

DOSAGEM DE ERGOSTEROL COMO INDICADOR DE CONTAMINAÇÃO FÚNGICA EM MILHO ARMAZENADO

R.J.Q. Moraes, C.A.A. Almeida, P. Dilkin, C.H. Kowalski, L. Mürmann, C.A. Mallmann

Laboratório de Análises Micotoxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, prédio 44, CEP 97119-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: mallmann@ccr.ufsm.br

RESUMO

Correlacionou-se a concentração de ergosterol com o número de unidades formadoras de colônias fúngicas e aflatoxina em 40 amostras de milho. A extração do ergosterol foi realizada através de irradiação em forno microondas e a quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As unidades formadoras de colônias foram contadas a partir da semeadura das amostras em meio de cultura DRBC, nas diluições de 10^{-2} a 10^{-5} e incubadas por um período de até 7 dias a 28° C. A quantificação da aflatoxina foi realizada por cromatografia em camada delgada. O nível de ergosterol das amostras variou de 1,11 a 32,6 ppm e as unidades formadoras de colônias de $3,33 \times 10^3$ a $2,23 \times 10^5$. A presença de aflatoxinas foi constatada em 62,5% das amostras. A correlação entre a quantidade de ergosterol e as unidades formadoras de colônias fúngicas foi de $r = 0,94$, demonstrando alta relação entre estas variáveis. No entanto, a correlação entre concentração de ergosterol e presença de aflatoxina apresentou-se baixa ($r = 0,4$). Os resultados indicam que a determinação dos níveis de ergosterol representa uma possibilidade de avaliação do grau de contaminação fúngica do milho, em substituição à técnica de contagem de unidades formadoras de colônias.

PALAVRAS-CHAVE: Ergosterol, aflatoxina, fungos, milho, unidades formadoras de colônias.

ABSTRACT

DOSAGE OF ERGOSTEROL AS AN INDICATOR OF FUNGI CONTAMINATION OF STORED MAIZE. Ergosterol concentration was correlated with the number of fungal colony-forming units and aflatoxin in 40 corn samples. Ergosterol extraction was made through irradiation in a microwave oven, and quantification by high performance liquid chromatography (HPLC). The colony forming units were counted from the sowing of samples in DRBC culture medium at dilutions from 10^{-2} to 10^{-5} and next incubated for a period until 7 days at 28° C. Aflatoxin quantification was made by thin-layer chromatography. The ergosterol levels of the samples varied from 1.11 to 32.6 ppm, and the colony-forming units from 3.33×10^3 to 2.23×10^5 . Presence of aflatoxins was noticed in 62.5 % of the samples. The correlation between the ergosterol quantity and the colony forming units was $r = 0.94$, demonstrating high relations between these variables. However, the correlation between ergosterol concentration and presence of aflatoxin showed to be low ($r = 0.4$). The results indicate that the determination of ergosterol levels represent a possibility of an evaluation of the corn's degree of fungal, in substitution of the counting technique of colony-forming units.

KEY WORDS: Ergosterol, aflatoxin, fungi, corn, colony-forming units.

INTRODUÇÃO

O ergosterol é o mais importante esterol, constituinte natural das células ou membranas miceliais da grande maioria dos fungos. Os maiores níveis são encontrados nas camadas fosfolipídicas da membrana fúngica (SEITZ *et al.*, 1977; PEACOCK & GOOSEY, 1989) onde desempenha importante função estrutural e hormonal na progressão do ciclo celular (GOAD, 1994). A concentração do ergosterol numa massa fúngica é dependente

do estágio de desenvolvimento, e em consequência da umidade, temperatura e tempo de crescimento.

O ergosterol é praticamente insolúvel em água, mas apresenta boa solubilidade em solventes orgânicos. Possui boa estabilidade na manipulação laboratorial, principalmente, quando conservado em meio alcalino (GESSNER & SMITT, 1996) e protegido da luz ultravioleta (SCHWADORF & MULLER, 1989). A determinação do ergosterol na biomassa fúngica pode ser realizada por espectrofotometria ultravioleta e infravermelha,

associadas a métodos cromatográficos como camada delgada, líquida de alta eficiência (SEITZ *et al.*, 1977; REGNER *et al.*, 1994) e gasosa (EVERSCHED *et al.*, 1988). Conforme SEITZ *et al.* (1977) e BERGMINGHAM *et al.* (1995) a quantificação do ergosterol tem sido utilizada como indicador da concentração fúngica em sementes e folhas. WEST *et al.* (1987) e MARTIN *et al.* (1990) quantificaram o ergosterol de amostras de solo para estimar a biomassa fúngica.

Métodos microbiológicos como contagem de unidades formadoras de colônias são amplamente empregados para estimar a quantidade de biomassa fúngica presente em sementes e alimentos (PITT, 1984; GOURAMA & BULLERMAN, 1995). Porém, os valores das unidades formadoras não refletem exatamente a biomassa fúngica, mas sim a quantidade de esporos fúngicos produzidos. PITT (1984) constatou que o aumento da contagem de células viáveis provenientes da esporulação pode ser de até 10 vezes maior do que a biomassa fúngica e área de colônias fúngicas inoculadas por um período de 4 dias. Contudo, também possuem a desvantagem de não avaliarem fragmentos de micélios não viáveis como também de ser um método muito laborioso e demorado (SCHNÜRER, 1991).

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos toxigênicos dos gêneros *Aspergillus*, capazes de causar diversos efeitos tóxicos em animais (COULOMBE, 1991). Atualmente são conhecidos 18 compostos pelo termo de aflatoxinas, porém 4 delas conhecidas como aflatoxina, B₁, B₂, G₁ e G₂ são de interesse médico-sanitário (COULOMBE, 1991). A aflatoxina B₁ é a de maior ocorrência e importância toxicológica. São frequentemente isoladas em cereais e subprodutos destinados à alimentação humana e animal (RODRIGUEZ-AMAYA & SABINO, 2002).

Frente às dualidades e dificuldades para determinar o grau de contaminação fúngica presente em cereais, nosso objetivo é avaliar e comparar as duas metodologias e estabelecer uma correlação entre concentração de colesterol e contagem de unidades formadoras de colônias. Em paralelo investigamos a incidência de aflatoxinas e da microflora dominante nas amostras de milho.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de milho

Foram utilizadas 40 amostras de milho provenientes de empresas agropecuárias do sul do Brasil, nos meses de julho e agosto de 1998. As amostras eram provenientes de milho destinado para a alimentação de aves e suínos, armazenado por aproximadamente 6 meses em diferentes tipos de silos, porém com ambiente controlado por meio de ventilação forçada. Aproximadamente 1 kg de amostra foi enviado ao laboratório, sendo que foram imediatamente trituradas (tamanho da partícula menor que 0,2 mm) e individualmente estocados a -18° C até serem analisadas.

Preparo dos padrões de ergosterol

A solução de ergosterol (Sigma Chemical, St. Louis, EUA) foi obtida a partir de diluição da amostra original (um grama em 100 mL de etanol absoluto) obtendo concentração inicial de 10 mg/mL. A partir desta foram realizadas diluições sucessivas no mesmo solvente para obtenção de amostra utilizada como padrão de rotina (4,0 µg/mL).

Quantificação do ergosterol contido nas amostras

Extração do ergosterol

O procedimento de extração foi realizado conforme a técnica preconizada por YOUNG (1995) com algumas modificações. Adicionaram-se 2 mL de metanol e 500 µL de hidróxido de sódio (2 M) a 250 mg de amostra de milho triturado. A solução foi submetida à irradiação em forno de microondas (1,5 KWh) a 50% da potência (20 e 15 segundos, com 10 minutos de intervalo). O resfriamento da amostra foi realizado a temperatura ambiente por um período de 15 minutos. Em seguida o pH foi neutralizado pela adição de 850 µL de ácido clorídrico 1 M. Juntaram-se mais 2 mL de metanol para proceder a extração final. Esta foi realizada em triplicata, empregando 3 mL de pentano por vez, sob agitação por 5 segundos. O extrato recuperado foi juntado e evaporado com fluxo de ar quente (60° C) e estocado a -18° C até a quantificação do ergosterol.

Quantificação cromatográfica do ergosterol

O ergosterol foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando metodologia adaptada das técnicas preconizadas por MILLER *et al.* (1983), NAEWBANIJ *et al.* (1984) e SCHNÜRER (1991). O extrato purificado foi resuspendido em 500 µL de metanol, sendo 20 µL injetados no sistema cromatográfico. A quantificação foi realizada através de HPLC (GBC, Scientific Equipment Pty, Victoria, Austrália) utilizando metanol como fase móvel a um fluxo de 1 mL/minuto por uma coluna cromatográfica Lichrospher RP₁₈ 5 µm, 125 x 4,6 mm (Merck, Darmstadt, Alemanha). A coluna foi acoplada a uma pré-coluna e mantida a uma temperatura constante de 45°C. O ergosterol foi identificado com detector de ultravioleta com comprimento de ondas fixado em 330 nanômetros. O tempo de retenção cromatográfica do ergosterol foi de aproximadamente 4,6 minutos. A quantificação foi realizada através da medida da área do pico correspondente ao ergosterol contido na

amostra, comparado com a área do pico correspondente ao padrão de ergosterol.

A recuperação do método foi testada em triplicata, com 4 níveis de ergosterol (1,7 – 13,6 µg de ergosterol por grama de milho) analisado conforme metodologia descrita. A recuperação média foi de 99,6%. O limite de quantificação foi estipulado através de diluições e análises sucessivas de ergosterol. A menor concentração detectada em triplicata, cujos picos apresentaram oscilações a partir da linha de base na razão de 5:1 foi tida como limite de quantificação, que correspondeu a 0,11 µg/g. As amostras que apresentaram concentrações de ergosterol superiores a 13,6 µg/g de milho foram diluídas e novamente analisadas.

Metodologia da avaliação das unidades formadoras de colônias.

As contagens das unidades formadoras de colônias fúngicas (UFC) foram realizadas a partir de amostras do milho triturado (tamanho das partículas menores que 0,2 mm) conforme metodologia adotada por SWANSON *et al.* (1992). A uma alíquota de 10 g foram adicionados 90 mL de solução de trabalho estéril (1 gota de tween 80 em 1 L de água destilada mais 1,25 mL de solução (34 g de fosfato de potássio em 1 L de água sendo pH corrigido para 7,2). O conteúdo foi agitado por um período de 15 minutos. Alíquota de 1 mL de cada diluição foi colocada com 9 mL de solução de trabalho e agitado por 30 segundos. Em seguida, diluições sucessivas até 10^{-5} foram realizadas. Semearam-se 0,1 mL de cada diluição, com auxílio de alça de platina, em placas de Petri contendo 20 mL de DRBC (GOURAMA & BULLERMAN, 1995). O cultivo foi incubado em estufa a temperatura constante de 25°C por um período de 7 dias e observadas diariamente. As placas que apresentavam entre 15 e 150 colônias foram utilizadas para estudar a contagem, sendo o resultado expresso em unidades formadoras de colônias por grama de amostra (MISLEVIC *et al.*, 1992). As colônias fúngicas foram identificadas e classificadas por gênero (RAPER & FENNELL, 1965; NELSON *et al.*, 1983; SAMSON & PITT, 1985).

Análise da aflatoxina

A análise da aflatoxina foi realizada em amostra de milho previamente triturado (tamanho das partículas menores que 0,2 mm), juntando-se 50 g desta com 270 mL de metanol mais 30 mL de cloreto de potássio a 4%. A extração foi realizada sob liquefação em *Blender* por um período de 5 minutos e passado em papel filtro Watman número 4. Alíquota de 150 mL foi adicionada à mesma quantidade de sulfato de amônia a 30% mais 20 g de decelite. A solução foi homogeneizada e novamente passada em papel filtro Watman número 4. Juntou-se uma alíquota de 150 mL a mesma quantidade de

água deionizada. Adicionaram-se, em duplicata, 10 mL de clorofórmio por vez, agitou-se por 3 minutos e após 15 minutos de decantação coletaram-se 5 mL. Em seguida as duas frações de clorofórmio foram juntadas e evaporadas com fluxo de ar. As amostras foram estocadas a -18° C até a análise. A quantificação foi realizada por cromatografia em camada delgada conforme metodologia preconizada por SOARES & RODRIGUES-AMAYA (1989).

Avaliações estatísticas

As avaliações dos resultados experimentais obtidos foram realizadas empregando-se a estatística descritiva (média, desvio padrão). Os coeficientes de correlação ($p < 0,01$) foram determinados por regressão simples. Os dados foram analisados empregando programa estatístico Statgraphics versão 3.0, 1997 (Startgraphics Manugistics, Rockville, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os níveis de ergosterol obtidos da análise por cromatografia líquida de alta eficiência (Fig. 1) de 40 amostras de milho, naturalmente contaminadas, variaram de 1,11 a 32,62 mg/kg, apresentando uma média geral superior a 5,5 mg/kg (Tabela 1). Apenas 3 amostras apresentaram índices de contaminação maiores de 8 mg/kg, indicativo de intenso desenvolvimento fúngico e qualidade duvidosa do cereal, conforme conclusões de PIVA *et al.* (1998). A concentração média de ergosterol nos grãos de milho indica importante desenvolvimento fúngico na maioria das amostras, pois conforme SEITZ & POMERANZ (1983), grãos de milho saudáveis possuem geralmente concentrações de ergosterol inferiores a 3 mg/kg. A concentração máxima de ergosterol encontrada em amostra de milho no presente trabalho, em todos os casos não atingiu limites máximos detectados por YOUNG (1995) (92,9 mg/kg) e SEITZ *et al.* (1977) (200 mg/kg) em grãos de milho severamente afetados. Obteve-se concentrações moderadas, similares as de SEITZ *et al.* (1982), que encontraram níveis máximos de 44 mg/kg. Concentrações de 9,4 a 10,0 mg/kg foram obtidas por CAHAGNIER *et al.* (1983) e de 13,98 mg/kg foram detectados por NAEWBANIJ *et al.* (1984). SCHWABE *et al.* (1992), citam uma variação de 0,6 a 56,0 mg/kg em diversos cereais e uma média de 3,3 mg/kg em milho, inferior ao nível médio registrado em nosso estudo. Analisando 34 amostras deste cereal, SCHUH & AWAD-MASALMEH (1992) determinaram níveis de 1,0 a 48,0 mg/kg, com média de 3,0 mg/kg de ergosterol e 1×10^5 unidades formadoras de colônias/g de milho, com a presença de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Cladosporium*.

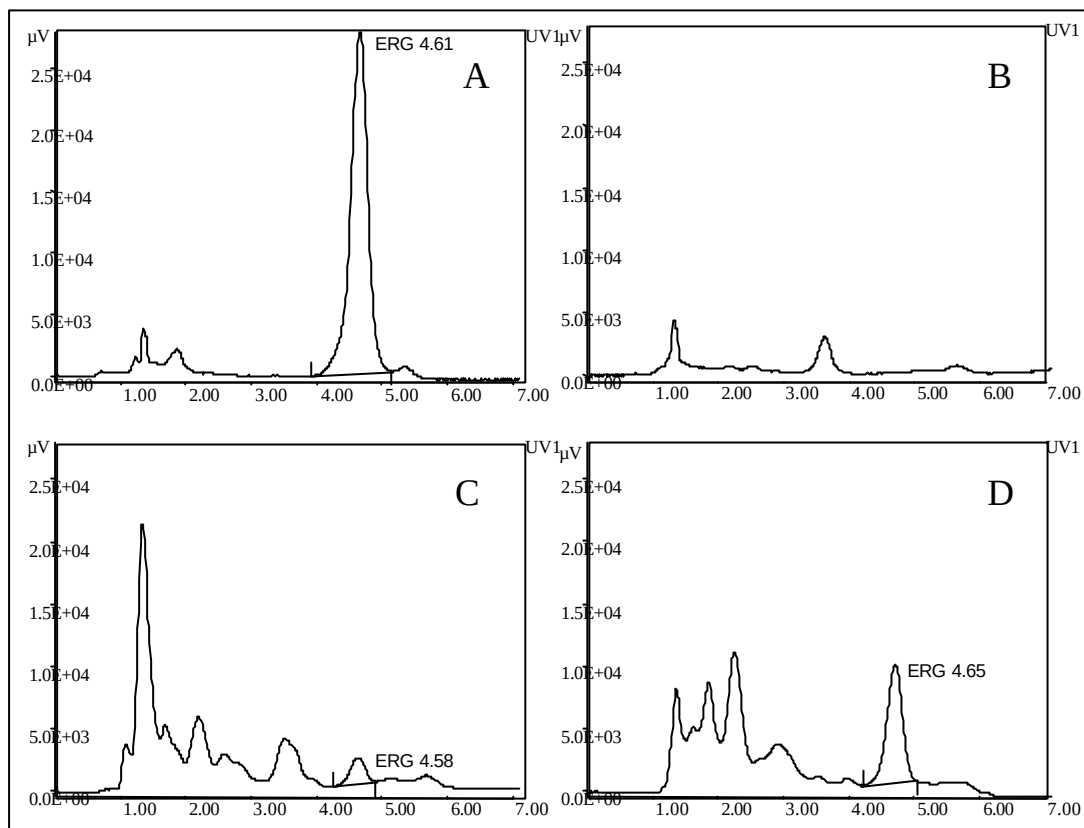


Fig. 1 - Cromatogramas de ergosterol obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência. A = Cromatograma de padrão de ergosterol com 34,28 $\mu g / mL$. B = Cromatograma de amostra de milho sem detecção de ergosterol (limite de detecção de 4 ng / mL). C = Cromatograma de amostra de milho com 6,64 mg de ergosterol / kg de milho. D = Cromatograma de amostra de milho com 32,38 mg de ergosterol / kg de milho.

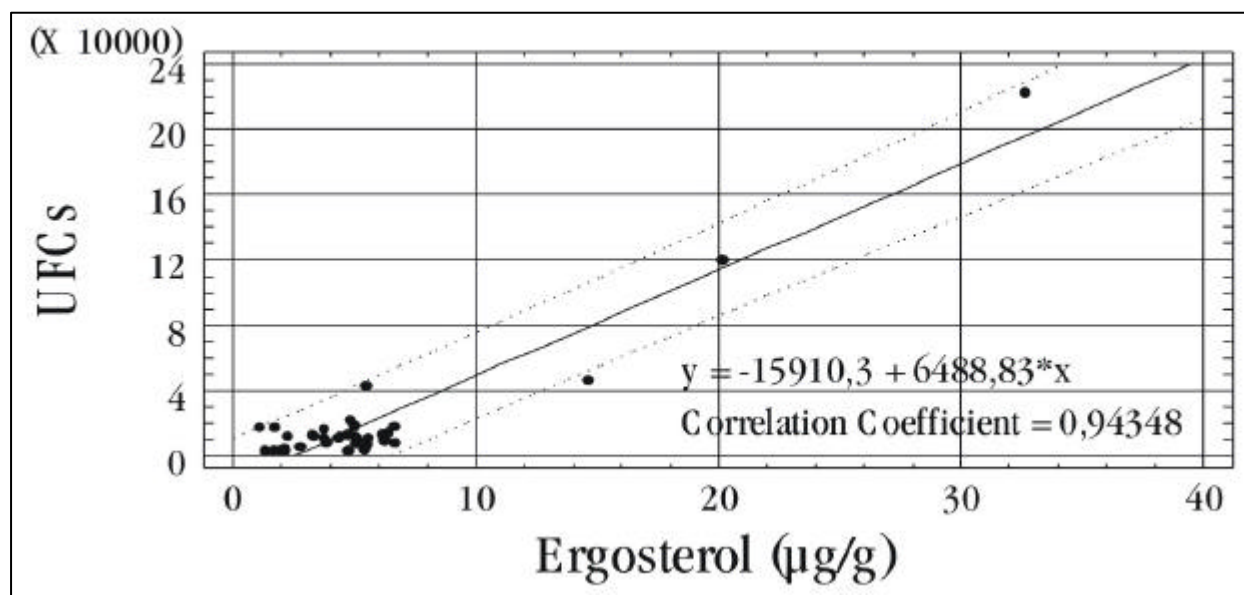


Fig. 2 - Coeficiente de correlação entre os níveis de ergosterol (mg / kg) e as unidades formadoras de colônias encontrados em 40 amostras de milho naturalmente contaminadas.

Tabela 1 - Níveis de ergosterol, unidades formadoras de colônias, gênero fúngico predominante e níveis de aflatoxinas totais encontrados em 40 amostras de milho.

Amostras	Concentração de ergosterol ($\mu\text{g/g}$)*		UFC**	Microbiota fúngica predominante	Aflatoxinas totais ($\mu\text{g/kg}$)
1	4,26	($\pm 0,52$)***	$1,08 \times 10^4$	<i>Fusarium</i>	2,2
2	2,13	($\pm 0,44$)	$0,42 \times 10^4$	<i>Penicillium</i>	ND
3	3,83	($\pm 0,44$)	$0,87 \times 10^4$	<i>Penicillium</i>	1,8
4	4,98	($\pm 1,52$)	$1,15 \times 10^4$	<i>Fusarium</i>	ND
5	5,43	($\pm 1,15$)	$4,20 \times 10^4$	<i>Penicillium</i>	ND
6	5,56	($\pm 0,12$)	$1,10 \times 10^4$	<i>Penicillium</i>	1,2
7	5,35	($\pm 0,06$)	$0,40 \times 10^4$	<i>Penicillium</i>	ND
8	14,61	($\pm 2,23$)	$4,60 \times 10^4$	<i>Aspergillus</i>	216
9	1,64	($\pm 0,33$)	$0,34 \times 10^4$	<i>Fusarium</i>	ND
10	20,17	($\pm 1,21$)	$12,0 \times 10^4$	<i>Aspergillus</i>	540
11	6,41	($\pm 0,71$)	$1,40 \times 10^4$	<i>Penicillium</i>	8,6
12	6,58	($\pm 0,50$)	$1,80 \times 10^4$	<i>Aspergillus</i>	ND
13	5,45	($\pm 1,37$)	$0,63 \times 10^4$	<i>Fusarium</i>	12,6
14	1,69	($\pm 0,18$)	$1,73 \times 10^4$	<i>Aspergillus</i>	ND
15	32,62	($\pm 0,24$)	$22,3 \times 10^4$	<i>Fusarium</i>	ND
16	3,25	($\pm 0,26$)	$1,28 \times 10^4$	<i>Aspergillus</i>	ND
17	3,76	($\pm 0,16$)	$1,06 \times 10^4$	<i>Penicillium</i>	72
18	4,70	($\pm 0,47$)	$0,36 \times 10^4$	<i>Penicillium</i>	ND
19	6,19	($\pm 0,20$)	$1,27 \times 10^4$	<i>Penicillium</i>	ND
20	6,68	($\pm 0,59$)	$0,77 \times 10^4$	<i>Penicillium</i>	ND
21	2,02	($\pm 0,40$)	$0,34 \times 10^4$	<i>Fusarium</i>	17,3
22	2,03	($\pm 0,46$)	$0,34 \times 10^4$	<i>Aspergillus</i>	ND
23	6,21	($\pm 0,90$)	$0,96 \times 10^4$	<i>Penicillium</i>	11,7
24	5,42	($\pm 1,02$)	$0,80 \times 10^4$	<i>Fusarium</i>	ND
25	4,70	($\pm 1,37$)	$1,37 \times 10^4$	<i>Fusarium</i>	1,3
26	2,22	($\pm 0,25$)	$1,17 \times 10^4$	<i>Fusarium</i>	1,0
27	3,71	($\pm 0,52$)	$1,57 \times 10^4$	<i>Aspergillus</i>	2,4
28	5,01	($\pm 0,47$)	$0,67 \times 10^4$	<i>Penicillium</i>	3,8
29	4,35	($\pm 0,59$)	$1,10 \times 10^4$	<i>Penicillium</i>	21,0
30	4,84	($\pm 0,47$)	$2,20 \times 10^4$	<i>Fusarium</i>	29,3
31	2,71	($\pm 0,03$)	$0,49 \times 10^4$	<i>Penicillium</i>	29,0
32	5,11	($\pm 0,21$)	$1,03 \times 10^4$	<i>Aspergillus</i>	24,0
33	4,99	($\pm 0,24$)	$1,93 \times 10^4$	<i>Penicillium</i>	ND
34	4,40	($\pm 0,73$)	$1,17 \times 10^4$	<i>Fusarium</i>	11,8
35	1,11	($\pm 0,27$)	$1,70 \times 10^4$	<i>Fusarium</i>	46,8
36	1,29	($\pm 0,18$)	$0,33 \times 10^4$	<i>Aspergillus</i>	11,7
37	1,88	($\pm 0,13$)	$0,35 \times 10^4$	<i>Fusarium</i>	8,2
38	3,78	($\pm 0,56$)	$0,77 \times 10^4$	<i>Fusarium</i>	17,6
39	3,33	($\pm 0,26$)	$1,13 \times 10^4$	<i>Aspergillus</i>	25,6
40	6,15	($\pm 0,44$)	$1,30 \times 10^4$	<i>Penicillium</i>	17,4

*Média de três repetições. **Unidades formadoras de colônias. ***Desvio padrão.

Em nosso estudo, as unidades formadoras de colônias das amostras estudadas variaram de $3,33 \times 10^3$ até $2,23 \times 10^5$, cujos principais representantes foram fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium*, respectivamente (Tabela 1). No entanto, das 40 amostras analisadas, o gênero *Penicillium* predominou em 16 deles, seguidos por *Fusarium* e *Aspergillus*, identificados como os mais presentes em 14 e 10 amostras,

respectivamente. Os valores obtidos são inferiores ao limite máximo encontrado por ALMEIDA *et al.* (1995), que obtiveram desenvolvimento de até $3,58 \times 10^6$ colônias de *Fusarium* por grama de milho. Desta forma a maioria das amostras apresentou valores dentro dos limites recomendados pela INTERNACIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (1980), que é na ordem de 10^2 a 10^4 .

A correlação entre a concentração de ergosterol e unidades formadoras de colônias fúngicas nas amostras de milho apresentaram uma correlação de 0,94 ($P < 0,01$) (Fig. 2). Conforme CAHAGNIER *et al.* (1983) esta é uma correlação muito boa sendo também compatível com as concentrações encontradas por estes pesquisadores. Concluíram em seus estudos que a correlação pode variar de acordo com os cereais analisados, sendo de aproximadamente 0,91 para o milho e de 0,99 para o arroz com umidade relativa do ar acima de 80%. MILLER *et al.* (1983) e SCHWABE *et al.* (1992), também encontraram altas correlações entre estas duas medidas da contaminação fúngica. No entanto SCHNÜRER (1991), SCHUH & AWAD-MASALMEH (1992) e SCHNÜRER (1993) alertam que uma significativa correlação entre ergosterol e contagens fúngicas poderá não ser encontrada. Isto poderia ser creditado à mudanças fisiológicas e autólise micelial parcial que podem afetar drasticamente o conteúdo de ergosterol da massa micelial residual. Conforme BÖRJESSON *et al.* (1992), em determinado estágio de crescimento fúngico e a variação das unidades formadoras de colônias fúngicas entre as diferentes espécies a concentração de ergosterol pode não aumentar na mesma proporção, o que não foi verificado no presente experimento.

Das 40 amostras analisadas, 25 (62,5%) apresentaram aflatoxinas, com concentrações variando de 1 (limite de quantificação) até 540 µg/kg (Tabela 1). Os níveis encontrados são relativamente baixos, apesar da porcentagem das amostras contaminadas ser bastante alta. Com relação a presença de aflatoxinas em alimentos destinados ao consumo animal, o Ministério da Agricultura estabeleceu limite máximo de 50 µg/kg (BRASIL, 1988). Das amostras analisadas em nosso experimento, somente 3 (7,5%) apresentaram concentrações das toxinas superiores ao limite máximo tolerado. A correlação ($P < 0,01$) entre a concentração de ergosterol e presença de aflatoxinas nas amostras de milho foi relativamente baixa, ficando em torno de $r = 0,4$, indicando que a quantidade de aflatoxinas presente nas amostras não depende significativamente da concentração de massa fúngica presente.

CONCLUSÕES

A concentração de ergosterol detectada por cromatografia líquida de alta eficiência, em 40 amostras de milho variou de 1,11 até 32,62 mg/kg, apresentando média de 5,5 mg/kg.

A correlação entre concentração de ergosterol e unidades formadoras de colônias fúngicas é alta ($r = 0,94$), indicando boa equivalência entre as técnicas para a avaliação do grau de contaminação fúngica em milho.

A correlação entre presença de aflatoxinas e concentração de ergosterol apresentou-se bastante baixa, apresentando um $r = 0,4\%$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A.P.; ORSI, R.B.; CORRÊA, B.; ALLOZZI, M.; SAWAZAKI, E.; DUARTE, A.P.; SORDI, G.; CASTRO, J.L.; BORTOBELETTO, N. Microbiota fúngica de três híbridos de milho recém-colhidos. In: SEMINÁRIO SOBRE A CULTURA DO MILHO "SAFRINHA", 3., 1995, Assis, SP. *Anais. Assis: Instituto Agrônomo*, 1995. p.123-128.
- BERMINGHAM, S.; M ALBY, L.; COOKE, R.C.A. A critical assessment of the validity of ergosterol as an indicator of fungal biomass. *Mycol. Research.*, v.99, n.4, p.479-484, 1995.
- BÖRJESSON, T.; SÖLLMAN, U.; SCHNÜRER, J. Volatile metabolites produced by six fungal species compared with other indicators of fungal growth on cereal grains. *Appl. Environm. Microbiol.*, v.58, n.8, p.2599-2605, 1992.
- BRASIL - Leis e decretos. Ministério da Agricultura. Portaria n. 7 de 9 de novembro de 1988, Diário Oficial da União, Brasília, de 9 de novembro de 1988, Seção I, p.21.968.
- CAHAGNIER, B.; RICHARD-MOLARD, D.; POISSON, J. Évolution de la teneur en ergostérol des grains au cours de la conservation-une possibilité d'évaluation quantitative et rapide de leur mycoflore. *Sci. Alim.*, v.3, n.2, p.219-244, 1983.
- COULOMBE, R.A. Aflatoxins. In: SHARMA, R.P. & SALUNKHE, D.K. (Eds.), *Mycotoxins and phycotoxins*. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.103-144.
- EVERSHED, R.P.; SPOONER, N.; PRESCOTT, M.C.; GOAD, L.J. Isolation and characterisation of intact sterol ferulates from seeds. *J. Chromatogr.*, v.440, p.23-35, 1988.
- GESSNER, M.O. & SCHIMMITT, A.L. Use of solid-phase extraction to determine ergosterol concentrations in plant tissue colonized by fungi. *Appl. Environm. Microbiol.*, v.62, n.2, p.415-419, 1996.
- GOAD, L.J. The effects of antifungal compounds on growth and sterol metabolism in plants and protozoa. *Biochem. Soc. Trans.*, v.22, p. 269-635, 1994.
- GOURAMA, H. & BULLERMAN, L.B. Relationship between aflatoxin production and mold growth as measured by ergosterol and plate count. *Lebensm. Wiss. - Technol.*, v.28, n.2, p.185-189, 1995.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. *Microbiological ecology of foods*. New York: American Public Health Association, 1984. 914p.
- MARTIN, F.; DELARUELLE, C.; HILBERT, J.L. An improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizas. *Mycol. Research*, v.94, n.8, p.1059-1064, 1990.
- MILLER, J.D.; YOUNG, J.C.; TRENHOLM, H.L. *Fusarium* toxins in field corn. I. Time course of fungal growth and production of deoxynivalenol and other mycotoxins. *Can. J. Bot.*, v.61, p.3080-3087, 1983.
- MISLEVIC, P.B.; BEUCHAT, L.R.; COUSIN, M.A. Yeast and Molds. In *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. In: VANDERZANT, C. & SPLITTOESSER, D.S. (Eds.). New York: American Public Health Association, 1992.

- NAEWBANJ, M.; SEIB, P.A.; BURROUGHS, R. Determination of ergosterol using thin-layer chromatography and ultraviolet spectroscopy. *Cereal Chem.*, v.61, n.5, p.385-388, 1984.
- NELSON, P.E.; TOUSSON, T.A.; MARASAS, W.O.F. *Fusarium species. An illustrated manual for identification*. London: The Pennsylvania State University Press, 1983.
- PEACOCK, G.A & GOOSEY, M.W. Separation of fungal sterols by normal-phase high performance liquid chromatography-application to the evaluation of ergosterol biosynthesis inhibitors. *J. Chromatogr.*, v.469, p.293-303, 1989.
- PITT, J.I. The significance of potentially toxigenic fungi in foods. *Food Technol. Austrália*, v.36, n.5, p.218-219, 1984.
- PIVA, G.; PIETRI, A.; PALLARONI, L. Micotoxin contamination of maize harvested in Northern Italy. In: SIMPÓSIO: FROM QUALITY FEED TO QUALITY FOOD. VENUE: UNIVERSITY OF VETERINARY MEDICINE, 1998, Vienna, Áustria. *Proceedings*. Vienna: Biomin Gesunde Tierernährung International, 1998. p.49.
- RAPER, K.B. & FENNELL, D.I. The genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams & Willkins, 1965.
- REGNÉR, S.; SCHNÜRER, J.; JONSSON, A. Ergosterol content in relation to grain kernel weight. *Cereal Chem.*, v.71, n.1, p.55-58, 1994.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. & SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. *Braz. J. Microbiol.*, v.33, n.1, p.1-11, 2002.
- SAMSON, R.A. & PITT, J.I. *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*. New York: Plenum Press, 1985. (Nato ASI Series, 102)
- SCHNÜRER, J. Comparison of methods for estimating the biomass of three food-borne fungi with different growth patterns. *Appl. Environm. Microbiol.*, v.59, n.2, p.552-555, 1993.
- SCHNÜRER, J. Distribution of fungal biomass among fine bran, coarse bran, and flour from wheat stored at four different moisture levels. *Cereal Chem.*, v.68, n.4, p.434-437, 1991.
- SCHUH, M., & AWAD-MASALMEH, M. Investigations on the incidence of deoxynivalenol, zearalenone, microbial status and ergosterol content in feed stuffs. In: CONGRESS OF THE PIG VETERINARY SOCIETY. 12., 1992, Viena, Áustria. *Anais*. Viena: International Pig Veterinary Society, 1992, p.666.
- SCHWABE, M.; KAMPHUIS, H.; TRÜMMER, U. Comparison of the latex agglutination test and the ergosterol assay for the detection of moulds in foods and feedstuffs. *Food Agric. Immunol.*, v.4, p.19-25, 1992.
- SCHWADORF, K. & MÜLLER, H.M. Determination of ergosterol in cereals, mixed feed components, and mixed feeds by liquid chromatography. *J. Assoc. Anal. Chem.*, v.72, n.3, p.457-462, 1989.
- SEITZ, L. M.; MOHR, H. E.; BURROUGHS, R. Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chem.*, v.54, n.6, p.1207-1217, 1977.
- SEITZ, L.M. & POMERANZ, Y. Ergosterol, Ergosta-4, 6, 8 (14), 22-tetraen-3-one, ERG Peroxide, and chitin in ergoty barley, rye, and other grasses. *J. Agric. Food Chem.*, v.31, n.5, p. 1036-1038, 1983.
- SEITZ, L.M.; SAUER, D.B.; MOHR, H.E. Storage of high-moisture corn: fungal growth and dry matter loss. *Cereal Chem.*, v.59, n.2, p.100-105, 1982.
- SOARES, L.M.V. & RODRIGUES-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin Thin-layer Chromatographic method. *J. Assoc. Anal. Chem.*, v.72, n.1, p.22-26, 1989.
- SWANSON, K.M.J.; BUSTA, F.F.; PETERSON, E.H.; JOHNSON, M.G. Colony count methods. In: VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D.F. (Eds). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington: American Public Health Association, 1992 p.75-96.
- WEST, A.W.; GRANT, W.D.; SPARLING, G.P. Use of ergosterol, diaminopimelic acid and glucosamine contents of soils to monitor changes in microbial populations. *Soil Biol. Biochem.*, v.19, n.5, p.607-612, 1987.
- YOUNG, J.C. Microwave-assisted extraction of the fungal metabolite ergosterol and total fatty acids. *J. Agric. Food Chem.*, v.43, n.11, p.2904-2910, 1995.

Recebido em 10/6/03

Aceito em 10/10/03