobianas (ANANOU et al., 2007).

A principal fonte de energia das bactérias lácticas é proveniente do metabolismo de carboidratos utilizados para manter o potencial energético das células e aproximadamente 5% do açúcar fermentado é usado como fonte de substratos para reações de síntese (POOLMAN, 1993; COCAIGN-BOUSQUET et al., 1996). O crescimento exponencial deste grupo de microrganismos parece ser “programado” para acontecer somente em meios complexos, ricos em carboidratos (NOVAK et al., 1998).

A inabilidade de sintetizar grupos porfirina resulta em que as bactérias lácticas sejam desprovidas de catalase e citocromos, conseqüentemente, não possuem uma cadeia de transporte de elétrons e dependem da fermentação para a produção de energia (AXELSSON, 2004). Pelo fato destas bactérias não utilizarem oxigênio para a produção de energia, elas têm a capacidade de se multiplicarem sob condições anaeróbias, podendo também se desenvolver na presença de oxigênio, classificadas assim como anaeróbias aerotolerantes. Elas apresentam uma proteção ao oxigênio e a seus produtos por conterem

peroxidases. Por causa dos baixos campos de energia, as bactérias lácticas geralmente crescem mais vagarosamente do que aqueles microrganismos capazes de realizar respiração, produzindo assim, pequenas colônias que variam de 1 -3 mm de diâmetro. As bactérias do ácido láctico podem se multiplicar em uma faixa de temperatura entre 5 -45 °C, sendo também tolerantes a condições de elevada acidez, e muitas cepas são capazes de crescer a pH 4,4, com o crescimento ótimo ocorrendo em uma faixa de pH entre 5,5 -6,5 (DAVIDSON et al., 1995; ERCOLINI et al., 2001).

Bioquimicamente, a fermentação é um processo metabólico onde carboidratos são parcialmente oxidados para a obtenção de energia na ausência de um aceptor final de elétrons, ou seja, na ausência de oxigênio. Como a oxidação é incompleta, pouca energia é produzida quando comparada à respiração. Os produtos finais da fermentação podem ser compostos orgânicos diferentes, dependendo do microrganismo fermentador (WOOD; HOLZAPFEL, 1995).

As bactérias lácticas podem ser classificadas como homo ou heterofermentativas, dependendo de como fermentam a glicose sob condições de crescimento não limitadas. As homofermentativas utilizam a via glicolítica (Embden-Meyerhof-Parnas) que ocorre entre *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* e algumas espécies homofermentativas de *Lactobacillus*. É caracterizada pela divisão da frutose 1,6-difosfato (FDP) em gliceraldeído-3-fosfato (GAP) e dihidroxiacetona fosfatada (DHAP) que pela ação de uma aldolase são convertidos a piruvato que posteriormente é reduzido para ácido láctico como principal produto da fermentação. Por sua vez, bactérias lácticas heterofermentativas como *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus fermentum* utilizam a via do 6-fosfogliconato/fosfoquetolase (6-PG/PK) para a descarboxilação dos carboidratos, resultando em ácido láctico, dióxido de carbono e etanol como produtos finais, esse grupo também possui a habilidade de usar receptores externos de elétrons para regenerarem o NADH, ganhando mais energia; devido a essa via alternativa, ao invés de etanol será formado ácido acético (AXELSSON, 2004).

De acordo com essas duas principais vias de fermentação, as bactérias lácticas são divididas em três diferentes categorias metabólicas: homofermentativas obrigatórias; heterofermentativas obrigatórias e heterofermentativas facultativas. As homofermentativas obrigatórias podem apenas fermentar açúcar por meio da via glicolítica, as heterofermentativas obrigatórias apenas pela via 6-PG/PK, já as heterofermentativas facultativas apresentam capacidade de utilizar as duas vias (AXELSSON, 2004).

2.4.2 Metabólitos com Atividade Antagonística ao Desenvolvimento Fúngico

Como previamente citado, as bactérias lácticas são capazes de produzir diversas substâncias com atividade antimicrobiana. Algumas delas como ácido lático e reuterina são capazes de inibir tanto bactérias como bolores e leveduras enquanto outras, como as bacteriocinas, apenas afetam bactérias intimamente relacionadas (STRÖM, 2005).

O mecanismo preciso da ação antimicrobiana dos metabólitos produzidos pelas bactérias lácticas não pode ser totalmente definido devido às complexas interações existentes entre os diferentes compostos produzidos durante a fermentação do alimento (CORSETTI et al., 1998; NIKU-PAAVOLA et al., 1999). Muitas pesquisas têm sido dirigidas com o objetivo de identificar as diferentes substâncias responsáveis pela ação antagônica primeiramente em sistemas *in vitro*, mas pouco se conhece a respeito dos complexos mecanismos que ocorrem em sistemas alimentares (BRUL; COOTE, 1999).

Estudos sobre a ação antifúngica destas bactérias são dificultados pelo fato que alguns fungos apresentam forte sensibilidade a produtos do metabolismo das BAL impedindo que se consiga visualizar a ação dos outros compostos, sendo necessários processos de purificação e caracterização das substâncias (BONESTROO et al., 1993).

O número de publicações existentes sobre a atividade antifúngica de bactérias lácticas ainda é pequeno. Pesquisando sobre o assunto depara-se com o fato de que a maioria das publicações descreve a atividade antifúngica de bactérias lácticas, porém em poucas há a caracterização dos compostos e mecanismos responsáveis por essa atividade.

2.4.2.1 Produtos da fermentação

A fermentação reduz a quantidade de carboidratos disponíveis no meio e como resultado de sua atividade ocorre a produção de moléculas orgânicas que apresentam atividade antimicrobiana (FARNWORTH, 2008).

Além da produção dos metabólitos principais (ácidos lático, acético e propiônico) muitos outros compostos podem ser formados por diferentes bactérias lácticas. Deve-se ter em mente que essas substâncias antimicrobianas não são produzidas para a conveniência humana e sim para desempenhar um papel biológico no amensalismo, como

ferramenta para as bactérias lácticas ganharem vantagens sobre outros concorrentes, produzindo compostos antagônicos aos demais microrganismos e acidificando o meio (SOOMRO et al., 2002).

2.4.2.1.1 Ácidos orgânicos

O ácido láctico é o principal metabólito de bactérias lácticas por acarretar redução de pH no meio podendo assim causar a inibição de vários microrganismos (De MUYNCK et al., 2004). A forma não dissociada, que é mais hidrofóbica, atravessa a membrana dissociando-se no interior da célula e liberando íons H^+ que acidificam o citoplasma (PIARD; DESMAZEAUD, 1991). Adicionalmente ao efeito do pH, a dissociação dos ácidos causa um colapso eletroquímico no gradiente de prótons, causando bacteriostase e finalmente a morte das bactérias susceptíveis (EKLUND, 1989). O ácido láctico pode apresentar um efeito antifúngico sinérgico com o acetato de sódio encontrado no substrato MRS (de MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960), um meio padrão para o desenvolvimento de bactérias lácticas (CABO et al., 2002; STILES et al., 2002).

As bactérias lácticas heterofermentativas produzem grandes quantidades de ácido acético na presença de aceptores de elétrons externos enquanto que o ácido propiônico é apenas produzido em pequenas quantidades. Ambos os ácidos possuem maiores valores de constante de dissociação (pKa) do que o ácido láctico, apresentando assim uma maior proporção íons hidrogênio liberados a um mesmo pH. Similarmente ao ácido láctico, os ácidos acético e propiônico interagem com a membrana celular a fim de neutralizar o gradiente eletroquímico de prótons, porém o efeito destes ácidos é algumas vezes dependente da diminuição do pH causada pelo ácido láctico (EKLUND, 1989).

O ácido propiônico, e alguns de seus sais como o propionato de sódio e o propionato de amônia, reduzem o crescimento de fungos filamentosos e leveduras por afetarem a membrana celular, especialmente a um baixo pH (próximo de 4,5), sendo que o ácido propiônico assim como o ácido acético, também apresenta a capacidade de inibir o crescimento de certos microrganismos por impedir que estes utilizem os aminoácidos presentes no meio (WOOLFORD, 1984; EKLUND, 1989).

Pelo fato desses ácidos apresentarem uma intensa atividade inibidora, eles acabam dificultando as pesquisas de outras substâncias que apresentem atividade semelhante,

fazendo com que seja necessária a realização de processos rigorosos de purificação para a caracterização destas substâncias (MAGNUSSON; SCHNÜRER, 2001; MAGNUSSON et al., 2003; SJÖGREN et al., 2003).

2.4.2.1.2 Outros produtos finais da fermentação

Muitas bactérias lácticas apresentam oxidoredutases, NADH peroxidase, NADH oxidase e α -glicerofosfato oxidase, que as tornam capazes de produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na presença de oxigênio. Pela falta de um grupamento heme, as bactérias lácticas não produzem catalase para a remoção do peróxido de hidrogênio, e pelo fato de que outras enzimas como as peroxidases, flavoproteínas ou pseudocatalases não são tão eficientes nessa função ocorre um acúmulo de peróxido de hidrogênio no meio (CONDON, 1987). Os efeitos antimicrobianos do peróxido de hidrogênio já são bem documentados e são atribuídos ao forte efeito oxidante sobre a membrana lipídica, pela destruição de estruturas básicas das proteínas celulares e também por neutralizar o oxigênio singleto criando um ambiente anaeróbio não favorável ao desenvolvimento de muitos microrganismos (DAVIDSON et al., 1995).

O efeito antimicrobiano do peróxido de hidrogênio mesmo em concentrações não inibitórias é potencializado pela lactoperoxidase e pelo tiocianato presentes no leite e na saliva, como exemplo, quando ocorre fermentação do leite, onde a reação do peróxido de hidrogênio produzido pelas bactérias lácticas com a lactoperoxidase e o tiocianato forma o complexo peróxido-tiocianatolactoperoxidase, que envolve a reação do peróxido de hidrogênio com o tiocianato por catálise da lactoperoxidase, sendo que o hipotiocianato formado juntamente com os outros produtos intermediários, causam a inibição microbiana potencializada (BJÖRCK et al., 1975; BJÖRCK, 1978; CONDON, 1987).

Rodriguez et al. (1997) sugeriram que o meio MRS poderia ser utilizado como substrato na seleção de substâncias antimicrobianas que não sejam peróxido de hidrogênio, pois descobriram que o peróxido de hidrogênio é rapidamente degradado no MRS, provavelmente devido à atividade da catalase do extrato de levedura presente neste meio.

Por sua vez, o diacetil (2-3 butanodiona), substância responsável pelo aroma característico da manteiga, exibe atividade antimicrobiana em baixo pH e é produzido por

linhagens de alguns gêneros de bactérias lácticas durante a fermentação do citrato (JAY, 1982). Muitas espécies de bactérias lácticas incluindo cepas de *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* e *Lactobacillus* são capazes de produzir diacetil embora esta seja reprimida pela fermentação das hexoses. Bactérias Gram negativas, bolores e leveduras são mais sensíveis ao diacetil do que bactérias Gram positivas. Acredita-se que o modo de ação seja pela interferência na utilização de arginina pelos microrganismos (OUWEHAND; VESTERLUND, 2004). Diacetil é raramente encontrado em alimentos fermentados em concentrações suficientes para exercer alguma atividade inibidora, sendo que a quantidade de diacetil necessária para que a atividade inibitória seja exercida (aproximadamente 200 mM) alteraria dramaticamente o aroma e o sabor do produto final (PIARD; DESMAZEAUD, 1991).

O dióxido de carbono geralmente formado durante a fermentação das hexoses por bactérias heterofermentativas apresenta um efeito inibidor duplo, primeiramente por sua própria atividade antagônica e também por criar um ambiente anaeróbio (OUWEHAND; VESTERLUND, 2004). O mecanismo por trás da sua atividade é ainda desconhecido, porém sugere-se que seja pela inibição da descarboxilação enzimática e também porque seu acúmulo na bicamada lipídica pode causar disfunções na permeabilidade da membrana celular. Por causa da sua atividade antimicrobiana o dióxido de carbono é comumente utilizado como o principal componente na preservação de alimentos por atmosfera modificada (DEVLIEGHIERE; DEBEVRE, 2000).

2.4.2.2 Compostos antimicrobianos de baixa massa molecular

Existem vários artigos que reportam que bactérias lácticas produzem compostos de baixa massa molecular que apresentam atividade antimicrobiana (SILVA et al., 1987). Adicionalmente a sua baixa massa molecular esses componentes também dividem outras características em comum como a capacidade de serem ativados em baixo pH, serem termoestáveis, apresentarem uma atividade de amplo espectro e solúveis em acetona (ROSS et al., 2002). Ainda existem muitas dúvidas em relação à atividade antagônica dessas substâncias, se elas apresentam mesmo essa atividade ou sobre seu modo de ação, gerando uma certa incerteza sobre essa classe de compostos antimicrobianos (OUWEHAND; VESTERLUND, 2004).

2.4.2.2.1 Reuterina

Reuterina é uma substância antimicrobiana solúvel em água, efetiva em uma ampla faixa de pH, resistente a enzimas proteolíticas e lipolíticas, de amplo espectro de ação que foi originalmente descrita como advinda *do Lactobacillus reuteri* e atualmente é um dos mais estudados compostos inibidores de baixa massa molecular produzido por bactérias lácticas (TALARICO et al., 1988; AXELSSON et al., 1989; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2008).

Células injuriadas de bactérias lácticas que se desenvolvem em condições anaeróbias e na presença de glicose com glicerol ou gliceraldeído têm como única via para degradação do glicerol, aquela que passa pelo estado intermediário do 3-hidroxiopropanaldeído (reuterina, 3-HPA), que pode subseqüentemente ser reduzida a 1,3 propanodiol pela NADH + H⁺ desidrogenase (SLININGER et al., 1983; VEIGA DA CUNHA; FOSTER, 1992; EL-ZINEY et al., 1998). Durante a fase logarítmica do crescimento desses microrganismos nenhuma reuterina é produzida, pois é necessário que toda a glicose seja reduzida pelo seu metabolismo, e só quando inicia a fase estacionária é que a reuterina começa a ser acumulada (TALARICO; DOBOGROSZ, 1989; DOLEYRES et al., 2005). Em soluções aquosas a reuterina pode estar presente sob três formas, sendo principalmente a monomérica, variavelmente a monomérica hidratada e raramente a cíclica dimérica, não sendo conhecida a forma ou qual combinação dessas formas seja biologicamente mais ativa (TALARICO et al., 1988; VOLLENWEIDER et al., 2003).

A atividade antimicrobiana da reuterina é de amplo espectro, atingindo bactérias Gram positivas e Gram negativas, fungos, vírus e protozoários, não havendo nenhum registro de possíveis efeitos negativos em células humanas, mesmo tendo a capacidade de atravessar tecidos biológicos da mesma forma que glutaraldeído (LIANG et al., 2003; SUNG et al., 2003; VOLLENWEIDER; LACROIX, 2004; CLEUSIX et al., 2007). A forte atividade pode ser explicada pelo mecanismo de ação, pois sugere-se que os grupamentos hidroxila e aldeídos possam reagir contra enzimas do grupo sulfidril alterando a funcionalidade, mas o principal mecanismo é baseado na hipótese que sua estrutura hemiacetálica possa dar origem a uma reação entre o grupo aldeídico e o grupo da hidroxila terminal, produzindo uma molécula semelhante a uma pentose, como a D-ribose. Assim, a reuterina re-estruturada funciona como um análogo da D-ribose capaz de competir com os ribonucleotídeos pelos sítios de reconhecimento da ribonucleotídeo redutase interferindo

diretamente na síntese de DNA pela inibição da conversão dos ribonucleotídeos a desoxirribonucleotídeos (TALARICO; DOBOGROSZ, 1989; TALARICO et al., 1990).

2.4.2.2.2 *Reuteri*

Outro composto de baixa massa molecular isolado de espécies de *Lactobacillus reuteri* é a reuteri, que apresenta atividade antagonística a bactérias Gram positivas, mas não apresenta atividade frente a bactérias Gram negativas, bolores e leveduras (OUWEHAND; VESTERLUND, 2004).

Reuteri é um derivado do ácido tetrâmico estruturalmente relacionado com o ácido tenuazônico e destaca-se dos outros compostos produzidos pelas bactérias lácticas pela sua atividade biológica e sua estrutura química. A elevada toxicidade do ácido tenuazônico impede sua aplicação clínica, mas como a reuteri não se assemelha com este ácido em termos de citotoxicidade seu amplo espectro inibitório é potencialmente útil para utilização como antimicrobiano em tratamentos clínicos e aplicações alimentares (GANZLE et al., 2000).

2.4.2.3 Ácido fenilático

Lavermicocca et al. (2000) relataram a produção de ácido fenilático e de ácido 4hidroxi-fenilático por *Lactobacillus plantarum* 21B, isolado de massa de pão com atividade antifúngica frente a várias espécies de fungos filamentosos. O ácido fenilático também foi identificado em sobrenadantes de culturas de *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 (STRÖM et al., 2002), *Lactobacillus coryniformis* cepa Si3 e em cepas de *Pediococcus pentosaceus* e *Lactobacillus sakei* (MAGNUSSON et al., 2003).

Além da ação antifúngica constatou-se que o ácido fenilático também é o metabólito envolvido na formação do flavor de queijos e é produzido por cepas de bactérias lácticas durante a degradação da fenilalanina e da tirosina (YVON et al., 1998; KIERONCZYK et al., 2003). Considerando que as bactérias lácticas são muito utilizadas como culturas iniciadoras na produção de vários alimentos fermentados, a avaliação da produção de ácido

fenilático por linhagens representativas de quase todas as espécies envolvidas na transformação de alimentos é de elevada importância para a aplicação desses metabólitos como agentes antimicrobianos e/ou precursores de compostos formadores do aroma (VALERIO et al., 2004).

Similar a atividade de outros ácidos fracos utilizados como preservativos (ácido propiônico, benzóico e sórbico) e a ácidos orgânicos como ácido málico, ácido láctico, ácido cítrico e ácido acético, a atividade do ácido fenilático (pKa 3,46) é dependente do pH do meio, indicando que seu modo de ação apresenta alguma relação com as propriedades lipofílicas que capacitam a forma não dissociada desses ácidos a penetrar as membranas celulares dos microrganismos (GOULD, 1996, ARMAFORTE et al., 2006).

As concentrações de ácido fenilático necessárias para a demonstração de uma atividade antifúngica são geralmente menores daquelas necessárias para a inibição do desenvolvimento de bactérias, sendo que concentrações em mg. mL⁻¹ já são suficientes para demonstrar efeitos antagônicos, podendo haver também sinergia entre outros compostos produzidos pelo metabolismo das BAL para ampliar a eficácia da sua atividade antimicrobiana (LAVERMICOCCA et al., 2000; LAVERMICOCCA et al., 2003).

2.4.2.4 Ácidos graxos

Bactérias lácticas lipolíticas apresentam a capacidade de produzir grandes quantidades de ácidos graxos de ação antimicrobiana e que também contribuem com a qualidade sensorial dos alimentos fermentados (BERGSSON et al., 2001).

Através de ensaios de purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de compostos advindos da fermentação por *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14 foi possível encontrar 3 ácidos graxos hidroxilados que apresentavam forte atividade antifúngica (SJÖGREN et al., 2003).

Enquanto cadeias longas de ácidos graxos eram investigadas, Woolford (1975) observou que a atividade antimicrobiana era diretamente proporcional ao comprimento da cadeia, sendo que o ácido caprílico (C8) e ácidos graxos de cadeia longa são geralmente os mais eficientes, exceto o ácido undecanóico (C11) pelo fato de que ácidos graxos com cadeias com mais de 10 carbonos apresentam baixa solubilidade em água (BERGSSON et al., 1998).

Ácidos graxos hidroxilados têm uma grande atividade antifúngica contra um amplo espectro de bolores e leveduras, exercendo sua ação antagônica em concentrações entre 10–100 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, sendo necessárias menores concentrações para leveduras que são geralmente mais sensíveis a estes ácidos do que os bolores. A dose utilizada desses ácidos graxos hidroxilados pode ser comparada com a de drogas antifúngicas padrões como a anfotericina B que também apresenta atividade em concentrações de $\mu\text{g. mL}^{-1}$ (MCGINNIS; RINALDI, 1991; SJÖGREN et al., 2003).

A produção de ácidos graxos hidroxilados é linear com o crescimento bacteriano, indicando que ela não resulta da lise celular. O papel metabólico desses ácidos graxos hidroxilados não foi totalmente elucidado e suas atividades antifúngicas no ecossistema natural ainda não são conhecidas. Apesar do mecanismo de ação desses lipídeos ainda ser desconhecido estudos por microscopia eletrônica sugerem que sua ação antagônica seja pela ruptura das membranas celulares dos microrganismos afetados (BRUL; COOTE, 1999; SJÖGREN et al., 2003).

2.4.2.5 Dipeptídeos cíclicos

Dipeptídeos cíclicos são compostos que apresentam atividades biológicas muito conhecidas como inibição de PAI-1 (inibidor do ativador de plasminogênio), de α -glucosidase e de glicogênio fosforilase; atividade antibacteriana, antifúngica e antitumoral (MARTINS et al., 2006.)

Niku-Paavola et al. (1999) descobriram novos tipos de compostos antimicrobianos em um filtrado de uma cultura de *Lactobacillus plantarum* VTT E-78076. A fração ativa incluía ácido benzóico, 5-metil-2,4-imidazolidinediona (metilhidantoína), tetrahydro-4-hidroxi-4metil-2H-pirano-2-ona (mevalonolactona) e ciclo (glicil-L-leucil).

Ström et al. (2002) encontraram dois peptídeos cíclicos, o ciclo (Phe-Pro) e o ciclo (Phe-OH-Pro) no sobrenadante de culturas de *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393.

O efeito antimicrobiano de diversos tipos de ciclo dipeptídeos já foi investigado por Graz et al., 1999; Ganzle et al., 2000 e Graz et al., 2001. Magnusson et al. (2003) encontraram que ciclo (Phe-Pro) and ciclo (Phe-OH-Pro) também foram produzidos por cepas de *Lactobacillus sakei* e *Lactobacillus coryniformis*. Os dipeptídeos cíclicos têm

atividade antifúngica a concentrações de mg. mL^{-1} sendo esta menos efetiva do que a dos ácidos graxos hidroxilados. Foram encontradas baixas concentrações de alguns dipeptídeos cíclicos presentes no MRS (meio de enriquecimento e Agar) e outros meios para o crescimento de bactérias láticas, porém as concentrações detectadas não eram suficientes para exercer ação inibitória nos bioensaios utilizados durante a purificação (SCHNÜRER; MAGNUSSON, 2005).

Yang e Chang (2010) ao purificarem compostos antifúngicos produzidos por cepas de *Lactobacillus plantarum* AF1 isoladas de kimchi, identificaram que a atividade era devida a um dipeptídeo cíclico caracterizado como 2,5-piperazinediona ou ciclo (Leu-Leu), sendo o primeiro relato da produção por bactérias láticas de um composto que apresenta alguma atividade antifúngica pertencente ao grupo das 2,5-diquetopiperazinas. Para a visualização de um potencial na utilização deste composto na preservação de alimentos, grãos de soja tratados com sobrenadantes de culturas de *Lactobacillus plantarum* AF1 apresentaram resistência ao desenvolvimento de *Aspergillus flavus* ATCC 2254 e demonstraram grande potencial biopreservativo para utilização em alimentos e rações.

2.4.2.6 Compostos protéicos

A produção de peptídeos antimicrobianos é a primeira linha de defesa de muitas espécies para manter a sua existência ou seu nicho ecológico, fazendo parte da imunidade de mamíferos, aves, anfíbios, insetos, plantas e microrganismos (RILEY; GORDON, 1999). Embora o grupo de peptídeos antimicrobianos seja diversificado, seus integrantes geralmente apresentam características em comum como um terminal hidrofóbico e hidrofílico, tamanho que varia de 20 a 50 aminoácidos e propriedades catiônicas (DYKES, 1995; DAW; FALKINER, 1996).

Bacteriocinas são compostos sintetizados ribossomicamente por bactérias láticas como ferramenta para inibir o crescimento de outros microrganismos competitivos e garantir a sua permanência no meio, esses compostos são encontrados na maioria das espécies pesquisadas até hoje, porém só algumas são extensivamente estudadas (YANG; RAY, 1994; NES et al., 1996). Apesar das bacteriocinas serem consideradas semelhantes aos antibióticos, diferem de tais compostos em vários aspectos críticos, como o fato de serem

ribossomicamente sintetizadas; pelas células hospedeiras apresentarem imunidade; seu modo de ação ser diferente dos antibióticos e terem um restrito espectro de ação geralmente destruindo apenas bactérias estritamente relacionadas com a linhagem produtora (ABEE et al., 1995; CLEVELAND et al., 2001).

As bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas são geralmente divididas em 3 grupos: classe I – lantibióticos; classe II – pequenos peptídeos termoestáveis; III – grandes proteínas termolábeis (NASCIMENTO *et al.*, 2008). Esses compostos têm ação apenas contra estritos gêneros de bactérias não havendo evidências sobre seu efeito no desenvolvimento de bolores e leveduras (PIARD; DESMAZEAUD, 1991; OUWEHAND; VESTERLUND, 2004). Em contraste com a vasta literatura sobre bacteriocinas, são encontrados poucos artigos sobre a existência de peptídeos antifúngicos produzidos por bactérias lácticas (SCHNÜRER; MAGNUSSON, 2005).

Vários autores reportam casos onde a atividade antifúngica de certas espécies de BAL foi anulada após o tratamento do meio por enzimas proteolíticas, indicando que o composto com atividade inibitória era de natureza protéica, porém são escassos os relatos de purificação de compostos protéicos antifúngicos derivados de bactérias lácticas (MAGNUSSON; SCHNÜRER, 2001).

Roy et al. (1996) isolaram uma linhagem de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* com atividade antagônica a vários fungos filamentosos e após tratamento com quimotripsina, tripsina e pronase a atividade desapareceu indicando a natureza protéica do composto inibidor. Gourama (1997) constatou que o efeito inibitório de uma linhagem de *Lactobacillus casei* contra duas espécies de *Penicillium* foi levemente reduzido com o tratamento com tripsina e pepsina. Gourama e Bullerman (1995b, 1997) demonstraram a capacidade de um inoculante comercial de silagem que continha espécies combinadas de *Lactobacillus* (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus*) em exercer atividade antifúngica e antiaflatoxina contra *Aspergillus flavus* e constataram que a atividade inibitória era nulificada quando submetida a tratamentos com tripsina e α -quimotripsina chegando à conclusão que ela era devida a dois pequenos peptídeos (1 kDa).

Okkers et al. (1999) caracterizaram um peptídeo de cadeia média, derivado do *Lactobacillus pentosus* que induziu a formação de pseudohifas e teve ação antifúngica sobre *Candida albicans*, tal peptídeo não teve a atividade testada contra bolores. Um composto protéico derivado de *Lactobacillus coryniformes* subsp. *coryniformes* cepa Si3 demonstrou uma ação antifúngica frente a alguns bolores e leveduras, sendo esse peptídeo

pequeno (aproximadamente 3 kDa), estável ao calor, ativo em uma faixa de pH de 3 a 6 e totalmente inativado pela proteínase K (MAGNUSSON; SCHNÜRER, 2001). A produção de peptídeos antifúngicos seguiu a mesma cinética da produção da bacteriocina amilovorin L471 derivada do *Lactobacillus amylovorus* (CALLEWAERT et al., 1999), da lactocin S do *Lactobacillus sakei* e do peptídeo fungistático TV35b do *Lactobacillus pentosus* (OKKERS et al., 1999; MAGNUSSON; SCHNÜRER, 2001).

Quando uma cultura líquida de uma linhagem de *Lactobacillus coryniformes* Si3 foi suplementada com etanol, ácido fórmico ou acético houve um aumento no conteúdo total de peptídeos antifúngicos (MAGNUSSON; SCHNÜRER, 2001). Os dados obtidos sugeriram que os peptídeos antifúngicos são hidrofóbicos e rapidamente adsorvidos pelas células produtoras ou alternativamente formam agregados espontâneos (SCHNÜRER; MAGNUSSON, 2005). Atanossova et al. (2003) caracterizaram compostos protéicos antimicrobianos de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* M3, com ampla atividade antibacteriana e fungistática contra 4 das 26 espécies de leveduras testadas. Apesar de descreverem dificuldades na purificação, eles isolaram e sequenciaram uma proteína hidrofóbica de aproximadamente 43 kDa que apresentava máxima atividade em pH 6.

Levando-se em conta as pesquisas existentes e o largo caminho a ser percorrido acredita-se que cada vez mais serão isolados e purificados novos compostos protéicos com atividade antagônica a bolores e leveduras, pois técnicas mais eficientes e equipamentos mais modernos são as principais ferramentas para as novas descobertas da microbiologia das bactérias lácticas e sua aplicação na inibição do desenvolvimento fúngico.

2.4.3 Potencial Aplicação de Bactérias Lácticas na Detoxificação de Micotoxinas

Durante décadas de pesquisas uma série de estratégias vem sendo desenvolvida visando a remoção de micotoxinas em alimentos e rações. A descontaminação através de métodos físicos e químicos vem sendo estudada e empregada extensivamente, porém poucos desses métodos apresentam uma aplicação prática viável (PIVA et al., 1995; HUWIG et al., 2001; DIAZ et al., 2004).

Apesar de existirem vários métodos que podem ser aplicados para a remoção de micotoxinas, muitos deles não podem ser largamente utilizados devido ao alto custo ou por dificuldades na aplicação prática do processo. Vários adsorventes físicos têm

sido exhaustivamente estudados e já estão disponíveis comercialmente para aplicação na alimentação animal, entretanto, muitos apresentam alta especificidade a um determinado grupo de micotoxinas, mostrando pouca ou nenhuma atuação frente a outros grupos (HUWIG et al., 2001).

Especialistas dividem a opinião de que a melhor abordagem para a descontaminação venha a ser a utilização de microrganismos especificamente selecionados para essa função, gerando a possibilidade de remoção de micotoxinas sob condições menos agressivas, não necessitando a utilização de agentes químicos prejudiciais a saúde e sem gerar perdas significativas no valor nutricional e na palatabilidade dos alimentos descontaminados (BATA; LÁSZTITY, 1999).

Estudos sobre a descontaminação biológica de micotoxinas por microrganismos vêm sendo realizados e vários resultados foram publicados (BATA; LASZTITY, 1999; STIRYAK; KONKOVA, 2002), muitos comprovando a capacidade de descontaminação que as bactérias lácticas apresentam (SHETTY; JESPERSEN, 2006) e vários confirmando a eficiência e capacidade de diferentes linhagens de bactérias lácticas na detoxificação de diferentes micotoxinas, entre elas o desoxinivalenol (EL-NEZAMI et al., 2002b; NIDERKORN et al., 2006; BIANCHINI; BULLERMAN, 2010).

Ainda não se conhece ao certo o mecanismo utilizado pelas bactérias lácticas para a remoção de micotoxinas dos meios aonde são aplicadas, mas na maioria dos estudos publicados, a atividade de remoção se dá pela adsorção destas pela parede celular das bactérias lácticas (SHETTY; JESPERSEN, 2006). A estabilidade das interações que envolvem a atividade detoxificante é dependente das cepas utilizadas, do tratamento aplicado (ácido, básico, térmico) e das condições ambientais, sendo muito importante a avaliação e compreensão de como diferentes espécies e linhagens se comportam sob diferentes condições ambientais para que assim seja avaliado o potencial das bactérias lácticas na aplicação como agentes descontaminantes no processamento de alimentos ou como agentes seqüestrantes no trato gastrointestinal de seres humanos e animais (EL-NEZAMI et al., 2002a).

Como toda bactéria Gram positiva, as bactérias lácticas têm a parede celular composta em sua maior parte por uma camada de peptidoglicano e em menor parte por ácidos teicóico e lipoteicóico, camada protéica S e polissacarídeos neutros. Tais componentes são responsáveis por várias funções incluindo a adesão e a captura de macromoléculas. Estudos sugerem que peptidoglicano e os polissacarídeos atuam da mesma maneira e proporção na captura de micotoxinas, porém recentes pesquisas envolvendo degradação enzimática demonstraram que os polissacarídeos apresentaram maior capacidade frente ao

peptideoglicano e também mostraram a participação da camada protéica (ZHANG; OHTA, 1991; HAZKARD et al., 2001).

O potencial para as futuras aplicações de bactérias lácticas visando a redução de micotoxinas é dependente da estabilidade das interações formadas entre micotoxina e bactéria. No caso de fracas interações, micotoxinas podem ser liberadas pela contínua lavagem da superfície da bactéria durante passagem no trato gastrointestinal, por isso, vários estudos vem tentando monitorar a estabilidade desses complexos formados e concluíram que a força das interações depende basicamente da linhagem do microrganismo e das condições ambientais (FAZELI et al., 2009). A força da interação entre micotoxina -bactéria láctica é influenciada pela estrutura de peptideoglicano e mais precisamente, pela sua composição de aminoácidos (NIDERKORN et al., 2009). O fato das bactérias lácticas não viáveis conservarem uma alta capacidade de interação é um ponto essencial que deve ser levado em conta; observou-se que a conservação da viabilidade das bactérias é visivelmente reduzida pelas condições de baixo pH apresentadas no estômago e mesmo bactérias lácticas que apresentavam adesão às paredes do trato gastrointestinal perderam essa capacidade após interagirem com micotoxinas como a aflatoxina B1 (GRAZ et al., 2001). No trato gastrointestinal o complexo bactéria-micotoxina é rapidamente excretado, demonstrando que a utilização de bactérias lácticas com essa capacidade pode ser benéfica a seres humanos e animais constantemente expostos a micotoxinas, por reduzir a absorção destas micotoxinas e aumentar a excreção das toxinas ligadas às células bacterianas. Todas essas discussões claramente ilustram o fato de que qualquer resultado *in vitro* deve ser acompanhado de experimentos *in vivo* envolvendo as espécies em questão como forma de monitorar o real efeito das bactérias lácticas da biodisponibilidade e toxicidade das micotoxinas envolvidas no processo (DALIÉ et al., 2010).

De acordo com os resultados das pesquisas existentes, os microrganismos são os principais organismos vivos que apresentam potencial aplicabilidade na detoxificação de micotoxinas em alimentos. A criteriosa seleção de microrganismos pode levar à detecção de bactérias mais eficientes e de melhor aplicação. Primeiramente devem ser estudados aqueles microrganismos que apresentam resistência às micotoxinas, pois vêm sendo encontradas diferenças na sensibilidade e na seletividade destes microrganismos frente à elas, bem como se deve conhecer o mecanismo de descontaminação utilizado por tais microrganismos, para que os possíveis produtos da degradação não sejam igualmente tóxicos ou alterem as características sensoriais nos alimentos aonde são aplicados e para que sejam utilizados aqueles microrganismos que apresentem uma alta capacidade de absorção, sendo

todos esses fatores importantes para que tecnologias viáveis e eficientes venham a ser desenvolvidas na área da descontaminação (BATA; LÁSZTITY, 1999).

Muitas dúvidas devem ser resolvidas antes que a aplicação das bactérias lácticas seja levada a nível industrial. Dentre estas, a liberação após a ingestão das micotoxinas aderidas necessita de estudos adicionais bem como a toxicidade da micotoxina aderida comparada com a da micotoxina livre. Mesmo assim, a utilização das bactérias lácticas e dos seus metabólitos no controle do crescimento fúngico e acúmulo de micotoxinas constitui numa ferramenta promissora como estratégia de biopreservação para alimentos perecíveis ou freqüentemente contaminados por cepas de fungos micotoxigênicos como *F. graminearum* incluindo vegetais, frutas e cereais. A aplicação de bactérias lácticas tem sido muito limitada a alimentos fermentados, mas pesquisas vêm sendo conduzidas para que linhagens de bactérias lácticas reconhecidas como seguras ao consumo e que não tenham impacto algum no sabor e aparência do alimento suplementado, possam vir a ser aplicadas com o intuito da prevenção do crescimento fúngico e descontaminação de micotoxinas (DALIÉ et al., 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Tendo em vista o potencial que diferentes espécies de bactérias lácticas apresentam na inibição do crescimento fúngico e na detoxificação de algumas micotoxinas, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a atividade inibitória de diferentes cepas de bactérias lácticas frente a *F. graminearum* e a capacidade de descontaminação da micotoxina desoxinivalenol em meio líquido.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Enumerar, isolar e identificar bactérias lácticas de diferentes fontes;
- Avaliar a atividade inibitória de bactérias lácticas isoladas e de culturas comerciais frente ao fungo *F. graminearum* por ensaios *in vitro*;
- Avaliar a atividade inibidora do pH do meio, da concentração de caldo MRS e dos ácidos láctico e acético sobre o fungo estudado;
- Avaliar a capacidade de detoxificação da micotoxina desoxinivalenol das diferentes cepas de bactérias lácticas.
- Avaliar a interferência de diferentes tratamentos térmicos aplicados às células de bactérias lácticas na sua capacidade de detoxificação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina -PR.

4.1 CONTAGEM, ISOLAMENTO E ARMAZENAMENTO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS

As bactérias lácticas foram isoladas de amostras de trigo em grãos; farelo de trigo; germem de trigo; farinha de trigo para quibe, farinha de trigo branca; farinha de trigo integral e de sourdough (mistura estável de bactérias e leveduras obtidas através de uma mistura de água, farinha e uma massa previamente levedurada).

As amostras de trigo em grãos, farinha branca e farinha integral foram doadas por um moinho da cidade de Cafelândia-PR; a amostra de sourdough foi obtida por doação no município de Medianeira-PR e as demais amostras foram adquiridas em supermercados da cidade de Londrina-PR.

Além dos produtos derivados do trigo, também foram isoladas bactérias lácticas de uma cultura de kefir composta por bactérias lácticas, bactérias acéticas e leveduras, proveniente da cidade de Adelaide, Austrália.

Para garantir o correto preparo das amostras, os grãos e a farinha de trigo para quibe que consistiam em partículas maiores e que dificultavam a homogeneização foram trituradas em moinho analítico antes da etapa de homogeneização e diluição e as demais amostras seguiram sem nenhum tratamento.

Foram transferidas 25 g de cada amostra para um saco de stomacher, adicionados 225 mL de água destilada peptonada tamponada 0,1% estéril (ADPT, Himedia, Mumbai, Índia) e homogeneizadas por 2 minutos. Após a homogeneização as amostras ficaram em repouso por 10 minutos antes da diluição seriada em ADPT 0,1% até a décima diluição (10^{-10}).

De cada diluição foram retiradas alíquotas de 1 mL e semeadas pelo sistema de dupla camada no meio de cultura Agar Lactobacillus MRS (DeMan, Rogosa e Sharpe;

Himedia, Mumbai, Índia) dispensados em placas de Petri estéreis (150 x 15 mm) e então incubadas de forma invertida em estufa bacteriológica regulada a 37 ± 1 °C por 48 horas.

Para a cultura de kefir australiana, foram pesados 10 g de grãos ativos e diluídos em 90 mL de ADPT 0,1% para então as outras etapas serem levadas adiante.

Após o período de incubação houve a contagem das colônias e para o isolamento, foram preferencialmente selecionadas as colônias maiores, lisas, brancas e com bordas definidas (aproximadamente duas por diluição) para serem repicadas por esgotamento sobre a superfície de placas de Agar MRS com o auxílio de uma agulha bacteriológica de níquel cromo (Figura 2). Tais placas foram incubadas em estufa bacteriológica regulada a 37 ± 1 °C por 48 horas.

O procedimento de repique foi repetido por três vezes, para assim garantir o isolamento de colônias puras.

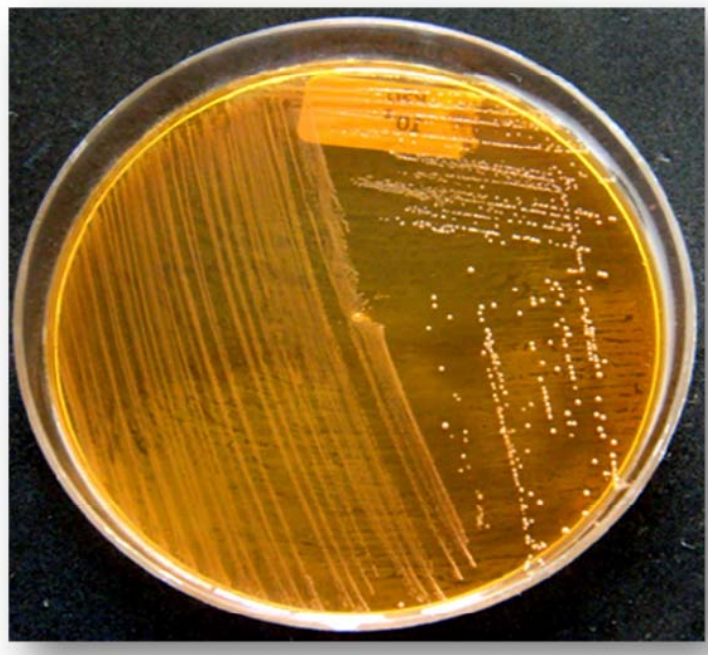


Figura 2 – Isolamento de colônias de bactérias lácticas por esgotamento em Agar MRS.

As colônias do último repique foram repassadas para tubos contendo 10 mL de caldo MRS (DeMan, Rogosa e Sharpe; Himedia, Mumbai, Índia), incubadas por 37 ± 1 °C por 24 horas, repassadas para tubos com Agar MRS de forma inclinada, incubadas a 37 ± 1 °C

por 24 horas, para então serem confirmadas quanto à morfologia, coloração pelo método de Gram e prova de catalase (Anexo A).

As colônias que apresentaram as características pertencentes ao grupo das bactérias láticas (cocos ou bacilos Gram positivos e catalase negativos) foram repicadas em tubos com tampa de rosca que continham Agar MRS sob forma inclinada, incubadas a 37 ± 1 °C por 24 horas e então armazenadas sob refrigeração (5 ± 1 °C) (TOBÍA et al., 2003).

Para a manutenção por um período prolongado, as colônias inoculadas em caldo MRS e incubadas a 37 ± 1 °C por 24 horas tiveram a adição de 15% de glicerol como crioprotetor e foram armazenadas a aproximadamente -20 ± 1 °C (TOBÍA et al., 2003; MUYINCK et al., 2004; MOYANO et al., 2008).

Para a reativação das culturas após a criopreservação foram repassados 1 mL de cada cultura a 10 mL de caldo MRS e incubadas a 37 ± 1 °C/48h (BOTELHO, 2005).

Foram identificadas através do sistema de fermentação de carboidratos API 50 CH[®] (Biomérieux S.A, Marcy L'Etoile, França) as culturas correspondentes a cada produto e que apresentaram halos de inibição mais efetivos frente ao *F. graminearum* conforme ensaios descritos no item 4.2.

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGÔNICA DAS BACTÉRIAS LÁTICAS AO DESENVOLVIMENTO DO FUNGO MICOTOXIGÊNICO *Fusarium graminearum*

Além das cepas isoladas, também foram utilizadas culturas comerciais, sendo estas:

- Lyofast LPRA (*Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus plantarum*), Sacco.
- Lyofast BG112 (*Lactobacillus plantarum*), Sacco.
- Lyofast LA3 (*Lactobacillus acidophilus*), Sacco.
- LC 01 (*Lactobacillus casei*), Chr. Hansen.
- Yo-flex YC-180 (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*), Chr. Hansen.
- Florafit LP115 400B 100GM STD (*Lactobacillus plantarum*), Danisco.
- Choozit Helv A (*Lactobacillus helveticus*), Danisco.

- Yo-Mix (*Streptococcus thermophilus*; *Lactobacillus bulgaricus*), Danisco.

A cultura fúngica produtora de desoxinivalenol utilizada nos ensaios foi a IAPAR 2218 – *F. graminearum* (Instituto Agronômico do Paraná), isolada na região norte do Paraná e gentilmente cedida pelo Dr. Carlos Kemmelmeier do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá.

Para a avaliação da atividade antifúngica das bactérias lácticas isoladas e das culturas comerciais, dentre os vários métodos testados previamente, escolheu-se o método de difusão em Agar proposto por Corsetti et al., (1998) pois foi o que proporcionou uma melhor visualização do antagonismo. As determinações foram realizadas em duplicata.

4.2.1 Método de Difusão em Agar

Em uma placa de Petri estéril (150 x 15 mm) foram dispostos 10 mL de Agar dextrose batata (Himedia, Mumbai, Índia) previamente inoculado com a suspensão de propágulos de *F. graminearum* (item 4.2.1.1) a uma concentração de 10^4 propágulos. mL⁻¹ corrigida com o auxílio da Câmara de Neubauer (Anexo B).

Posteriormente à inoculação e solidificação do Agar, as placas foram levadas a uma estufa incubadora BOD regulada a uma temperatura de 22 ± 1 °C por um período de 24 horas.

Após o período de incubação, foram dispostos sobre a superfície do Agar discos de papel filtro número 01 (Whatman[®], Dassel, Alemanha) estéreis e apresentando 5 mm de diâmetro (Figura 3).

Sobre esses discos foram aplicados 100 µL da suspensão bacteriana (item 4.2.1.2), aguardou-se 30 minutos à temperatura ambiente para que houvesse a fixação do líquido nos discos e então as placas foram levadas a BOD regulada a 22 ± 1 °C, permanecendo incubadas por um período de 10 dias.

Houve também a realização da prova em branco, onde foram incubadas placas com discos não inoculados na superfície.

No decorrer do período total de incubação, os halos de inibição foram observados e mensurados com o auxílio de uma régua milimetrada e então os resultados foram expressos em uma escala de acordo com as medidas dos seus diâmetros.

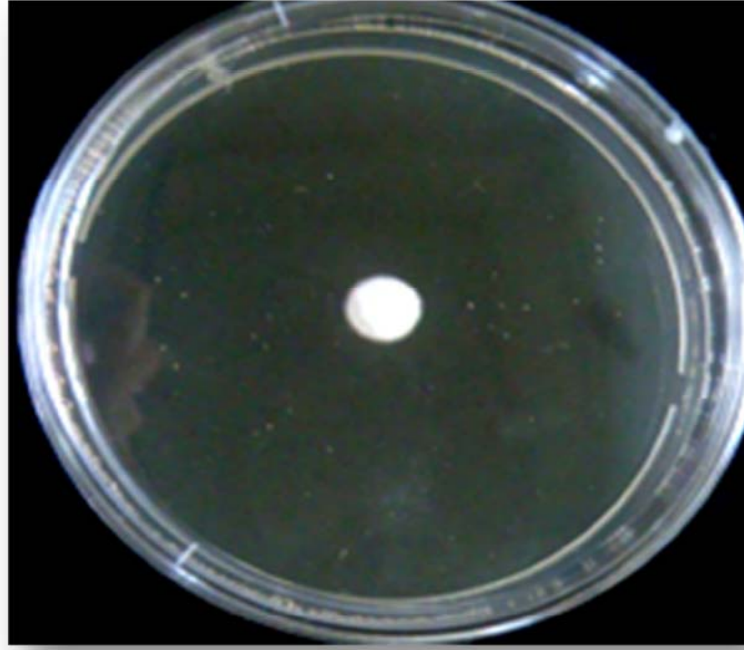


Figura 3 – Método de difusão em Agar.

4.2.1.1 Preparo da suspensão de propágulos

Para que a técnica pudesse ser realizada foi necessário o preparo de uma suspensão de propágulos do fungo utilizado, para isto, a cepa de *F. graminearum* foi repicada em tubos contendo Agar dextrose batata (bisel longo) e então estes foram incubados a 22 ± 1 °C por 07 dias.

O inóculo de propágulos foi preparado através da suspensão dos conídios em uma solução de cloreto de sódio 0,85% : tween 80 (9:1, v/v) e agitação realizada em agitador de tubos tipo Vortex (Labdancer, IKA[®], China) por aproximadamente 5 minutos para garantir um eficiente desprendimento destes conídios da superfície do meio de cultura.

Após agitação, o conteúdo líquido foi transferido para tubos de vidro esterilizados.

A determinação da concentração de propágulos foi realizada por contagem microscópica realizada com o auxílio de Câmara de Neubauer a um aumento óptico de 400 vezes.

4.2.1.2 Preparo da suspensão bacteriana

Os isolados e as culturas de bactérias lácticas que estavam armazenadas sob refrigeração (5 ± 1 °C) foram reativadas em tubos contendo caldo MRS e incubadas a 37 ± 1 °C/48h.

Após a incubação, transferiu-se o volume necessário de caldo MRS inoculado a um tubo contendo caldo MRS estéril até que essa suspensão se ajustasse ao tubo 10 da escala de Mac Farland (Anexo E), o que corresponde a uma concentração de aproximadamente $3,0 \times 10^9$ UFC. mL⁻¹, com visualização executada a olho nu, tendo como fundo um cartão de coloração branca.

4.3 TESTES SOBRE INFLUÊNCIA DE OUTRAS SUBSTÂNCIAS NO ANTAGONISMO AO DESENVOLVIMENTO DO FUNGO *Fusarium graminearum*

Foram realizados testes adicionais de inibição para avaliar a influência de algumas substâncias em particular, na atividade antagônica apresentada pelas bactérias estudadas.

4.3.1 Influência do pH do Meio

Inicialmente avaliou-se a sensibilidade do fungo frente a variação de pH do meio, para tal, discos em triplicata foram inoculados com 100 µL de meio de cultura MRS esterilizado e com pH corrigido para 1, 2, 3, 4, 5 e 6 com a adição de uma solução de ácido

clorídrico 3 Molar dando-se continuidade as demais etapas do método de difusão em Agar utilizado (De MUYNCK et al., 2004).

4.3.2 Influência da Concentração do Caldo MRS

O caldo MRS foi preparado de acordo com informações fornecidas pelo fabricante, porém aumentando as concentrações em 2, 4, 6, 8 e 10 vezes mais meio de cultura do que o indicado pelo fabricante para a mesma quantidade de água destilada (De MUYNCK et al., 2004).

Após o preparo do caldo, foram aplicados 100 µL destes sobre os discos e o procedimento seguiu em triplicata e como descrito no item 4.2.1.

4.3.3 Influência do Ácido Lático e do Ácido Acético

Foram preparadas soluções de ácido lático e acético em concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 % (volume/ volume) através da adição desses ácidos em sua forma pura ao caldo MRS estéril (SCHNÜRER; MAGNUSSON, 2005).

Foram aplicados 100 µL de cada solução sobre os discos e dado seqüência ao procedimento descrito em 4.2.1.

4.4 CLASSIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS PELO PADRÃO FERMENTATIVO ATRAVÉS DO KIT API 50 CHL

Após o isolamento, classificação inicial das bactérias e a avaliação da atividade antagônica frente a *F. graminearum*, aqueles microrganismos que apresentaram os maiores halos de inibição foram identificados através do kit API 50 CH[®] (Biomérieux S.A, Marcy L'Etoile, França) (Anexo D).

As galerias do kit foram inoculadas com o meio API 50 CHL[®] com uma concentração bacteriana de aproximadamente $6,0 \times 10^8$ UFC. mL⁻¹ (tubo 2 da escala de Mac Farland), encobertas por óleo mineral e incubadas em estufa regulada a 37 ± 1 °C por um período de 48 horas.

Após a retirada das galerias da estufa, houve a leitura dos resultados, onde a acidificação produzida foi traduzida pela viragem a amarelo do púrpura de bromocresol contido no meio e pelo teste de esculina (galeria 25) onde observa-se uma viragem para a coloração negra (Figura 4).

O perfil bioquímico assim obtido pôde ser identificado a partir de uma base de dados acessada pelo software APILAB[®] plus versão 4.0 (Biomérieux S.A, Marcy L'Etoile, França).

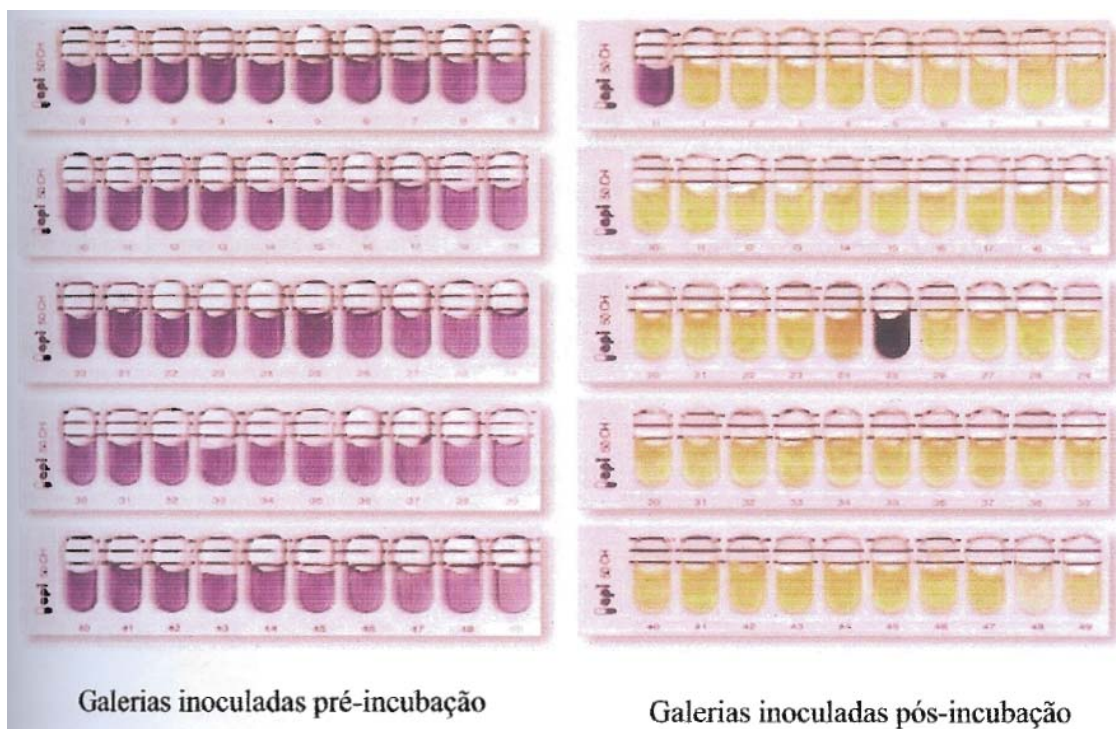


Figura 4 – Visualização da modificação da coloração do indicador púrpura de bromocresol de azul para amarelo e do teste de esculina na galeria 25.

4.5 ENSAIO DE DETOXIFICAÇÃO DO TRICOTECENO DESOXINIVALENOL

A metodologia aplicada foi baseada na utilizada por Niderkorn et al. (2006) e por Hernandez-Mendoza et al. (2009) com adaptações necessárias.

4.5.1 Preparo dos Padrões de Desoxinivalenol

O padrão de desoxinivalenol com 98% de pureza (Sigma, St Louis, Estados Unidos) foi suspenso em acetato de etila grau HPLC (J. T. Baker, Xalostoc, México) e sua absorvância mensurada a 260 nm (UV-VIS Cintra 20, GMB, Melbourne, Austrália).

Através do valor da absorvância, a concentração foi determinada utilizando-se a seguinte fórmula, conforme preconizado pelo Instituto Adolfo Lutz (2008):

$$\text{Concentração da micotoxina em } \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = \frac{A \times CF \times MM \times 1000}{E}$$

Onde:

A = absorvância da micotoxina;

CF = fator de correção do espectrofotômetro (conforme estimado: 0,95);

MM = Massa molecular da micotoxina desoxinivalenol (296);

E = absorvidade molar da micotoxina desoxinivalenol (1410).

Após a determinação da concentração, o padrão foi utilizado para o preparo da curva de calibração (250, 500, 750, 1000 e 1500 ng. mL⁻¹) e também para os padrões utilizados nos ensaios de detoxificação.

Para o preparo dos padrões para os ensaios, após a transferência das alíquotas destinadas a cada concentração para frascos de vidro âmbar, o acetato de etila foi evaporado a 40±1 °C com fluxo de nitrogênio gasoso e os padrões mantidos congelados (-20±1 °C) até o momento da sua utilização, quando foram ressuspensos em solvente apropriado.

Para o preparo dos padrões para a curva de calibração, após a evaporação do acetato de etila por fluxo de nitrogênio gasoso, o conteúdo de cada concentração foi ressuspensão em uma solução de metanol : água (30:70, v/ v, grau HPLC, J. T. Baker, Xalostoc, México) e armazenados a -20 ± 1 °C.

4.5.2 Preparo das Culturas de Bactérias Lácticas

As culturas foram reativadas em tubos de caldo MRS e incubadas (37 ± 1 °C/ 24h). Posteriormente 2 mL de cada cultura foi repassado para frascos de vidro borosilicato com tampa autoclavável (Boeco, Hamburg, Alemanha) contendo 200 mL de caldo MRS esterilizado, que foram levados a estufa (37 ± 1 °C) por 24 horas.

Os microrganismos foram enumerados pelo método de semeadura de dupla camada em placas com Agar MRS (37 ± 1 °C/ 48h).

Os frascos correspondentes a cada bactéria utilizada foram divididos em três diferentes tratamentos térmicos: grupo sem nenhum tratamento térmico (células viáveis); tratamento térmico por pasteurização (100 °C/ 30 min) e tratamento térmico por esterilização (121 °C/ 15 min) (SHAHIN, 2007).

Após a etapa dos tratamentos térmicos, para a obtenção da biomassa o caldo (contagem média de 10^{10} UFC. mL⁻¹ de bactérias lácticas) foi transferido para tubos de centrífuga de polipropileno estéreis com fundo cônico (CRAL, São Paulo, Brasil) e centrifugado em centrífuga refrigerada regulada a 5°C (Eppendorf[®]) a 3000g/ 10 minutos. A biomassa obtida foi lavada por 3 vezes com tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2 (Anexo E) e mais 3 vezes com água ultrapura estéril (Purelab Elga, Lane End, Inglaterra), ressuspensão em 20 mL de água ultrapura estéril e armazenada sob refrigeração até sua utilização.

4.5.3 Ensaio de Detoxificação

Para dar início ao ensaio de detoxificação a biomassa armazenada foi centrifugada (3000g/ 10 minutos/ 5°C), lavada por mais 2 vezes com água ultrapura e

ressuspensa em 850 μL de água ultrapura estéril sendo então transferida para microtubos de centrífuga (2mL, Axygen, Califórnia, Estados Unidos).

Os padrões de DON destinados ao ensaio foram ressuspensos em água ultrapura estéril e um volume de 150 μL foi transferido para os tubos com a suspensão de microrganismos, de forma que a concentração de DON para cada tubo atingiu 1500 ng. mL^{-1} .

Os ensaios foram então incubados a 37 ± 1 °C por 4 horas.

O teste para cada microrganismo foi realizado em duplicata assim como o controle positivo (solução de micotoxina sem a biomassa das bactérias lácticas) e controle negativo (suspensão da biomassa sem a adição de micotoxina).

4.5.4 Extração de Desoxinivalenol

Houve a necessidade de se utilizar uma metodologia de extração para a eliminação de qualquer composto que pudesse vir a interferir na análise quantitativa por HPLC.

A metodologia aplicada foi adaptada a partir da proposta por GARDA et al.(2004) que consiste em três partições sucessivas com cloreto de metileno (FMaia, São Paulo, Brasil), tendo apresentado uma recuperação média de 78,26% (coeficiente de variação de 13,33%).

A extração foi realizada com o ensaio e com os controles (positivo e negativo).

A etapa de extração seguiu os passos descritos nos próximos parágrafos:

Após o período de incubação as células foram separadas por centrifugação (Chibittan II, Millipore) por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente, filtrado (Millipore-Millex, HN nylon 0,45 μm) e disposto em frasco âmbar.

Para a extração foram utilizados 500 μL da amostra filtrada com 1000 μL de cloreto de metileno, sendo realizadas 3 partições com um tempo de contato de 10 minutos para cada partição.

Após as partições os extratos foram evaporados a 40 ± 1 °C com fluxo de nitrogênio gasoso e armazenados (-20 ± 1 °C) até o momento da análise.

4.5.5 Quantificação da Concentração de Desoxinivalenol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A micotoxina que estava armazenada foi ressuspensa em 100 µL de solução metanol: água (30:70, v/ v, grau HPLC, J. T. Baker, Xalostoc, México) e em seguida a quantificação do desoxinivalenol foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

O sistema utilizado consistiu em um cromatógrafo (Prominence LC-20AD, Shimadzu, Kyoto, Japão) com detector de arranjo de fotodiodo na faixa entre 180 e 400 nm (Prominence SPD-M20A UV/VIS, Shimadzu, Kyoto, Japão) e controlador (Prominence CBM-20A, Shimadzu, Kyoto, Japão), sendo que os dados foram avaliados por computador através do software LcSolution[®] (Shimadzu, Kyoto, Japão).

A coluna analítica de fase reversa utilizada foi a Phenomenex Luna[®] C-18 (5,00 µm, 25,0 cm x 21,20 mm), a qual foi protegida com uma pré-coluna (Security Guard Holder[®], Phenomenex).

As condições de trabalho utilizadas consistiram em fase móvel representada por metanol : água (30:70, v/ v, grau HPLC, J. T. Baker, Xalostoc, México) a uma vazão de 0,7 mL. min⁻¹, em temperatura ambiente, com um volume de injeção de 20 µL e tempo de retenção de 20 minutos.

Depois dos dados obtidos, o cálculo do percentual de micotoxina removida foi feito através da seguinte fórmula:

$$\text{Percentual de micotoxina removido} = 100 \times \frac{(1 - \text{área do ensaio})}{\text{Área do controle positivo}}$$

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram submetidos a análises de variância (ANOVA). A diferença significativa entre as médias (P<0,05) foi determinada através do teste de Tukey utilizando o software SAS 6.0 (Statistical Analysis System Institute, Cary, NC).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONTAGEM E ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS

Foram isoladas bactérias lácticas de ambientes ou alimentos associados à presença do fungo *F. graminearum* e que naturalmente pertencem a esses produtos ou habitats. Paralelamente foram feitas contagens em Agar MRS, meio de cultura rico em nutrientes que permite o crescimento da maioria das bactérias presentes em alimentos (ALMEIDA et al., 2007; SILVA et al., 2008), para assim obter dados sobre a microbiota láctica destes alimentos.

Tabela 1 – Contagem de bactérias lácticas presentes em produtos derivados do trigo e em grãos de kefir

Fonte	Contagem (log UFC. g ⁻¹) *
Trigo em grãos	2,05 ± 0,03 ^b
Farelo de trigo	3,53 ± 0,03 ^a
Germem de trigo	3,78 ± 0,02 ^d
Farinha de trigo para quibe	3,44 ± 0,05 ^a
Farinha de trigo branca	3,06 ± 0,04 ^c
Farinha de trigo integral	3,40 ± 0,06 ^a
Sourdough	6,77 ± 0,02 ^e
Grãos de kefir	8,89 ± 0,02 ^f

*Resultados das médias de contagem de triplicatas em Agar MRS ± desvio padrão.

** Letras diferentes indicam diferença a nível de 5% de significância entre as amostras.

***Incubação a 37±1°C por 48 horas.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 1, a contagem de bactérias lácticas variou na faixa entre 2,05 a 8,89 log UFC. g⁻¹, com menor contagem atribuída aos grãos de trigo e a maior aos grãos de kefir.

Os grãos de trigo são naturalmente contaminados por variados microrganismos, sendo que tanto a diversidade quanto a quantidade de microrganismos presentes é dependente de uma série de fatores como chuva, temperatura, danos físicos aos grãos e a aplicação de fungicidas ou inseticidas. As bactérias lácticas são encontradas em grãos de trigo e podem permanecer durante as diferentes fases de produção da farinha e também em produtos manufaturados com farinha de trigo, como alimentos fermentados a base de cereais e sourdough (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

Ao realizarem um estudo da taxonomia de bactérias lácticas isoladas de grãos e farinha de trigo, Corsetti et al. (2007) divulgaram uma contagem em placas de Agar MRS que variou em uma faixa de 1 a 2,16 log UFC. g⁻¹, quantidade semelhante a encontrada na contagem dos grãos utilizados nesse trabalho.

Nos produtos derivados do trigo houve um número maior de microrganismos que na amostra em grãos, isso pode ser devido ao fato de que durante o processo de moagem do trigo ocorre aspersão de água sobre os grãos para aumentar o teor de umidade e evitar rupturas durante a moagem do endosperma e também por ocorrer um aumento de umidade causado pela condensação do calor gerado pelo processo de moagem dentro dos equipamentos; essa umidade elevada adicionada ao acúmulo dos resíduos de farinha nas peças internas do moinho tornam esse ambiente extremamente favorável ao desenvolvimento de diversos microrganismos (BERGHOFER et al., 2003).

Dentre os produtos derivados do trigo não houve diferença significativa a nível de 5% entre farelo de trigo, farinha de trigo para quibe e farinha de trigo integral, havendo a possibilidade de que essa semelhança possa ser atribuída ao fato de que microrganismos que contaminam os cereais, incluindo as bactérias lácticas, ficam concentrados nas camadas externas do grão e tendem a permanecer com as frações ricas em farelo durante o processo de moagem (VALERIO et al., 2009).

Sourdough constitui-se basicamente de uma mistura de farinha e água, fermentada naturalmente pela ocorrência de bactérias lácticas, acéticas e leveduras, microrganismos esses originários principalmente da farinha e dos equipamentos do processo de produção da mesma, sendo as bactérias lácticas os microrganismos dominantes em números médios de 8 log UFC. g⁻¹ (EHRMANN; VOGEL, 2005; GOBBETTI et al., 2008). A contagem média obtida neste estudo foi de 6,77 log UFC. g⁻¹ e se encontra próxima da contagem característica para o produto sendo condizente também com os números publicados por Vogelmann et al. (2009) na faixa de 6,70 log. UFC. g⁻¹.

Os grãos de kefir são estruturas formadas por uma cadeia de polissacarídeos chamada kefiran que recobre a microbiota dos grãos formada na sua maioria por bactérias lácticas e leveduras (LEE et al., 2007). A contagem de bactérias lácticas obtida para os grãos de kefir ($8,89 \pm 0,02 \log \text{UFC. g}^{-1}$) foi semelhante à encontrada em diversas publicações; Michel et al. (2010) ao avaliarem a diversidade das bactérias encontradas em grãos de kefir provenientes dos Estados Unidos e diferentes estados brasileiros encontraram números que variaram na faixa de 4,95 a 10,43 $\log \text{UFC. g}^{-1}$, Garrote et al. (1997) encontraram valores na faixa de 9,20 $\log \text{UFC. g}^{-1}$. Deve-se considerar que a quantidade de bactérias lácticas bem como os grupos de microrganismos encontrados é extremamente variável, podendo mudar significativamente a cada vez que a bebida é produzida e os grãos retirados para a próxima batelada (SIMOVA et al., 2002).

Após contagem e isolamento conforme visualizado na Tabela 2, cerca de 20 colônias por amostra foram submetidas aos testes confirmativos por morfologia, coloração de Gram e catalase. Como resultado, das 160 colônias isoladas 91 foram confirmadas como bactérias lácticas pelos testes presuntivos, representando 56,9 % dos microrganismos isolados.

Como forma de realizar uma triagem para posterior identificação pelo kit API 50 CH[®], a atividade antagônica das cepas isoladas frente ao fungo *F. graminearum* foi avaliada pelo método por difusão em Agar, e os resultados estão dispostos no item 6.4.

Após o período de incubação os diâmetros dos halos foram mensurados e classificados de acordo com o proposto por Rouse et al. (2008) em escala que variou de (-) que corresponde a ausência de atividade a (++++), que condiz a uma inibição expressiva com halos de diâmetro maior que 15 mm. A escala pode ser visualizada na Figura 5.

Tabela 2 – Percentual de bactérias lácticas isoladas dos produtos derivados do trigo e grãos de kefir.

Fonte	Quantidade de cepas isoladas	Cepas Gram (+)	Cepas catalase (-)	Percentual de BAL (%)
Trigo em grãos	20	09	08	40
Farelo de trigo	20	12	12	60
Germem de trigo	20	15	14	70
Farinha de trigo para quibe	20	11	08	40
Farinha de trigo branca	20	14	12	60
Farinha de trigo integral	20	13	11	55
Sourdough	20	16	12	60
Grãos de kefir	20	15	14	70
Total	160	105	91	56,9

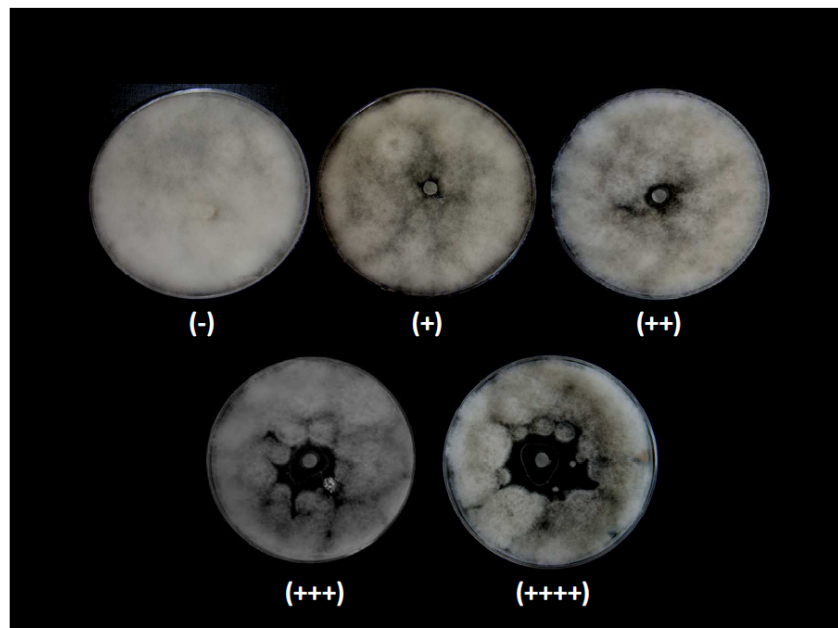


Figura 5 – Escala de inibição onde: (-): nenhuma inibição; (+): inibição muito fraca com halos de 1 a 15 mm; (++): inibição moderada com halos de 16 a 30 mm; (+++): inibição média com halos de 31 a 45 mm e (++++): inibição extensiva com halos maiores que 45 mm.

A Tabela 3 relaciona a morfologia das cepas isoladas de cada produto com a atividade antifúngica encontrada, sendo constatado que a grande maioria dos isolados que apresentaram inibição eram bastonetes.

As amostras que demonstraram um maior número de isolados relacionados com a atividade antifúngica foram os grãos de kefir, seguidos do sourdough. Estudos realizados por Hassan e Bullermam (2008) isolaram de 4 massas de sourdough diferentes espécies de *Lactobacillus* com atividade antifúngica frente a *F. graminearum*.

Tabela 3 – Distribuição percentual de microrganismos inibidores de *F. graminearum* segundo a morfologia das bactérias isoladas.

Fonte	Cocos	Bastonetes	Total	Número de isolados antifúngicos	Percentual de isolados antifúngicos	
					Cocos	Bastonetes
Trigo em grãos	2	6	8	3	0	100
Farelo de trigo	6	6	12	3	33,3	66,6
Germem de trigo	4	10	14	5	0	100
Farinha de trigo para quibe	6	2	8	2	0	100
Farinha de trigo branca	3	9	12	4	0	100
Farinha de trigo integral	4	7	11	4	0	100
Sourdough	6	6	12	5	20	80
Grãos de kefir	5	9	14	6	0	100

Os melhores resultados de inibição foram provenientes das cepas denominadas como trigo em grãos VIII (TG VIII), farelo de trigo VI (FT VI), germem de trigo III (GT III), farinha de trigo para quibe (FTQ VII), farinha de trigo branca (FB VII), farinha de trigo integral IX (FI IX), sourdough I (S I) e kefir VI (K VI).

5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS

Após os ensaios de inibição e determinação das cepas com maiores atividades houve a classificação destas pelo padrão fermentativo através do kit API 50 CH[®] e a Tabela 4 aponta a identificação de cada linhagem.

A base de dados do software APILAB[®] é acessada pelo princípio de codificação e condensação das informações binárias, num perfil numérico que indica o percentual de semelhança do microrganismo estudado com os perfis existentes. Todas as bactérias lácticas isoladas foram classificadas com índices acima de 95% de probabilidade de semelhança, não gerando uma grande margem para incertezas sobre a eficiência de classificação.

A identificação é tida como adequada e confiável sendo o sistema considerado uma importante ferramenta na identificação de lactobacilos (FERREIRA, 2007). Vandamme et al. (1996) indicaram sua aplicação mais extensa para taxonomia como um procedimento fenotípico eficiente capaz de discriminar diferenças entre estirpes. Os resultados gerados por este sistema também têm sido utilizados para suportar dados de taxonomia para lactobacilos em alimentos (NIGATU et al., 2000; MUYANJA et al., 2003; ADNAN; TAN, 2007).

Todos os isolados antifúngicos foram classificados como pertencentes ao gênero *Lactobacillus* sendo *Lactobacillus plantarum* a espécie predominante. A predominância do gênero *Lactobacillus* pôde ter sido influenciada pelo método de isolamento escolhido ou pelo meio de cultura utilizado, pois o meio MRS suporta bem o crescimento de todos os *Lactobacillus* sp. incluindo as linhagens de crescimento lento tornando-se seletivo a outros gêneros de bactérias lácticas pelo ajuste de pH que favorece o crescimento de *Lactobacillus* sp. tolerantes a baixo pH e pelo citrato de amônia que em baixo pH inibe muitos microrganismos incluindo alguns *Streptococcus* e bolores (MANUAL AGAR MRS, HIMEDIA).

Dentre as cepas isoladas dos grãos de trigo e de seus subprodutos que apresentaram atividade antifúngica mais expressiva, apenas a espécie *Lactobacillus plantarum* foi identificada. De acordo com Valerio et al. (2009) essa espécie é considerada um contaminante natural desse grupo de alimentos, podendo este fator ser explicado por se tratar de uma bactéria extremamente versátil que apresenta genes codificados para absorção e utilização de diferentes substratos bem como habilidade de adesão em distintas superfícies, sendo por isso encontrada em variados nichos ecológicos não se limitando apenas a produtos fermentados ou a microbiota gastrointestinal (De VRIES et al., 2006).

Tabela 4 – Classificação das bactérias lácticas isoladas através do kit API 50 CHL.

Identificação da bactéria isolada	Classificação pelo API 50 CHL	Probabilidade de identificação (%)
Trigo em grãos VIII (TG VIII)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9
Farelo de trigo VI (FT VI)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97,5
Germem de trigo III (GT III)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	95
Farinha de trigo para quibe VII (FTQ VII)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,7
Farinha de trigo branca VII (FB VII)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97,7
Farinha de trigo integral IX (FI IX)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96,3
Sourdough I (S I)	<i>Lactobacillus pentosus</i>	99,7
Grãos de kefir VI (K VI)	<i>Lactobacillus paracasei</i>	97,4

5.3 INFLUÊNCIA DE OUTRAS SUBSTÂNCIAS NO ANTAGONISMO AO *Fusarium graminearum*

Os resultados expressos na Tabela 5 fazem referência aos ensaios realizados a fim de identificar e eliminar a possível atividade antifúngica do meio de cultura, pH do meio, bem como concentração do ácido láctico e acético frente ao fungo micotoxigênico *F. graminearum*.

Pelo fato de que as células viáveis de bactérias lácticas foram adicionadas suspensas no caldo MRS sobre os discos de inibição, houve a necessidade de uma avaliação da influência deste meio sobre a atividade antifúngica destas bactérias. Como visualizado na Tabela 5 apesar do acetato de sódio presente no caldo MRS poder exercer alguma atividade inibidora sobre determinadas espécies de fungos (STILES et al., 2002), nenhuma das concentrações de caldo MRS utilizado demonstraram ação inibidora ao desenvolvimento do fungo em questão. De Muynck et al. (2004) também não encontraram nenhuma atividade referente ao caldo MRS sobre diferentes fungos estudados.

A variação de pH do caldo MRS com a adição de ácido clorídrico também não exerceu qualquer atividade de inibição sobre *F. graminearum*, portanto a possível variação de pH no meio de cultura causada pelo metabolismo das bactérias lácticas não explica a atividade antifúngica exercida pelas cepas pesquisadas neste estudo.

As bactérias lácticas são popularmente conhecidas pela produção de metabólitos inibidores de crescimento fúngico, dentre esses, ácidos orgânicos como o lático e

o acético podem exercer essa função. A Tabela 5 indica a ação antifúngica nula que diferentes concentrações desses ácidos exerceram sobre a linhagem de *F. graminearum* utilizada nos ensaios. Corsetti et al. (1998) demonstraram não haver atividade inibidora do ácido láctico, mesmo em altas concentrações sobre *F. graminearum*.

Os resultados obtidos também podem ser comparados aos publicados por Laitila et al. (2002) que estudaram a inibição em meio líquido de *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* e *F. oxysporum* por extratos de células viáveis de *L. plantarum* e não encontraram nenhuma relação ou influência entre a concentração de ácido láctico, do pH do caldo MRS e acidificação do meio por ácido clorídrico na inibição do desenvolvimento dessas espécies de *Fusarium*.

Tabela 5 – Influência da concentração de caldo MRS, pH do meio de cultura e concentração de ácido acético e ácido láctico sobre a atividade inibidora.

Condição aplicada	Atividade inibidora*		
		Escala de inibição	Medida do diâmetro dos halos (mm)
Concentração de caldo MRS	2	(-)	0
	4	(-)	0
	6	(-)	0
	8	(-)	0
	10	(-)	0
pH do meio de cultura	1,0	(-)	0
	2,0	(-)	0
	3,0	(-)	0
	4,0	(-)	0
	5,0	(-)	0
	6,0	(-)	0
Concentração de ácido láctico e ácido acético % (v/v)	10	(-)	0
	20	(-)	0
	30	(-)	0
	40	(-)	0
	50	(-)	0

*Resultados correspondentes às triplicatas.

Apesar destes ácidos aplicados isoladamente não terem demonstrado nenhuma atividade antagonica sobre a linhagem de *F. graminearum* utilizada nesta pesquisa, não se pode excluir a influência que eles possam exercer sobre a atividade antifúngica de cada microrganismo isoladamente, pois essa atividade é dependente de vários fatores que ainda não

foram totalmente elucidados, como a dependência sobre a constante de dissociação de cada ácido bem como a atividade sinérgica destes ácidos entre si e com outros ácidos orgânicos produzidos pelo metabolismo das bactérias lácticas. Eles podem também atuar como facilitadores da ação de outros compostos metabolizados que apresentam atividade antagônica (CABO et al., 2002, MAGNUSSON et al., 2003).

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGÔNICA DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS AO DESENVOLVIMENTO DO FUNGO MICOTOXIGÊNICO *Fusarium graminearum*

Vários graus de inibição foram observados no ensaio que avaliou a atividade antagônica das diferentes bactérias lácticas (isoladas e comerciais) frente ao fungo micotoxigênico *F. graminearum* IAPAR2218.

Conforme exposto na Tabela 6 todas as culturas comerciais testadas apresentaram atividade inibidora, variando de 13,0 mm para a cultura iniciadora para iogurtes Yo-flex YC-180 composta por *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* a 47,0 mm pela Lyofast LPRa que consiste em uma mistura de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus plantarum*. Dentre as cepas isoladas os resultados variaram de 15,0 mm para *L. plantarum* (FT VI) e 35,0 mm para *L. paracasei* (K VI). Analisando sob um aspecto geral a maior intensidade de inibição foi verificada para a cultura comercial Lyofast LPRa e a menor para a Yo flex YC-180.

A possível explicação para o fato de todas as culturas comerciais terem apresentado alguma atividade pode ser porque diversas espécies de fungos do gênero *Fusarium* se mostram mais vulneráveis à ação antagônica de bactérias lácticas do que outras espécies de fungos como *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. que demonstrou ser a espécie mais resistente a ação destas bactérias (HASSAN; BULLERMAN, 2008). Ao identificar compostos responsáveis pela atividade antifúngica de bactérias lácticas isoladas de sourdough Lavermicocca et al. (2000) submeteram ao teste linhagens de *F. graminearum* IDM623, *Endomyces fibuliger* IDM3812, *Penicillium expansum* IDM/FS2, *Aspergillus niger* IDM1 e *Monilia sitophila* IDM/FS5 e apenas a cepa de *F. graminearum* IDM623 demonstrou sensibilidade às 25 cepas de bactérias lácticas testadas.

Tabela 6 – Atividade antagonica de bactérias lácticas isoladas e identificadas e de culturas comerciais frente a *F. graminearum* IAPAR2218.

Microrganismo	Atividade antagonica	
	Escala de inibição	Medida do diâmetro dos halos (mm)
<i>L. plantarum</i> TG VIII	(++)	19±0
<i>L. plantarum</i> FT VI	(+)	15±2
<i>L. plantarum</i> GT III	(++)	27±2
<i>L. plantarum</i> FTQ VII	(++)	25±2
<i>L. plantarum</i> FB VII	(+++)	31±4
<i>L. plantarum</i> FI IX	(+++)	33±4
<i>L. pentosus</i> S I	(++)	19±4
<i>L. paracasei</i> sp. <i>paracasei</i> K VI	(+++)	35±4
Lyofast LPRA	(++++)	47±2
Lyofast BG 112	(+++)	39±4
Lyofast LA3	(++)	17±4
LC01	(++)	27±2
Yo flex YC-180	(+)	13±2
Florafit LP115	(+++)	41±4
Choozit Helv A	(++)	24±3
Yo-Mix	(++)	19±0

*Resultados correspondentes às duplicatas ± desvio padrão em Agar BDA inoculado com 10^4 propágulos de *Fusarium*. mL⁻¹ e discos de papel filtro com 100µL de sobrenadante dos diferentes cultivos de bactérias lácticas em caldo MRS, incubação a 22±1 °C por 10 dias.

Dentre as bactérias lácticas isoladas, mesmo aquelas identificadas como *L. plantarum* apresentaram diferentes atividades antagonicas, sendo que as isoladas de trigo em grãos e farelo de trigo foram as que apresentaram menor atividade quando comparada com as cepas de *L. plantarum* isoladas de germem de trigo, farinha de trigo para quibe, farinha de trigo branca e integral que apresentaram semelhança em suas atividades.

Existe um grande número de publicações que descrevem a atividade inibidora ao crescimento fúngico de cepas de *L. plantarum*. Dentre as 25 bactérias lácticas estudadas por Lavermicocca et al. (2000), duas cepas de *L. plantarum* (20B e 21B) tiveram sua atividade atribuída a ação do ácido fenilático e do ácido 4-hidroxi-fenilático extraídos dos sobrenadantes e analisados por cromatografia e espectroscopia. Ensaios *in vitro* por turbidimetria mostraram claramente a eficácia de *L. plantarum* E76 isolado de cerveja contra *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum* e *F. graminearum* e a utilização desta linhagem

durante a fabricação de cerveja com amostras de cevada contaminadas restringiu o desenvolvimento de fungos do gênero *Fusarium* (LAITILA et al., 2002). *L. plantarum* CUK-501 isolado de pepinos demonstrou uma ampla atividade antifúngica sobre *F. graminearum*, *Rhizopus stolonifer*, *Sclerotium oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* e *Sclerotinia minor*. Yang e Chang (2010) purificaram e identificaram por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) como 3,6-bis(2-metilpropil)-2,5-piperazinediona um composto ativo produzido por *L. plantarum* AF1 capaz de impedir o crescimento de *A. flavus* em grãos de soja tratados com o sobrenadante concentrado da linhagem.

A bactéria isolada de sourdough e identificada como *L. pentosus* e a isolada de kefir e identificada como *L. paracasei* sp. *paracasei* também tiveram capacidade de inibir o crescimento fúngico. *L. pentosus* TV35b isolado da microbiota vaginal de crianças africanas demonstrou atividade antifúngica causada por um peptídeo identificado como pentocin TV35b sobre *Candida albicans* (OKKERS et al., 1999). Hassan e Bullerman (2008) detectaram a atividade inibidora a *F. proliferatum* M 5991, *F. proliferatum* M 5689 e *F. graminearum* R 4053 de duas cepas isoladas de sourdough e identificadas pelo API[®] 50 CHL como *L. casei* sp. *paracasei*.

Voulgari et al. (2010) isolaram diferentes cepas de *L. plantarum* (05), *L. pentosus* (04), *L. rhamnosus* (03), *L. paracasei* sp. *paracasei* (02), *L. brevis* (06), *L. buchneri* (03), *L. fermentum* (02), *L. paraplantarum* (06) de queijos Fetta e iogurtes, tais cepas apresentaram amplo espectro de inibição sobre diferentes espécies de *Penicillium* e das leveduras *Debaromyces hansenii* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Magnusson et al. (2003) isolaram cepas de *L. acidophilus* do intestino de frango e estas apresentaram inibição a *F. sporotrichioides* J304. Yang e Clausen (2004) comprovaram a atividade antagônica de *L. casei* e *L. acidophilus* aos fungos *Trichoderma viride*, *Penicillium chrysogenum*, *A. niger* e *Aureobasidium pullulans*.

Existem muitos artigos publicados que indicam a atividade antifúngica de diversas bactérias lácticas frente diferentes espécies de bolores e leveduras, porém a atividade antifúngica das bactérias lácticas é um fenômeno complexo e que ainda não foi totalmente elucidado por estar relacionado a uma série de fatores.

De acordo com Magnusson et al. (2003) três mecanismos podem explicar a eficiência antifúngica das bactérias lácticas: a produção de ácidos orgânicos, a competição por nutrientes e a produção de compostos antagônicos.

Muitos estudos comprovam que a atividade antifúngica das bactérias lácticas não está relacionada apenas à produção de ácidos orgânicos (lático, acético, propiônico, fórmico, butírico) e peróxido de hidrogênio, mas sim ao efeito combinado de vários fatores inter-relacionados que atuam em sinergia (MAGNUSSON et al., 2003).

Dentre os compostos inibidores produzidos por bactérias lácticas temos os de origem protéica (MAGNUSSON; SCHNÜRER, 2001); os de baixa massa molecular como ácido fenilático, reuterina, dipeptídeos cíclicos, ácido benzóico, ácidos graxos hidroxilados, metilhidantoína e mevalonolactona (NIKU-PAAVOLA et al., 1999; SCHNÜRER; MAGNUSSON, 2005) e substâncias parecidas com bacteriocinas (BLIS – bacteriocin-like substances) (OKKERS et al., 1999).

Embora a natureza e o modo de ação das substâncias antifúngicas não tenham sido pesquisados neste trabalho, os resultados indicam que a inibição não pôde ser explicada pela variação de pH do meio, pela interferência do meio de cultura utilizado e nem pela ação do ácido lático e do ácido acético aplicados isoladamente.

Os resultados presentes neste estudo indicam a capacidade dos microrganismos estudados na inibição do desenvolvimento fúngico, constituindo-se numa potencial alternativa para aplicação como agentes na bioconservação de alimentos. Tal prática, entretanto, requer mais estudos sobre as características específicas de cada linhagem, sobre as condições que estas apresentam a atividade antifúngica, sobre os compostos envolvidos na inibição entre outras especificações necessárias para a melhor utilização destas no gerenciamento e controle de problemas causados por *F. graminearum* ou outras espécies de fungos em determinados grupos de alimentos.

5.5 DETOXIFICAÇÃO DO TRICOTECENO DESOXINIVALENOL

Vários estudos confirmam o potencial de diversas bactérias lácticas na detoxificação de meios líquidos ou até mesmo sistemas alimentares contaminados por micotoxinas, por esse motivo as bactérias utilizadas nos ensaios de atividade antifúngica ao *F. graminearum* IAPAR2218 tiveram sua capacidade de detoxificação da micotoxina desoxinivalenol avaliada.

Existe a possibilidade que a capacidade de remoção de micotoxinas seja influenciada pela inviabilização das células das bactérias, portanto esse fator também foi analisado.

A Figura 6 relaciona os cromatogramas correspondentes aos controles (positivo e negativo) e ao ensaio (micotoxina + bactéria) realizados. No cromatograma correspondente ao controle negativo (I), ou seja, aquele que não continha DON apenas as células de bactérias lácticas, o pico correspondente a DON não é visualizado, observando-se apenas picos no tempo inicial de corrida, que são notados também no cromatograma correspondente ao ensaio da micotoxina com células viáveis de bactérias lácticas (III) podendo indicar possíveis substâncias que ficaram remanescentes do meio de cultura ou correspondentes às bactérias lácticas, pois no cromatograma (II) controle positivo (presença apenas de DON) esses picos iniciais não foram observados. De maneira geral todas as bactérias utilizadas para este trabalho forneceram cromatogramas similares ao de número III da Figura 6.

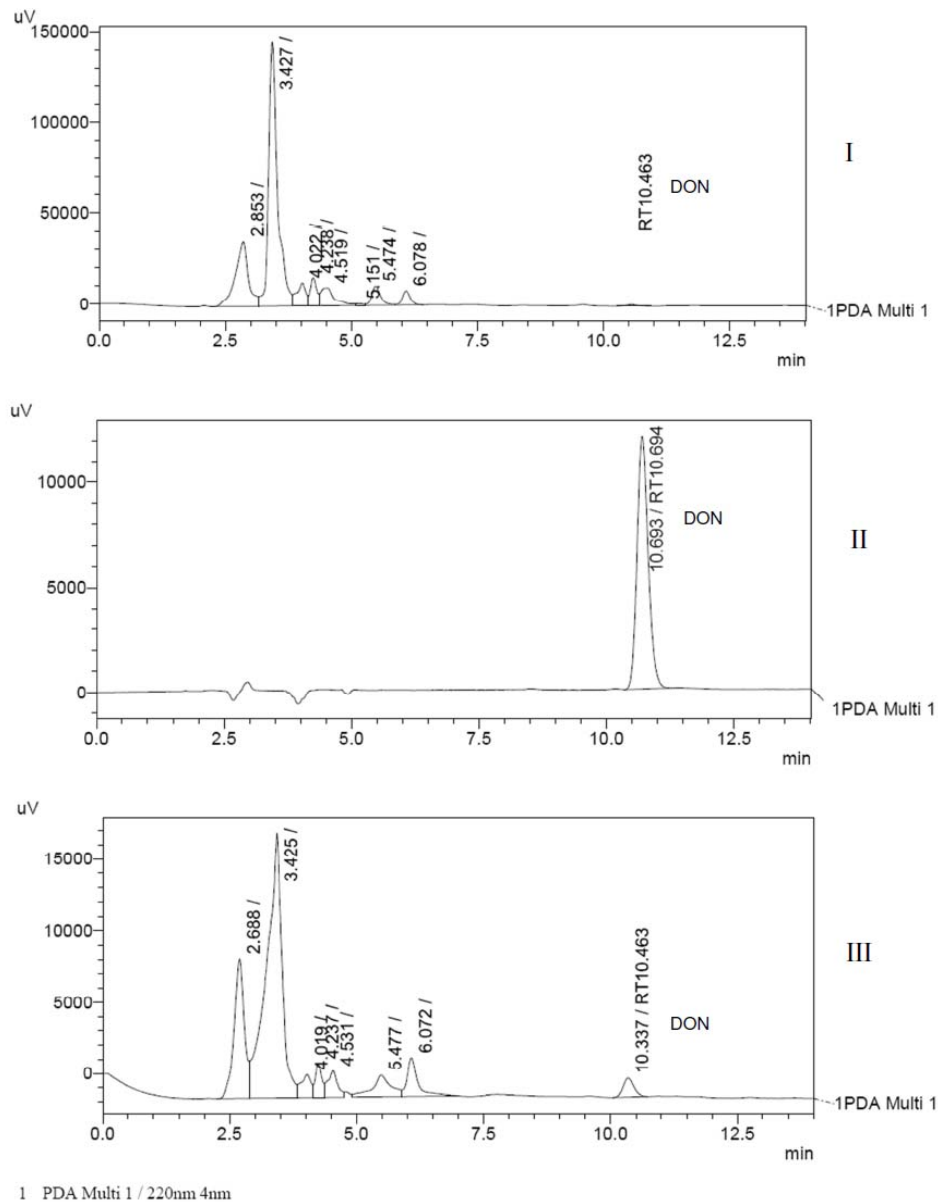


Figura 6 – Cromatogramas correspondentes ao (I) controle negativo (biomassa sem DON), (II) controle positivo (DON sem biomassa) e (III) ensaio de detoxificação por células viáveis de *L. plantarum* (FI IX).

A contagem média das bactérias lácticas empregadas nos ensaios de detoxificação foi de 10^{10} UFC. mL⁻¹ e pelo fato de não haverem diferenças a nível de 5% de significância entre as contagens obtidas para cada linhagem (resultados não publicados), a variação na concentração bacteriana não foi considerada um interferente nas diferenças de capacidade de remoção que cada bactéria utilizada apresentou. El-Nezami et al. (2002) indicam que a concentração bacteriana necessária para uma efetiva remoção de tricotecenos

necessita ser maior que 10^9 UFC. mL⁻¹, quantidades similares as relatadas para a remoção de aflatoxinas por El-Nezami et al. (1998).

A concentração de DON remanescente no sobrenadante após a incubação da solução da micotoxina com as bactérias láticas foi quantificada por HPLC e os resultados da taxa de redução correspondentes a cada bactéria utilizada estão expostos na Tabela 7, que confronta o percentual de redução das diferentes bactérias dentro do mesmo tratamento e para cada bactéria entre os 3 tratamentos.

Todas as cepas estudadas demonstraram potencial para a diminuição da micotoxina DON em meio líquido, apresentando taxas de redução que variaram de 16,41% para células viáveis de *L. plantarum* FB VII a 71,19% para a cultura Lyofast BG 112 (*L. plantarum*) inviabilizadas por esterilização.

O percentual de remoção correspondente as células viáveis de bactérias láticas apresentou valores que variaram entre 16,41% (*L. plantarum* FB VII) e 56,12% (*L. plantarum* GT III), com uma média de 38,13%; as células inviabilizadas por pasteurização geraram valores entre 35,95% (*L.pentosus* K VI) e 67,45% (Lyofast BG112) com uma média de 51,35% e as células de bactérias láticas inviabilizadas por esterilização entre 47,48% (*L.pentosus* K VI) e 71,19% (Lyofast BG112) com um valor médio de 61,08%, representando também as maiores reduções obtidas durante os ensaios de detoxificação.

Tabela 7 – Percentual de redução da micotoxina desoxinivalenol por células de bactérias lácticas viáveis, inviabilizadas por pasteurização e por esterilização.

Microrganismo	Percentual de redução (%)*		
	Células viáveis**	Células inviabilizadas por pasteurização***	Células inviabilizadas por esterilização****
Lyofast LPR A	52,07 ± 0,1 ^{aB}	53,18 ± 2,06 ^{cB}	70,32 ± 1,65 ^{aA}
Lyofast BG 112	52,62 ± 4,95 ^{aB}	67,45 ± 2,95 ^{aA}	71,19 ± 2,77 ^{aA}
Lyofast LA3	39,23 ± 2,22 ^{bC}	60,67 ± 1,34 ^{bB}	66,71 ± 1,82 ^{aA}
LC 01	40,61 ± 1,19 ^{bB}	64,03 ± 0,07 ^{abA}	66,56 ± 2,43 ^{aA}
Yo flex YC 180	31,25 ± 0,89 ^{cC}	57,43 ± 0,95 ^{bB}	65,64 ± 0,77 ^{aA}
Florafit LP 115	32,61 ± 1,38 ^{cC}	40,81 ± 0,95 ^{deB}	58,51 ± 1,29 ^{cA}
Yo mix	40,67 ± 0,76 ^{bB}	41,98 ± 0,45 ^{deB}	48,75 ± 1,81 ^{cA}
Choozit Helv A	55,30 ± 1,35 ^{aB}	59,05 ± 0,45 ^{bAB}	63,84 ± 0,16 ^{abA}
<i>L. plantarum</i> TG VIII	29,86 ± 1,18 ^{cC}	50,38 ± 0,46 ^{cdB}	56,05 ± 1,86 ^{bA}
<i>L. plantarum</i> FT VI	34,88 ± 0,94 ^{bcB}	38,58 ± 1,66 ^{eB}	55,74 ± 1,25 ^{bA}
<i>L. plantarum</i> GT III	56,12 ± 1,02 ^{aB}	62,67 ± 1,09 ^{abA}	66,79 ± 0,43 ^{aA}
<i>L. plantarum</i> FTQ VII	39,70 ± 1,93 ^{bC}	51,37 ± 1,36 ^{cB}	65,26 ± 1,27 ^{aA}
<i>L. plantarum</i> FB VII	16,41 ± 5,35 ^{dC}	48,34 ± 1,46 ^{cdB}	59,62 ± 1,02 ^{bA}
<i>L. plantarum</i> FI IX	39,71 ± 0,30 ^{bB}	44,73 ± 0,29 ^{bB}	57,68 ± 0,41 ^{cA}
<i>L. pentosus</i> S I	19,51 ± 4,63 ^{dC}	35,95 ± 1,57 ^{eB}	47,48 ± 1,59 ^{dA}
<i>L. paracasei</i> K VI	29,51 ± 1,16 ^{cC}	44,98 ± 1,77 ^{dB}	57,19 ± 1,04 ^{cA}

*Resultados correspondentes às médias das duplicatas ± desvio padrão. Médias ± desvio padrão na mesma coluna acompanhadas de letras minúsculas iguais não diferem a $p \leq 0,05$. Médias ± desvio padrão na mesma linha acompanhadas de letras maiúsculas iguais não diferem a $p \leq 0,05$.

**Células viáveis separadas por centrifugação (5 °C/ 3000g/ 10 minutos), lavadas por tampão PBS pH 7,2 e água ultrapura, ressuspensas em de solução de DON em água ultrapura a uma concentração de 1500 ng . mL⁻¹ e incubadas por 37±1 °C por 4 horas.

***Células inviabilizadas por pasteurização (100 °C/ 30 minutos), separadas por centrifugação (5° C/ 3000g/ 10 minutos), lavadas por tampão PBS pH 7,2 e água ultrapura, ressuspensas em solução de DON em água ultrapura a uma concentração de 1500 ng . mL⁻¹ e incubadas por 37±1 °C por 4 horas.

****Células inviabilizadas por esterilização (121 °C/ 15 minutos), separadas por centrifugação (5° C/ 3000g/ 10 minutos), lavadas por tampão PBS pH 7,2 e água ultrapura, ressuspensas em solução de DON em água ultrapura a uma concentração de 1500 ng . mL⁻¹ e incubadas por 37±1 °C por 4 horas.

Como visualizado na Tabela 7, apenas Lyofast BG112, LC 01, Choozit Helv A e *L. plantarum* GT III não apresentaram diferenças significativas a nível de 5% entre os percentuais de redução obtidos por células inviabilizadas por pasteurização e por

esterilização, todas as demais apresentaram percentuais de redução significativamente maiores quando a micotoxina permaneceu em contato com as células de bactérias lácticas inviabilizadas por esterilização. Quando os valores obtidos para as células inviabilizadas por pasteurização são comparados aos das células viáveis, as cepas que não apresentaram diferença significativa a nível de 5% são: Lyofast LPRA, Yo mix, Choozit Helv A, *L. plantarum* FT VI, *L. plantarum* FI IX.

Muitos estudos indicam o potencial de diferentes bactérias lácticas na descontaminação de micotoxinas entre elas aflatoxinas (HASKARD et al., 2001; ZINEDINE et al., 2005), fumonisinas (NIDERKORN et al., 2007, 2009), patulina, ocratoxina (FUCHS et al., 2008), zearalenona (EL-NEZAMI et al., 2002a), tricotecenos como desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV) e toxina T-2 (EL-NEZAMI et al., 2002b; STYRIAK et al., 2007), mas o mecanismo ainda não é totalmente compreendido, podendo ser explicado pela interação entre as bactérias promovendo a degradação metabólica transformando as micotoxinas em formas menos tóxicas ou pela captura desses componentes pela estrutura celular destas bactérias.

O fato de todos os microrganismos utilizados neste estudo terem apresentado valores de redução maiores quando submetidos a um tratamento térmico mais drástico (esterilização) e também por não serem observados picos próximos ao correlativo ao DON (Figura 5 – III) que pudessem indicar uma possível degradação da micotoxina, excluem a possibilidade de que a detoxificação tenha ocorrido por degradação de DON pelo metabolismo das bactérias estudadas e sugerem que o mecanismo de detoxificação que ocorreu nestes ensaios seja basicamente o de captura da micotoxina pela parede celular das bactérias lácticas, como proposto por muitas publicações (HASKARD et al., 2001; LAHTINEN et al., 2004; NIDERKORN et al., 2006; SHETTY; JESPERSEN, 2006; SHAHIN, 2007).

Ao estudarem a capacidade de detoxificação de bactérias lácticas e bifidobactérias utilizadas como culturas iniciadoras na indústria de alimentos lácteos, Peltonen et al. (2001) observaram que o tratamento das células por calor e por ação de ácidos aumentou significativamente a habilidade destas bactérias em capturar aflatoxina B₁ em meios líquidos e o mecanismo de captura foi confirmado pela recuperação da micotoxina que estava agregada após subseqüentes lavagens das células. Vinte e nove cepas de bactérias lácticas, algumas da mesma espécie que as utilizadas neste ensaio como: *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus*, *S. thermophilus*, *L. casei* sp. *casei*, tiveram sua habilidade de remoção de DON e fumonisinas B₁ e B₂ em meio líquido acidificado (pH 4) testada e

indicaram níveis acima de 55% de remoção para DON, 82% para fumonisina B₁, 100% para fumonisina B₂ e 88% para zearalenona, aparentemente o mecanismo de remoção foi devido a captura da micotoxina pela estrutura das células bacterianas não sendo aplicada a degradação como explicação para a redução dos teores de micotoxinas (NIDERKORN et al., 2006).

Os resultados obtidos são também condizentes com os obtidos por El-Nezami et al. (1998) que indicam a captura de aflatoxinas pela parede celular de bactérias lácticas, afirmando que as células tratadas termicamente apresentaram melhores taxas de detoxificação.

Embora os membros pertencentes às bactérias lácticas consistam em um grupo heterogêneo, apresentam grande semelhança na estrutura de sua parede celular, que consiste basicamente de uma cadeia de peptidoglicano como estrutura principal acompanhada de outros componentes como ácidos teicóico e lipoteicóico, camada S protéica e polissacarídeos neutros. Esses componentes exercem diversas funções, incluindo a adesão e captura de macromoléculas, especialmente a cadeia miofibrilar composta por ácidos teicóicos e polissacarídeos neutros (ZHANG; OHTA, 1991).

Peptidoglicano e polissacarídeos da parede celular são os principais responsáveis pela capacidade de adesão e captura de toxinas pelas bactérias lácticas. Esses dois componentes são expressivamente afetados pelo tratamento térmico, que pode causar a desnaturação das proteínas ou a formação de compostos advindos da reação de Maillard entre polissacarídeos e peptídeos ou proteínas. A estrutura de peptidoglicano é geralmente espessa, porém pode ser reduzida e/ou o tamanho dos poros pode aumentar através do tratamento térmico. Esta perturbação na parede celular das bactérias lácticas pode permitir que os tricotecenos se vinculem aos componentes da parede celular e da membrana plasmática, que não estão disponíveis quando a célula do microrganismo está intacta (HASKARD et al., 2001; NIDERKORN et al., 2006). Esses fatores ajudam a elucidar os resultados obtidos, que indicam que a maior parte das células das bactérias lácticas inviabilizadas por pasteurização e esterilização apresentou maior potencial de redução da micotoxina desoxinivalenol em meio líquido do que aquelas que não sofreram nenhum tratamento térmico.

Embora exista grande diferença entre a estrutura molecular de tricotecenos e aflatoxinas, é possível que o mecanismo envolvido na captura dessas micotoxinas seja similar, tal como acontece na interação entre a AFB₁ e as bactérias (EL-NEZAMI et al., 2002b). As interações covalentes não podem ser responsáveis pela captura caso o metabolismo não esteja ativo, portanto, propõe-se que interações não-covalentes obrigatórias ocorram com os componentes da superfície bacteriana, e a reversibilidade da ligação demonstrada pelos

efeitos da lavagem bacteriana indica que a ligação é um fenômeno físico e que DON pode estar vinculado às bactérias por fracas interações não-covalentes como as associadas com as porções hidrofóbicas da superfície bacteriana. Estudos ainda são necessários para investigar a natureza química das porções da superfície bacteriana responsáveis pela captura dos tricotecenos por células viáveis ou não, bem como sobre as interações químicas envolvidas no mecanismo de captura (HASKARD et al., 2001).

A maioria das cepas utilizadas neste estudo pode ser aplicada na fermentação de alimentos e algumas são probióticas, suas características aliadas à capacidade de remoção de DON em meio líquido e talvez até de outras micotoxinas revelam potencial para a abordagem na redução da biodisponibilidade de DON da dieta humana e alimentação animal, reduzindo então os riscos e danos causados à saúde pela exposição a esta ou a outras micotoxinas. A elucidação dos mecanismos de detoxificação, das condições ideais para seu acontecimento e a escolha de cepas mais eficientes auxiliarão na escolha do melhor modo de aplicação destas para a remoção de micotoxinas.

Muitas pesquisas ainda devem ser realizadas para a utilização de bactérias lácticas em meios alimentares, pois como citado anteriormente, não se conhece profundamente a estabilidade das interações bactéria-micotoxina, a resistência da ligação durante processamento e tratamento térmico ou comportamento no trato gastrointestinal, bem como não se têm noção se os produtos da degradação das micotoxinas pelo metabolismo destas bactérias não sejam tóxicos e nocivos afetando a saúde humana ou animal.

A capacidade dos microrganismos estudados na inibição do crescimento fúngico e na eliminação de micotoxina em meio líquido, aliado ao status destas bactérias em serem reconhecidas como seguras para a saúde humana, demonstra o potencial de sua aplicação como agentes de biocontrole para prevenir o crescimento fúngico aumentando a vida útil dos alimentos e também reduzindo os danos à saúde associados a ingestão de micotoxinas.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho pôde evidenciar a capacidade das bactérias lácticas isoladas e de culturas lácticas comerciais em inibir o desenvolvimento do fungo *F. graminearum* bem como na detoxificação da micotoxina desoxinivalenol em meio líquido.

Durante o isolamento, a maioria dos isolados identificados foi representada por *L. plantarum*.

Dentre os microrganismos estudados todos apresentaram atividade antifúngica sendo a cultura iniciadora Lyofast LPRA composta por *L. rhamnosus* e *L. plantarum* aquela que apresentou a atividade antagônica mais expressiva e a cultura Yo flex YC-180 composta por *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e subsp. *lactis* a que apresentou a menos expressiva ao lado da linhagem isolada de farelo de trigo identificada como *L. plantarum* FT VI.

A variação de pH e a concentração do meio de cultura bem como a presença de diferentes quantidades de ácido láctico e acético não apresentaram atividade inibidora sobre o fungo *Fusarium graminearum* IAPAR2218.

Todas as bactérias lácticas testadas apresentaram capacidade de remoção da micotoxina DON em meio líquido, células inviabilizadas por esterilização da cultura Lyofast BG 112 (*L. plantarum*) apresentaram o maior percentual de remoção e as células viáveis de *L. plantarum* FB VII o menor percentual.

Células inviabilizadas apresentaram maior capacidade de detoxificação quando comparadas às células viáveis.

Pela ausência nos cromatogramas de picos que demonstrassem degradação da micotoxina, o mecanismo de detoxificação pode ser explicado pela captura através das células de bactérias lácticas.

REFERÊNCIAS

- ABEE, T., KROCKEL, L., HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, v.28, p.169-185, 1995.
- ADNAN, A. F. M., TAN, I. K. P. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. **Bioresource Technology**, v.98, p.1380-1385, 2007.
- ALDRED, D., MAGAN, N. Prevention strategies for trichothecenes. **Toxicology Letters**, v.153, p.165–171, 2004.
- ALLEN, P. W. **Industrial Fermentations**. 2.ed. New York: JJ Little & Ives Company, 1926.
- ALMEIDA, E. G., RACHID, C. C. T. C., SCHWAN, R. F. Microbial population present in fermented beverage ‘cauim’ produced by Brazilian Amerindians. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, p.146–151, 2007.
- ANANOU, S. et al. Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, p.475-486, 2007.
- ARGYRIS, J., SANFORD, D. V., TEKRONY, D. *Fusarium graminearum* infection during wheat seed development and its effect on seed quality. **Crop Science**, v.43, p.1782-1788, 2003.
- ARMAFORTE, E. et al. High-performance liquid chromatography determination of phenyllactic acid in MRS broth. **Journal of Chromatography A**, v.1131, p.281–284, 2006.
- ATANOSSOVA, M. et al. Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. **International Journal of Food Microbiology**, v.87, p.63–73, 2003.
- ATKINS, D., NORMAN, J. Mycotoxins and food safety. **Nutrition & Food Science**, v.5, p.260–266, 1998.
- AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology in: SALMINEN, S., VON WRIGHT, A., OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 2004.
- AXELSSON, L. T. et al. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.2, p.131–136, 1989.
- BAI, G. H. et al. Resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. **Plant Breeding**, v.120, p.1-6, 2001.
- BAPTISTA, A. S., HORII, J., BAPTISTA, A. S. Fatores físico-químicos e biológicos ligados a produção de micotoxinas. **Boletim CEPPA**, v.22, n.1, p.1-14, 2004.

- BARKAI-GOLAN, R; PASTER, N. **Mycotoxins in fruits and vegetables**. 1.ed. California: Elsevier, 2008.
- BATA, A., LÁSZTITY, R. Detoxication 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, n.3, p.497-516, 2003.
- BERGHOFER, L. K. et al. Microbiology of wheat and flour milling in Australia. **International Journal of Food Microbiology**, v.85, p.137-149, 2003.
- BERGSSON, G. et al. In vitro inactivation of *Chlamydia trachomatis* by fatty acids and monoglycerides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, n.9, p.2290-2294, 1998.
- BERGSSON, G. et al. In vitro killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.11, p.3209–3212, 2001.
- BHAT, R.V. et al. Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould damage wheat products in Kashmir Valley, India. **The Lancet**, v.1, n.8628, p.35-37, 1989.
- BIANCHINI, A., BULLERMAN, L. B. Biological control of molds and mycotoxins in foods In: APPELL, M., et al. **Mycotoxin Prevention and Control in Agriculture**, ACS Symposium Series-American Chemical Society: Washington, 2010.
- BINDER, E. M. et al. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, p.265–282, 2007.
- BIRZELE, B. et al. Epidemiology of *Fusarium* infection and deoxynivalenol content in winter wheat in the Rhineland, Germany. **European Journal of Plant Pathology**, v.108, p.667–673, 2002.
- BIRZELE, B., PRANGE, A., KRAÈMER, J. Deoxynivalenol and ochratoxin A in German wheat and changes of level in relation to storage parameters. **Food Additives and Contaminants**, v.17, n.12, p.1027-1035, 2000.
- BJÖRCK, L. Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychrotrophic bacteria in milk. **Journal of Dairy Research**, v.45, p.109-118, 1978.
- BJÖRCK, L. et al. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against pseudomonas and other Gram-negative organisms. **Applied Microbiology**, v.30, p.199-204, 1975.
- BONDY, G.S., PESTKA, J.J. Immunomodulation by fungal toxins. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v.3, p.109-143, 2000.
- BONESTROO, M.H. et al. Inhibition of the growth of yeasts in fermented salads. **International Journal of Food Microbiology**, v.17, p.311-320, 1993.

BOTELHO, L. **Isolamento e identificação de Lactobacilos e Bifidobactérias em alimentos probióticos disponíveis no mercado brasileiro.** 2005. 203 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2005. Disponível em: < <http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000366768>>. Acesso em: 28.abr.2008.

BOWDEN, R. L., LESLIE, J. F. Sexual recombination in *Giberella zea*. **Phytopathology**, v.89, p.182-188, 1999.

BRUL, S., COOTE, P. Preservative agents in foods-mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, p.1-17, 1999.

CABO, M. L., BRABER, A. F., KOENRAAD, P. M. Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. **Journal of Food Protection**, v.65, p.1309–1316, 2002.

CALLEWAERT, R. et al. Characterization and production of amylovorin L471, a bacteriocin purified from *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 by a novel three-step method. **Microbiology**, v.145, p.2559–2568, 1999.

CAPLICE, E., FITZGERALD, G.F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, p.131-149, 1999.

CARLILE, M. et al. **The Fungi**. 2. ed. Londres: Academic Press, 2001.

CARTER, J. P. et al. Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. **European Journal of Plant Pathology**, v.108, p.573-583, 2002.

CAST (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY). Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems. **Task Force Report No. 139**, Ames, Iowa, 2003.

CHARMLEY, E., TRENHOLM, H.L., THOMPSON, B.K. Influence of level of deoxynivalenol in the diet of dairy cows on feed intake, milk production and its composition. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.3580-3587, 1993.

CLEAR, R. M., PATRICK, S. K. *Fusarium* head blight pathogens isolated from fusarium-damaged kernels of wheat in western Canada, 1993 to 1998. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.22, p.51-60, 2000.

CLEUSIX, V. et al. Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. **BMC Microbiology**, v.7, p.101-109, 2007.

CLEVELAND, J. et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.1-20, 2001.

COCAIGN-BOUSQUET, M. et al. Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. **Antonie Leeuwenhoek**, v.70, p.253-267, 1996.

- CONDON, S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. **FEMS Microbiology Reviews**, v.46, p.269–280, 1987.
- CORSETTI, A. et al. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: Identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.50, p.253-256, 1998.
- CORSETTI, A. et al. A taxonomic survey of lactic acid bacteria isolated from wheat (*Triticum durum*) kernels and non-conventional flours. **Systematic and Applied Microbiology**, v.30, p.561–571, 2007.
- CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, v.127, p.19-28, 2002.
- D'MELLO, J. P. F., MACDONALD, A. M. C. Mycotoxins. **Animal Feed Science Technology**, v.69, p.155-166, 1997.
- D'MELLO, J. P. F., PLACINTA, C. M., MACDONALD, A. C. E. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 80, p.183–205, 1999.
- DAL BELLO, F. et al. Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. **Journal of Cereal Science**, v.45, p.309–318, 2007.
- DALIÉ, D. K. D., DESCHAMPS, A. M., FORGET, F. R. Lactic acid bacteria – potential for control of mould growth and mycotoxins: a review. **Food Control**, v.21, p.370–380, 2010.
- DAVIDSON, B.E. et al. Current research on the genetics of lactic acid production in lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v.5, p.763-84, 1995.
- DAW, M. A., FALKINER, F. R. Bacteriocins: nature, function and structure. **Micron**, v.27, n.6, p.467-479, 1996.
- DE MAN, J. C., ROGOSA, M., SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v.23, p.130–135, 1960.
- De MUYNCK, C. et al. Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. **Microbiological Research**, v.54, p.339-346, 2004.
- De VRIES, M. C. et al. *Lactobacillus plantarum* -survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. **International Dairy Journal**, v.16. p.1018–1028, 2006.
- De VUYST, L., NEYSENS, P. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. **Trends in Food Science & Technology**, v.16, p.43-56, 2005.
- DEL PONTE, E. M., FERNANDES, J. M. C., BERGSTROM, G. C. Influence of growth stage on *Fusarium* head blight and deoxynivalenol production in wheat. **Journal of Phytopathology**, v.155, p.577–581, 2007.

- DESJARDINS, A. E., HOHN, T. Mycotoxins in plant pathogenesis. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.10, n.2, p.147-152, 1997.
- DEVLIEGHIERE, F., DEBEVRE, J. Influence of dissolved carbon dioxide on the growth of spoilage bacteria. **Lebensmittel Wissenschaft Technologie**, v.33, p.531–537, 2000.
- DEVLIEGHIERE, F., VERMEIREN, L., DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, v.14, p.273-285, 2004.
- DEXTER, J. E., CLEAR, R. M., PRESTON, K. R. Fusarium head blight: effect on the milling and baking of some Canadian wheats. **Cereal Chemistry**, v.73, p.695-701, 1996.
- DEXTER, J. E. et al. Effect of Fusarium head blight on semolina milling and pasta-making quality of durum wheat. **Cereal Chemistry**, v.74, p.519-525, 1997.
- DIAZ, D. E. et al. Aflatoxin binders II: reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. **Mycopathologia**, v.157, p.233–241, 2004.
- DILL-MACKY, R., JONES, R. K. The effect of previous crop residues and tillage on Fusarium head blight of wheat. **Plant Disease**, v.84, p.71-76, 2000.
- DOLEYRES, Y. et al. Production of 3-hydroxypropionaldehyde using a two-step process with *Lactobacillus reuteri*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.68, p.467–474, 2005.
- DÖLL, S. et al. Interactions of deoxynivalenol and lipopolysaccharides on cytokine excretion and mRNA expression in porcine hepatocytes and Kupffer cell enriched hepatocyte cultures. **Toxicology Letters**, v.190, p.96–105, 2009.
- DYKES, G. A. Bacteriocins: ecological and evolutionary significance. **Tree**, v.10, n.5. p.186-189, 1995.
- EDWARDS, S. G. Influence of agricultural practices on *Fusarium* infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. **Toxicology Letters**, v.153, p.29-35, 2004.
- EFSA (European Food Safety Authority). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed. **European Food Safety Authority Journal**, v.73, p.1–41, 2004.
- EHRMANN, M. A., VOGEL, R. F. Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. **Trends in Food Science and Technology**, v.16, p.31-42, 2005.
- EKLUND, T. Organic acids and esters. In: GOULD, G. W. (Ed.). **Mechanisms of action of food preservation procedures**. Nova Iorque: Elsevier, 1989. p. 161–200.
- EL-NEZAMI, H. S. et al. Removal of common *Fusarium* toxins *in vitro* by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. **Food Additives and Contaminants**, v.19, n.7, p.680-686, 2002b.

EL-NEZAMI, H. et al. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, Aflatoxin B1. **Food and Chemical Toxicology**, v.36, p.321-326, 1998.

EL-NEZAMI, H. et al. Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative α -zearalenol. **Applied and Environmental Microbiology**, v.18, n.7, p.3545–3549, 2002a.

EL-ZINEY, M. G. et al. Characterization of growth and metabolite production of *Lactobacillus reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. **Biotechnology Letters**, v.20, n.10, p.913–916, 1998.

ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. **Journal of Microbiological Methods**, v.56, p.297–314, 2004.

ERCOLINI, D. et al. Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. **Current Microbiology**, v.42, p.199–202, 2001.

ERIKSEN, G.; PETTERSSON, H.; LINDBERG, J., Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl DON in pigs. **Archives of Animal Nutrition**, v.57, p.335-345, 2003.

FARNWORTH, E. R. **Handbook of Fermented Functional Foods**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2008.

FAZELI, M. R. et al. Aflatoxin B1 binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, v.72, p.189– 192, 2009.

FERREIRA, L. C. **Aspectos microbiológicos da conservação de polpas de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.):** Qualidade, higiene, adaptação de bactérias ao estresse ácido e isolamento de microrganismos com potencial para bioconservação. 2007. 110p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/MBSAtese_luiz_carlos_ferreira.pdf>. Acesso em: 03.ago. 2010.

FILTENBORG, O., FRISVAD, J. C., THRANE, U. Moulds in food spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, v.33, p.85-102, 1996.

FUCHS, S. et al. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.1398–1407, 2008.

FUNG, F., CLARK, R. F. Health effects of mycotoxins: a toxicological overview. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v.42, p.217-234, 2004.

GADD, G. M., WATKINSON, S. C., DYER, P. S. **Fungi in the Environment**. 1.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

GAJECKI, M. et al. Multi-mycotoxigenesis. **Environmental Biotechnology**, v.3, n.1, p.25-29, 2007.

- GANZLE, M. G. et al. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.4325–4333, 2000.
- GARDA, J., MACEDO, R. M., BADIALE-FURLONG, E. Determinação de tricotecenos em cerveja e avaliação de incidência no produto comercializado no Rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.4, p.657-663, 2004.
- GARROTE, G. L., ABRAHAM, A. G., De ANTONI, G. L. Preservation of kefir grains, a comparative study. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v.30, p.77–84, 1997.
- GIBSON, A. M., HOCKING, A. D. Advances in the predictive modelling of fungal growth in food. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, p.353-358, 1997.
- GILBERT, J., FERNANDO, W. G. D. Epidemiology and biological control of *Gibberella zeae* / *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.26, p.464–472, 2004.
- GLENN, A. E. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, p.213-240, 2007.
- GOBBETTI, M. et al. **Gluten-Free Cereals Products and Beverages**. 1.ed. Massachussets, Elsevier, 2008.
- GOULD, G. W. Methods for preservation and extension of shelf life. **International Journal of Food Microbiology**, v.33, p.51-64, 1996.
- GOURAMA, H. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Penicillium* by *Lactobacillus* species. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v.30, p.279–283, 1997.
- GOURAMA, H., BULLERMAN, L. B. Anti-aflatoxigenic activity of *Lactobacillus casei pseudoplantarum*. **International Journal of Food Microbiology**, v.34, p.131–143, 1997.
- GOURAMA, H., BULLERMAN, L. B. Antimycotic and antiaflatoxigenic effect of lactic acid bacteria-a review. **Journal of Food Protection**, v.57, p.1275-1280, 1995a.
- GOURAMA, H., BULLERMAN, L. B. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. **Journal of Food Protection**, v.58, p.1249–1256, 1995b.
- GOYARTS, T. et al. Effect of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) on IgA, IgM and IgG concentrations and proliferation of porcine blood lymphocytes. **Toxicology in Vitro**, v.20, p.858–867, 2006.
- GRAZ, M. et al. Antimicrobial activity of selected cyclic peptides. **Pharmazie**, v.54, p.772–775, 1999.
- GRAZ, M. et al. Mechanism of an anti-fungal action of selected cyclic peptides. **Pharmazie**, v.56, n.900–901, 2001.

- HARRIS, L. J. et al. Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* in maize. **Plant Disease**, v.83, p.954-960, 1999.
- HASKARD, C. A. et al. Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.3086-3091, 2001.
- HASSAN, Y. I., BULLERMAN, L. B. Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* isolated from a sourdough bread culture. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, p.112– 115, 2008.
- HAZEL, C. M., PATEL, S. Influence of processing on trichothecene levels. **Toxicology Letters**, v.153, p.51–59, 2004.
- HE, J., BOLAND, G. J., ZHOU, T. Concurrent selection for microbial suppression of *Fusarium graminearum*, Fusarium head blight and deoxynivalenol in wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, p.1805–1817, 2009.
- HERNANDEZ-MENDOZA, A., GARCIA, H. S., STEELE, J. I. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B1. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.1064-1068, 2009.
- HOCKING, A. D. et al. **Advances in Food Mycology**. 1.ed. New York: Springer Science Business Media, 2006.
- HOLZAPFEL, W. H. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p.365-373, 2001.
- HOMDORK, S., FEHERMANN, H., BECK, R. Influence of different storage conditions on the mycotoxin production and quality of *Fusarium*-infected wheat grain. **Journal of Phytopathology**, v.148, p.7–15, 2000.
- HOPE, R., ALDRED, D., MAGAN, N. Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* on wheat grain. **Letters in Applied Microbiology**, v.40, p.295–300, 2005.
- HUGHES, D. M. et al. Overt signs of toxicity to dogs and cats of dietary deoxynivalenol. **Journal of Animal Science**, v.77, p.693-700, 1999.
- HUIS IN'T VELD, J. H. J. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. **International Journal of Food Microbiology**, v.33, p.1-18, 1996.
- HUWIG, A. et al. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, v.122, p.179–188, 2001.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 2008.
- ISEBAERT, S. et al. Mycotoxin producing *Fusarium* species occurring in winter wheat in Belgium (Flanders) during 2002–2005. **Journal of Phytopathology**, v.157, p.108–116, 2009.

- JAY, J. M. Antimicrobial properties of diacetyl. **Applied and Environmental Microbiology**, v.44, p.525–532, 1982.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). Safety evaluation of certain mycotoxins in food – Deoxynivalenol. **WHO – Food Additives Series-47**, Geneva, 2001.
- JOHNSON, P. J., CASTEEL, S. W., MESSER, N. T. Effect of feeding deoxynivalenol (vomitoxin) contaminated barley to horses. **Journal of Veterinary Diagnostics Investigation**, v.9, p.219-221, 1997.
- JOUANY, J. P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 342-362, 2007.
- KABAK, B., DOBSON, A., VAR, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. **Critical Reviews of Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 593–619, 2006.
- KHONGA, E. B., SUTTON, J. C. Inoculum production and survival of *Gibberella zeae* in maize and wheat residues. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.10, p.232-239, 1988.
- KIERONCZYK, A. et al. Cooperation between *Lactococcus lactis* and nonstarter lactobacilli in the formation of cheese aroma from amino acids. **Applied Environmental Microbiology**, v.69, n.2, p.734–739, 2003.
- KING, R. R. et al. Transformation of deoxynivalenol (vomitoxin) by rumen microorganisms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.32, p.1181-1183, 1984.
- KLAENHAMMER, T. et al. Discovering lactic acid bacteria by genomics. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.82, p.29–58, 2002.
- KRSKA, R., WELZIG, E., HOUDRA, H. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, p.241-264, 2007.
- LAHTINEN, S. J. et al. Binding of aflatoxin B1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. **Food Additives and Contaminants**, v.21, n.2, p.158-164, 2004.
- LAITILA, A. et al. Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds in vitro and in malting of barley. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p.566–576, 2002.
- LAVERMICOCCA, P. et al. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.4084–4090, 2000.
- LAVERMICOCCA, P., VALERIO, F., VISCONTI, Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.1, p.634– 640, 2003.
- LEE, M. Y. et al. Antiinflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model. **Immunobiology**, v.212, p.647–654, 2007.

- LEROY, F., DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p.67–78, 2004.
- LI, F.Q., LI, Y.W., YOSHIZAWA, T. *Fusarium* toxins in wheat from an area in Henan Province, PRE China, with a previous human mould intoxication episode. **Food Additives and Contaminants**, v.19. p.163-166, 2002.
- LIANG, H.F. et al. Natural antimicrobial agent (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri* for sanitization of biological tissues inoculated with *Pseudomonas aeruginosa*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.84, n.2, p.233-239, 2003.
- LOWE, D. P., ARENDT, E. K. The use and effects of lactic acid bacteria in malting and brewing with their relationships to antifungal activity, mycotoxins and gushing: a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v.110, n.3, p.163-180, 2004.
- LUND, F. Differentiating *Penicillium* species by detection of indole metabolites using a filter paper method. **Letter Applied Microbiology**, v.20, p.228–231, 1995.
- LUO, Y., YOSHIZAWA, T., KATAYAMA, T. Comparative study on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in corn and wheat from high-and low-risk areas for human esophageal cancer in China. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.12, p.3723-3726, 1990.
- MAGAN, N. et al. Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. **European Journal of Plant Pathology**, v.109, p.723–730, 2003.
- MAGAN, N. et al. Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. **European Journal of Plant Pathology**, v.108, p.685–690, 2002.
- MAGNUSSON, J., SCHNÜRER, J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *Coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.1–5, 2001.
- MAGNUSSON, J. et al. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v.219, p.129–135, 2003.
- MAIORANO, A. et al. Effects of maize residues on the *Fusarium* spp. infection and deoxynivalenol (DON) contamination of wheat grain. **Crop Protection**, v.27, p.182–188, 2008.
- MARKELL, S. G., FRANCL, L. J. *Fusarium* head blight inoculum: Species prevalence and *Gibberella zeae* spore type. **Plant Disease**, v.87, p.814-820, 2003.
- MARTH, E. H., STEELE, J. L. **Applied Dairy Microbiology**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2001.

- MARTINS, M. B., CAMPO, V. L., CARVALHO, I. Síntese de ciclo (L-PHE-L-SER) e ciclo (D-PHEL-SER) de interesse biológico. **Anais da 58^o Reunião Anual da SBPC**, Florianópolis, 2006.
- MCGINNIS, M. R., RINALDI, M. G. Antifungal drugs: mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing and assays of activity in biological fluids. **Antibiotics in Laboratory Medicine**, p.198–257, 1991.
- MCMULLEN, M., JONES, R., GALLENBERG, D. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. **Plant Disease**, v.81, p.1340–1348, 1997.
- MIEDANER, T., BOLDUAN, C., MELCHINGER, A. E. Aggressiveness and mycotoxin production of eight isolates each of *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides* for ear rot on susceptible and resistant early maize inbred lines. **European Journal of Plant Pathology**, v.127, p.113–123, 2010.
- MIEDANER, T., SCHILLING, A. Genetic variation of aggressiveness in individual field populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* tested on young plants of winter rye. **European Journal of Plant Pathology**, v.102, p.823-830, 1996.
- MIGUEL, M. G. C. et al. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. **Food Research International**, v.43, p.1523–1528, 2010.
- MILLER, J.D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research**, v.31, p.1-16, 1995.
- MOLTÓ, G. et al. Occurrence of trichothecenes in Argentinean beer, a preliminary exposure assessment. **Food Additives and Contaminants**, v.17, n.9, p.809–813, 2000.
- MOYANO, S. R. et al. Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. **Meat Science**, v.80, n.3, p.715-721, 2008.
- MUYANJA, C. M. B. K. et al. Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. **International Journal of Food Microbiology**, v.80, p.201-210, 2003.
- MUYNCK, C. et al. Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. **Microbiological Research**, v.54, p.339-346, 2004.
- NASCIMENTO, M. S., MORENO, I., KUAYE, A. Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, n.2, p.120-127, 2008.
- NEIRA, M. S. et al. The effects of bakery processing on natural deoxynivalenol contamination. **International Journal of Food Microbiology**, v.37, p.21–25, 1997.
- NES, I.F. et al. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.70, p.113–128, 1996.

- NIDERKORN, V., BOUDRA, H., MORGAVI, D. P. Binding of Fusarium mycotoxins by fermentative bacteria in vitro. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p.849–856, 2006.
- NIDERKORN, V. et al. Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisin B1 and B2 by lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, p.977–985, 2009.
- NIDERKORN, V. et al. Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an in vitro simulated corn silage model. **Food Additives and Contaminants**, v.24, n.4, p.406-415, 2007.
- NIGATU, A., AHRNÉ, S., MOLIN, G. Temperature-dependent variation in API 50 CH fermentation profiles of *Lactobacillus* species. **Current Microbiology**, v.41, p.21-26, 2000.
- NIGHTINGALE, M. J. et al. Fusarium head blight: effect of fungal proteases on wheat storage proteins. **Cereal Chemistry**, v.76, p.150-158, 1999.
- NIKU-PAAVOLA, M.L. et al. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.29-35, 1999.
- NOUROZIAN, J., ETEBARIAN, H. R., KHODAKARAMIAN, G. Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**, v.28, p.28-39, 2006.
- NOVAK, L. et al. Cométabolisme sucre-acides aminés chez *Lactococcus lactis*. **Le Lait**, v.78, p.17-22, 1998.
- NUMMER, B. A. Brewing with lactic acid bacteria. **Brewing Techniques**, v.4, p.56-63, 1996.
- O'DONNELL, K. et al. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. **Fungal Genetics and Biology**, v.41, p.600—623, 2004.
- OKKERS, D. J. et al. Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, p.726–734, 1999.
- OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G., RIBEIRO, C. M., GOMES, M. I. F. V. Potencial bioterapêutico dos probióticos nas parasitoses intestinais. **Ciência Rural**, v.38, n.9, p.2670-2679, 2008.
- OMAYE, S. T. **Food and Nutritional Toxicology**. 1.ed. Flórida: CRC Press LLC, 2004.
- OMURTAG, G. Z., BEYOGLU, D. Occurrence of deoxynivalenol (vomitoxin) in beer in Turkey detected by HPLC. **Food Control**, v.18, p.163–166, 2007.
- ONAYE, S. T. **Food and Nutritional Toxicology**. 1.ed. Flórida: CRC Press LCC, 2004.

- OSWEDER, G. D. Mycotoxins. **The Veterinary Clinics of North America-Equine practice**, v.17, p.547-566, 2001.
- OUWEHAND, A. C., VESTERLUND, S. Antimicrobial components from lactic acid bacteria in: SALMINEN, S., VON WRIGHT, A., OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. 3.ed. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2004.
- PACIN, A. et al. Effect of the bread making process on wheat flour contaminated by deoxynivalenol and exposure estimate. **Food Control**, v.21, p.492–495, 2010.
- PAOLESSE, R. et al. Detection of fungal contamination of cereal grain samples by an electronic nose. **Sensors and Actuators B**, v.119, p.425-430, 2006.
- PARRY, D. W., JENKINSON, P., McLEOD, L. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals – a review. **Plant Pathology**, v.44, p.207-238, 1995.
- PELTONEN, K. et al. Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.2152-2156, 2001.
- PESTKA, J. J. Deoxynivalenol toxicity, mechanisms and health risks. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, p.283-298, 2007.
- PESTKA, J.J., SMOLINSKI, A.T. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v.8, p.39–69, 2005.
- PIARD, J. C., DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Oxygen metabolites and catabolism end-products. **Lait**, v.71, p.525–541, 1991.
- PINTON, P. et al. Ingestion of deoxynivalenol (DON) contaminated feed alters the pig vaccinal immune responses. **Toxicology Letters**, v.177, p.215–222, 2008.
- PINTON, P. et al. The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.237, p.41–48, 2009.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2.ed. New York: Aspen Publications, 1999.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 3.ed. New York: Springer Science Business Media, 2009.
- PIVA, G. et al. Detoxification methods of aflatoxins. **Annual Review of Nutrition Research**, v.15, p.767–776, 1995.
- 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.
- POOLMAN, B. Energy transduction in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiological Reviews**, v.12, p.125-148, 1993.

PROCTOR, R. H., HOHN, T. M., McCORMICK, S. P. Reduced virulence of *Giberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. **Molecular Plant and Microbe Interactions**, v.8, p.593-601, 1995.

RAMIREZ, L., CHULZE, S., MAGAN, N. Impact of environmental factors on growth and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. **Crop Protection**, v.23, p.117–125, 2004.

RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their micotoxicoses -an overview. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, p.3-10, 2007.

RICHARD, J.L. Mycotoxins -an overview. **Romer Labs' Guide to Mycotoxins**, v.1, p.1–48, 2000.

RILEY, M. A., GORDON, D. M. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. **Trends in Microbiology**, v.7, n.3, p.129-133, 1999.

RIZZO, A. et al. The hemolytic activity of deoxynivalenol and T-2 toxin. **Natural Toxins**, v.1, p.106–110, 1992.

RODRIGUEZ, J. M. et al. Unsuitability of the MRS medium for the screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v.25, p.73–74, 1997.

ROSS, R. P., MORGAN, S., HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of food Microbiology**, v.79, p.3-16, 2002.

ROTHKÖTTER, H.J., SOWA, E., PABST, R. The pig as a model of developmental immunology. **Human and Experimental Toxicology**, v.21, p.533–536, 2002.

ROUSE, S. et al. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.915–923, 2008.

ROY, U. et al. Production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CHD-28.3. **International Journal of Food Microbiology**, v.32, p.27–34, 1996.

SAMAR, M. et al. Deoxynivalenol reduction during the frying process of turnover pie covers. **Food Control**, v.18, p.1295–1299, 2007.

SCHILLINGER, U., GEISEN, R., HOLZAPFEL, W.H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 158-164, 1996.

SCHISLER, D. A., KHAN, N. I., BOEHM, M. J. Biological control of *Fusarium* head blight of wheat and deoxynivalenol levels in grain via use of microbial antagonists. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.504, p.53-69, 2002.

SCHLATTER, J. Toxicity data relevant for hazard characterization. **Toxicology Letters**, v.153, p.83– 89, 2004.

- SCHNÜRER, J., MAGNUSSON, J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. **Trends in Food Science & Technology**, v.16, p.70–78, 2005.
- SCHOLBROCK, L. L., FLEENER, B. K., BERRY, J. A. Comparison of wheat seedling leaf reactions to deoxynivalenol in relation to wheat scab (*Fusarium graminearum*) resistance classes. **Phytopathology**, v.82, p.1167, 1992.
- SCOTT, P. M. et al. Decline in deoxynivalenol (vomitoxin) concentrations in 1983 Ontario winter wheat before harvest. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, n.4, p.884–886, 1984.
- SCUDAMORE, K. A. et al. Fate of the *Fusarium* mycotoxins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone, during extrusion of wholemeal wheat grain. **Food Additives and Contaminants**, v.25, n.3, p.331–337, 2008.
- SHAHIN, A. A. M. Removal of Aflatoxin B1 from contaminated liquid media by dairy lactic acid bacteria. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.9, n.1, p.71–75, 2007.
- SHEPHERD, M. J., GILBERT, J. Long-term storage stability of deoxynivalenol standard reference solutions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.36, p.305–308, 1988.
- 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.
- SILVA, M. et al. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.31, p.1231–1233, 1987.
- SILVA, C. F. et al. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**, v.25, p.951–957, 2008.
- SILVA, N da, JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F. A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 1. ed. São Paulo: Varela, 1997.
- SIMOVA, E. et al. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.28, p.1–6, 2002.
- SJÖGREN, J. et al. Antifungal 3–hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.7554–7557, 2003.
- SLININGER, P.J., BOTHAST, R.J., SMILEY, K.L. Production of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol. **Applied and Environmental Microbiology**, v.46, p.62–67, 1983.
- SNIDJERS, C. H. A. Systemic fungal growth of *Fusarium culmorum* in stems of winter wheat. **Journal of Phytopathology**, v.129, p.133–140, 1990.
- SNIDJERS, C. H. A., PERKOWSKI, J. Effects of head blight caused by *Fusarium culmorum* on toxin content and weight of wheat kernels. **Journal of Phytopathology**, v.80, p.566–570, 1990.

- SOOMRO, A. H., MASUD, T., ANWAAR, K. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health – a review. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.1, n.1, p.20-24, 2002.
- SROBÁROVÁ, A., SLIKOVÁ, S., SUDYOVÁ, V. Diversity of the *Fusarium* species associated with head and seedling blight on wheat in Slovakia. **Biologia**, v.63, n.3, p.332–337, 2008.
- STEYN, P. S. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. **Toxicology Letters**, v.83, p.843851, 1995.
- STILES, J et al. Antifungal activity of sodium acetate and *Lactobacillus rhamnosus*. **Journal of Food Protection**, v.65, p.1188– 1191, 2002.
- STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v.36, p.1–29, 1997.
- STILES, M. E. Biopreservation by lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.70, p.331–345, 1996.
- STYRIAK, I., CONKOVÁ, E. Microbial binding and biodegradation of mycotoxins. **Veterinary and Human Toxicology**, v.44, p.358-361, 2002.
- STYRIAK, I. et al. The effect of some *Lactobacillus* strains on deoxynivalenol biodegradation. **Nutrition & Food Science**, v.37, n.6, p.457-461, 2007.
- STRANKS, J. **The A-Z of food safety**. 1.ed. London: Thorogood Publishing, 2007.
- STRÖM, K. **Fungal Inhibitory lactic acid bacteria – Characterization and application of *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393**. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Department of Microbiology, Uppsala, 2005.
- STRÖM, K. et al. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(LPhe-trans-4-OH-L-Pro) and phenyl lactic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4322–4327, 2002.
- SUDAKIN, D. L. Trichothecenes in the environment: relevance to human health. **Toxicology Letters**, v.143, p.97-107, 2003.
- SUNG, H. W. et al. A natural compound (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri* for biological-tissue fixation. **Biomaterials**, v.24, p.1335–1347, 2003.
- SUTTON, J. C. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.4, p.195-209, 1982.
- SWANSON, S. P. et al. Metabolism of three trichothecene mycotoxins, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol and deoxynivalenol, by bovine rumen microorganisms. **Journal of Chromatography B-Biomedical Sciences and Applications**, v.414, p.335-342, 1987.

- TALARICO, T.L. et al. Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: purification of 1,3-propanediol:NADH + H⁺ oxidoreductase. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.943–948, 1990.
- TALARICO, T.L. et al. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.32, p.1854–1858, 1988.
- TALARICO, T.L., DOBROGOSZ, W.J. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.33, p.674–679, 1989.
- TAMINE, A. **Fermented Milks**. 1.ed. Singapura: Blackwell Science Ltda, 2006.
- TANAKA, T. et al. Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone survey of 19 countries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.36, p.979-983, 1988.
- TOBÍA, C. et al. Aislamiento, selección y caracterización de bacterias ácido lácticas en ensilajes de soya (*Glycine max* L. Merr.). **Agronomía Costarricense**, v.27, p.21-27, 2003.
- TOLDRÁ, F. **Handbook of Fermented Meat and Poultry**. 1.ed. Iowa: Blackwell Publishing Professional, 2007.
- TOMCZAK, M. et al. Deoxynivalenol, nivalenol and moniliformin in wheat samples with head blight (scab) symptoms in Poland (1998–2000). **European Journal of Plant Pathology**, v.108, p.625–630, 2002.
- TÓTH, B. et al. Common resistance of wheat to members of the *Fusarium graminearum* species complex and *F. culmorum*. **Plant Breeding**, v.127, p.1—8, 2008.
- TRINGE, S. G., HUGENHOLTZ, P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA. **Current Opinion in Microbiology**, v.11, p.442–446, 2008.
- TUCKER, G. S. **Food Biodeterioration and Preservation**. 1.ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2008.
- TUTELYAN, V. A. Deoxynivalenol in cereals in Russia. **Toxicology Letters**, v.153, p.173–179, 2004.
- VALÉRIO, F. et al. Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. **Systematic and Applied Microbiology**, v.32, p.438-448, 2009.
- VALÉRIO, F. et al. Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. **FEMS Microbiology Letters**, v.233, p.289-295, 2004.
- VANDAMME, P. et al. Polyphasic taxonomy: a consensus approach to bacterial systematic. **Microbiological Reviews**, v.60, p.407-438, 1996.

- VASILJEVIC, T., SHAH, N. P. Probiotics-from Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v.18, p.714-728, 2008.
- VEIGA DA CUNHA, M., FOSTER, M.A. Sugar-glycerol cofermentations in lactobacilli: the fate of lactate. **Journal of Bacteriology**, v.174, p.1013–1019, 1992.
- VISCONTI, A. et al. Reduction of deoxynivalenol during durum wheat processing and spaghetti cooking. **Toxicology Letters**, v.153, p.181–189, 2004.
- VOGELMANN, S. A. et al. Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains starters. **International Journal of Food Microbiology**, v.130, p.205–212, 2009.
- VOLLENWEIDER, S. et al. Purification and structural characterization of 3-hydroxypropionaldehyde and its derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.3287–3293, 2003.
- VOLLENWEIDER, S., LACROIX, C. 3-Hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, p.16–27, 2004.
- VOULGARI, K. et al. Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products. **Food Control**, v.21, p.136–142, 2010.
- WALTER, S., NICHOLSON, P., DOOHAN, F. Actions and reaction of host and pathogen during Fusarium head blight disease. **New Phytologist**, v.185, p.54-66, 2010.
- WESSELS, S. et al. The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. **Trends in Food Science and Technology**, v.15, p.498-505, 2004.
- WHITTENBURY, R. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. **Journal of General Microbiology**, v.35, p.13-26, 1964.
- WHO. **Evaluation of certain mycotoxins in foods** (Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). Technical Report Series, n.906, New York, World Health Organization, 2002.
- WIDESTRAND, J., PETTERSSON, H. Effect of time, temperature and solvent on the stability of T-2 toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol and nivalenol calibrants. **Food Additives and Contaminants**, v.18, p.987–992, 2001.
- WINDELS, C. E., KOMMEDAHL, T. Late-season colonization and survival of *Fusarium graminearum* Group II in cornstalks in Minnesota. **Plant Disease**, v.68, p.791-793, 1984.
- WINDELS, C.E. Economic and social impacts of Fusarium head blight: changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. **Phytopathology**, n.90, p.17–21, 2000.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v.51, n.2, p.221-271, 1987.

WOLF, G. et al. Heme-dependent catalase activity of lactobacilli. **International Journal of Food Microbiology**, v.12, p.133-140, 1991.

WOOD, B. J. B., HOLZAPFEL, W. H. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. 1.ed. Glasgow: Chapman & Hall, 1995.

WOOLFORD, M.K. Microbiological screening of the straight chain fatty acids (C1–C12) as potential silage additives. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.26, p.219–228, 1975.

WOOLFORD, M.K. The antimicrobial spectra of organic compounds with respect to their potential as hay preservatives. **Grass and Forage Science**, v.39, p.75–79, 1984.

WU, F. Measuring the economic impacts of *Fusarium* toxins in animal feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, p.363–374, 2007.

WU, F. Mycotoxin risk assessment for the purpose of setting international regulatory standards. **Environmental Science and Technology**, v.38, n.15, p.4049-4055, 2004.

XUE, A. et al. Biological control of Fusarium head blight of wheat with *Clonostachys rosea* strain ACM 941. **Cereal Research Communications**, suppl. B, v.36, p.695-699, 2008.

YANG, E. J., CHANG, H. C. Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. **International Journal of Food Microbiology**, v.139, p.56–63, 2010.

YANG, R., RAY, B. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v.11, p.281-291, 1994.

YANG, V. A., CLAUSEN, C. A. Antifungal Metabolites of *Lactobacilli*. **Woodframe Housing Durability and Disaster Issues**, p.307-312, 2004.

YUN, S. H. et al. Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic and asexual *Giberella/Fusarium* species. **Fungal Genetics and Biology**, v.31, p.7-20, 2000.

YVON, M., BERTHELOT, S., GRIPON, J.C. Adding α -ketoglutarate to semi-hard cheese curd highly enhances the conversion of amino acids to aroma compounds. **International Dairy Journal**, v. 8, p.889–898, 1998.

ZHANG, T. et al. Effects of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on fermentation, aerobic stability, bacteria diversity and ruminal degradability of alfalfa silage. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.25, p.965–971, 2009.

ZHANG, X. B., OHTA, Y. Binding of mutagens by fractions of lactic acid bacteria on mutagens the cell wall skeleton. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.1477–1481, 1991.

ANEXOS

ANEXO A – Considerações sobre coloração de Gram e teste de catalase

Coloração de Gram

A coloração de Gram é um método de coloração de bactérias desenvolvido pelo médico dinamarquês Hans Christian Joachim Gram (1853 -1838), em 1884, e que consiste no tratamento sucessivo de um esfregaço bacteriano, fixado pelo calor, com os reagentes cristal violeta, lugol, etanol-acetona e fucsina básica. Essa técnica permite a separação de amostras bacterianas em Gram-positivas e Gram-negativas e a determinação da morfologia e do tamanho das amostras analisadas.

O método da coloração de Gram é baseado na capacidade das paredes celulares de bactérias Gram-positivas de reterem o corante cristal violeta no citoplasma durante um tratamento com etanol-acetona enquanto que as paredes celulares de bactérias Gram-negativas não o fazem.

A coloração de Gram é um dos mais importantes métodos de coloração utilizados em laboratórios de microbiologia e de análises clínicas, sendo quase sempre o primeiro passo para a caracterização de amostras de bactérias. A técnica tem importância clínica uma vez que muitas das bactérias associadas a infecções são prontamente observadas e caracterizadas como Gram-positivas ou Gram-negativas em esfregaços de pus ou de fluidos orgânicos. Essa informação permite ao clínico monitorar a infecção até que dados de cultura estejam disponíveis. É possível a análise de vários esfregaços por lâmina, o que facilita a comparação de espécimes clínicos. As lâminas podem ser montadas de forma permanente e preservadas como documentação.

Descrição da técnica

O método consiste no tratamento de uma amostra de uma cultura bacteriana crescida em meio sólido ou líquido, com um corante primário, o cristal violeta, seguido de tratamento com um fixador, o lugol. Tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas absorvem de maneira idêntica o corante primário e o fixador, adquirindo uma coloração violeta devido à formação de um complexo cristal violeta-iodo, insolúvel, em seus citoplasmas. Segue-se um tratamento com um solvente orgânico, o etanol-acetona (1:1 v:v). O

solvente dissolve a porção lipídica das membranas externas das bactérias Gram-negativas e o complexo cristal violeta-iodo é removido, descorando as células. Por outro lado, o solvente desidrata as espessas paredes celulares das bactérias Gram-positivas e provoca a contração dos poros do peptidoglicano, tornando-as impermeáveis ao complexo; o corante primário é retido e as células permanecem coradas. A etapa da descoloração é crítica, pois a exposição prolongada ao solvente irá provocar a remoção do cristal violeta dos dois tipos de bactérias, podendo produzir resultados falsos. A retenção ou não do corante primário é, portanto, dependente das propriedades físicas e químicas das paredes celulares bacterianas tais como espessura, densidade, porosidade e integridade.

Em seguida, a amostra é tratada com um corante secundário, a fucsina básica. Ao microscópio, as células Gram-positivas aparecerão coradas em violeta escuro e as Gramnegativas em vermelho ou rosa escuro. Células de bactérias Gram-positivas, células velhas, mortas ou com envelopes danificados por agentes físicos ou químicos, tendem a perder o cristal violeta e uma mesma amostra bacteriana pode exibir parte ou todas as células coradas como Gram-negativas. Portanto, o uso de material fresco é importante. Por outro lado, resultados do tipo "falso Gram-positivo" só são obtidos se o tratamento com etanol-acetona for omitido.

O corante cristal violeta pode ser substituído, com os mesmos resultados, pelo azul de metileno e a fucsina básica pode ser substituída pelo corante vermelho safranina. A fucsina cora muitas bactérias Gram-negativas mais intensamente que a safranina, que por sua vez não cora prontamente algumas espécies de bactérias. O solvente etanol-acetona pode ser substituído por álcool 95%.

Teste de catalase

O teste da catalase é utilizado para detectar a presença da enzima catalase pela decomposição de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, que ocorre na maioria das bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas que contêm citocromo.

Uma das formas de sua realização consiste na adição de 4 a 5 gotas de peróxido de hidrogênio 3% (v/v) sobre uma lamina de microscópio e depois realizar o esfregaço de uma colônia sobre esta, se houver a formação de bolhas trata-se de um microrganismo catalase positivo.

ANEXO B – Câmara de Neubauer

Quando se trabalha com microrganismos, na maioria das vezes deseja-se determinar a concentração de células da suspensão preparada. Uma das formas mais comuns de se obter esta estimativa é através da contagem ao microscópio, utilizando-se uma Câmara de Neubauer, também conhecida como Hemacitômetro ou Câmara de Contagem.

A Câmara de Neubauer consiste de uma lâmina de microscopia, bem mais alta do que uma lâmina normal, onde existe uma câmara gravada no vidro (as duas partes mais escuras no centro—cada lâmina contém geralmente duas câmaras). Ao lado da câmara existem dois suportes (as duas barras cinza-claro ao lado da câmara) que mantêm uma lamínula especial de quartzo exatamente a 10^{-1} mm acima do chão da câmara (Figura 1). Assim, quando se coloca uma solução na câmara e se cobre a mesma com a lamínula, a profundidade da solução é conhecida.



Figura 1 – A Câmara de Neubauer com lamínula.

Nesta câmara também são gravadas marcações que a dividem em quadrantes de dimensões conhecidas. Cada câmara possui 9 quadrados de contagem, cada um com 1mm^2 de área (Figura 2), resultando em uma área total de 9mm^2 .

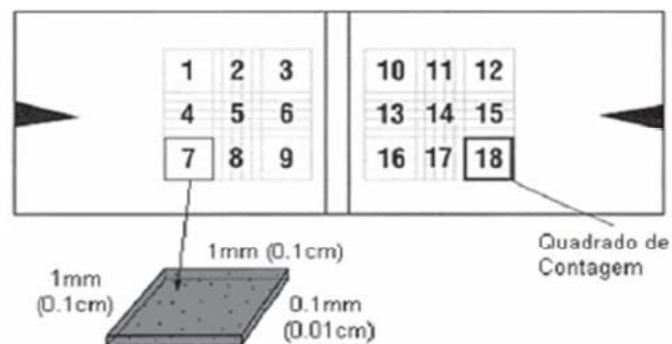


Figura 2 – Área sob a lamínula.

Observando-se o gabarito de uma Câmara de Neubauer (Figura 3), percebe-se que existem três tipos diferentes de quadrados de contagens, denominados A, B e C. Pode-se notar que as marcações destes quadrantes têm dimensões diferentes, permitindo que sejam realizadas contagens de células de tamanhos diferentes: células grandes são contadas no quadrante A, as de tamanho intermediário no quadrante B e as células muito pequenas no quadrante C.

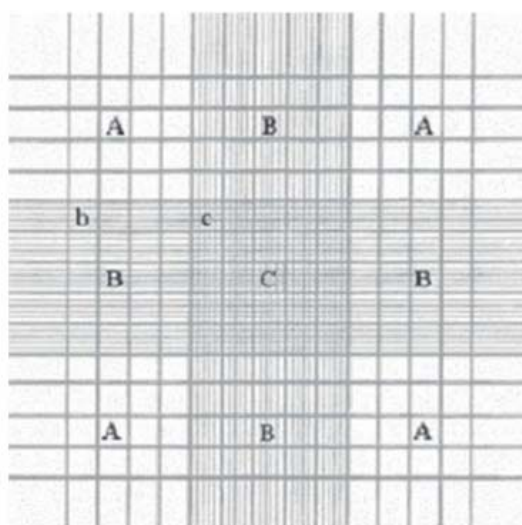


Figura 3– Gabarito de uma Câmara de Neubauer.

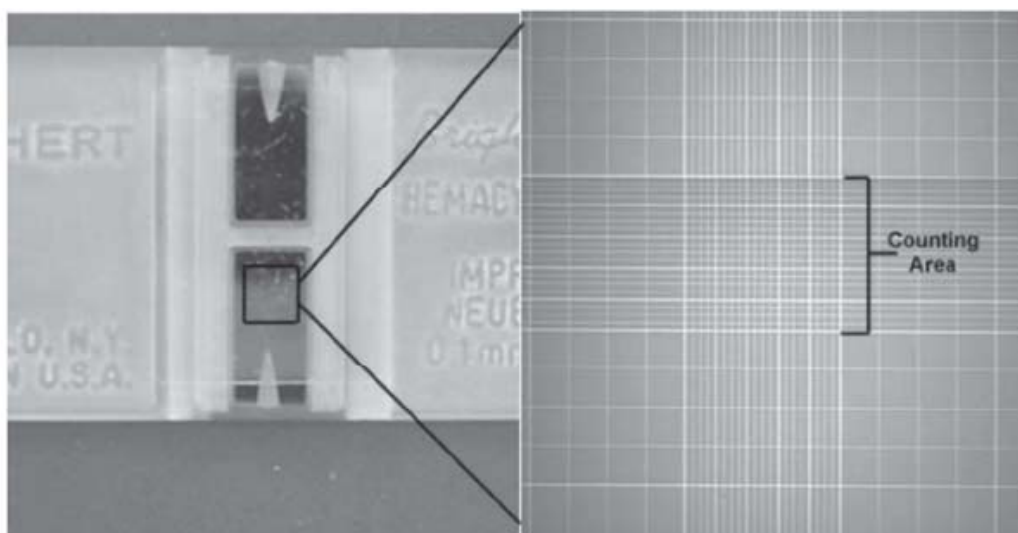
Como a área de cada quadrado de contagem é conhecida e a profundidade da solução também, pode-se determinar o volume de cada câmara formada entre as marcações, como mostrado na Tabela 1. A Figura 4 mostra uma imagem de microscópio da Câmara de Neubauer.

Para se realizar a estimativa da concentração de células, são realizadas contagens da quantidade de células encontradas em cada quadrado menor, o que dividido pelo respectivo volume resulta na concentração de células por mm^3 . Para se obter a média da concentração de uma amostra, são realizadas diversas contagens em quadrados diferentes, calculando-se a média e o desvio padrão. A precisão da contagem manual utilizando este método depende basicamente:

- da mistura correta da amostra, para que a concentração esteja homogênea e que não se formem bolhas;
- do número de câmaras contadas;
- do número de células contadas, onde a concentração viável é de 200 a 500 por 0.1 mm.

Tabela 1 – Área e volume de cada quadrado de contagem.

Quadrante	Área (mm ²)	Volume (mm ³)
A (quadrados maiores)	0,0625	0,00625
B (retângulos)	0,0125	0,00125
C (quadrados menores)	0,0025	0,00025

**Figura 4** – Vista da área de contagem da Câmara de Neubauer.

**ANEXO C – Composição de carboidratos das galerias do teste bioquímico API 50 CH
(Biomérieux SA, Marcy L’Etoile, França)**

COMPOSITION OF THE STRIP

STRIP 0-9 tube / substrate	STRIP 10-19 tube / substrate	STRIP 20-29 tube / substrate	STRIP 30-39 tube / substrate	STRIP 40-49 tube / substrate
0 CONTROL	10 GALactose	20 α -Methyl-D-Mannoside	30 MELibiose	40 D TURanose
1 GLYcerol	11 GLUcose	21 α -Methyl-D-Glucoside	31 Sucrose	41 D LYXose
2 ERYthritol	12 FRUctose	22 N-Acetyl-Glucosamine	32 TREhalose	42 D TAGatose
3 D ARAbinose	13 MaNnosE	23 AMYgdalin	33 INUlin	43 D FUCose
4 L ARAbinose	14 SorBosE	24 ARButin	34 MeLeZitose	44 L FUCose
5 RIBose	15 RHAmnose	25 ESCulin	35 RAFFinose	45 D ARabitoL
6 D XYLose	16 DULcitol	26 SALicin	36 Starch	46 L ARabitoL
7 L XYLose	17 INOsitol	27 CELlobiose	37 GLYcoGen	47 GlucoNaTe
8 ADOnitol	18 MANnitol	28 MALtose	38 XyLiTol	48 2-Keto-Gluconate
9 β Methyl-D-Xyloside	19 SORbitol	29 LACtose	39 GENTIobiose	49 5-Keto-Gluconate

ANEXO D – Composição do meio API 50 CHL (Biomérieux SA, Marcy L'Etoile, França)

API 50 CHL Medium 10 ml	Polypeptone	10 g
	Yeast extract	5 g
	Tween 80	1 ml
	Dipotassium phosphate	2 g
	Sodium acetate 3H ₂ O	5 g
	Diammonium citrate	2 g
	Magnesium sulphate 7H ₂ O	0.20 g
	Manganese sulphate 4H ₂ O	0.05 g
	Bromocresol Purple	0.17 g
Demineralized water	to make 1000 ml	

ANEXO E – Escala de Mac Farland

A escala de Mac Farland consiste numa série de 10 tubos de diâmetro uniforme contendo os produtos da reação de diferentes volumes de BaCl₂ a 1% misturados a diferentes volumes de H₂SO₄ a 1%. Dessa forma, obtém-se uma série de tubos contendo volumes iguais de uma suspensão de turbidez crescente, em correspondência com a quantidade de BaSO₄ que se forma. O grau de turbidez em cada tubo corresponde a determinada concentração bacteriana, conforme demonstrado na tabela abaixo:

Tabela – Valores da escala de Mac Farland, em relação ao número e a composição do tubo e sua correspondência em número de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC. mL⁻¹).

Tubo nº	Composição (em mL)		Concentração bacteriana em milhões/mL
	BaCl ₂ a 1%	H ₂ SO ₄ a 1%	
0	0	10	0
1	0,1	9,9	3,0 X 10 ⁸
2	0,2	9,8	6,0 X 10 ⁸
3	0,3	9,7	9,0 X 10 ⁸
4	0,4	9,6	1,2 X 10 ⁹
5	0,5	9,5	1,5 X 10 ⁹
6	0,6	9,4	1,8 X 10 ⁹
7	0,7	9,3	2,1 X 10 ⁹
8	0,8	9,2	2,4 X 10 ⁹
9	0,9	9,1	2,7 X 10 ⁹
10	1,0	9,0	3,0 X 10 ⁹

Fonte: BIER, 1990.

ANEXO F – Composição tampão fosfato salino pH 7,2

A formulação da solução tampão foi produzida conforme itens prescritos abaixo:

Tabela 1 – Composição PBS Doubecco's 0,015 M pH 7,2

Composto	Quantidade
Cloreto de sódio (NaCl)	8,0 g
Cloreto de potássio (KCl)	0,2 g
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	1,15 g
Hidrogenofosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	0,2 g
Água destilada	Suficiente para completar 1 L

Ajustar o pH da solução final para 7,2 com soluções de ácido clorídrico (HCl 0,1 N) ou NaOH 0,1 N.