

JULIANA VIVAN

PRODUÇÃO DA MICOTOXINA CITRININA POR *Penicillium* spp.

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2002

JULIANA VIVAN

PRODUÇÃO DA MICOTOXINA CITRININA POR *Penicillium* spp.

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de "Magister Scientiae".

APROVADA: 28 de fevereiro de 2002

Dr^a Virgínia Maria Chaves-Alves
(Conselheira)

Prof^a Maria Cristina Dantas Vanetti

Prof^o Everaldo Gonçalves de Barros

Prof^a Maria Cristina Baracat Pereira

Prof. Jorge Luiz Cavalcante Coelho
(Orientador)

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Micotoxinas	4
2.2.1. Ocorrência da Citrinina.....	7
2.2.2. Intoxicação por Citrinina.....	7
2.3. Enzimas Fúngica de Interesse Comercial	10
3. OBJETIVOS	12
3.1. Objetivo Geral	12
3.2. Objetivos específicos	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Produção de Citrinina por Diferentes Linhagens de <i>Penicillium</i>	13
4.1.1. Microrganismos	13
4.1.2. Manutenção da Cultura e Produção do Inóculo.....	13
4.1.3. Obtenção e Padronização da Suspensão de Esporos	14
4.1.4. Condições de Cultivo	14
4.1.5. Extração de Citrinina	15
4.1.6. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	15

4.1.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em Fase Reversa	16
4.2. Curva de Produção de Citrinina	17
4.2.1 Microrganismos	17
4.3. Produção de Citrinina, Poligalacturonase e Xilanase.....	17
4.3.1. Microrganismos	17
4.3.2. Manutenção da Cultura e Produção do Inóculo.....	17
4.3.3. Obtenção e Padronização da Suspensão de Esporos	18
4.3.4. Condições de Cultivo	18
4.3.5. Poligalacturonase.....	19
4.3.6. Xilanase	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5.1. Produção de Citrinina por Diferentes Linhagens de <i>Penicillium</i> ssp	21
5.2. Curva de Produção de Citrinina pelos Fungos <i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i> GF, <i>P. expansum</i> VIC e <i>P. roqueforti</i>	25
5.3. Produção de Poligalacturonases e Xilanases, Simultaneamente à Produção de Citrinina, pelos Fungos <i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i> GF, <i>P. expansum</i> VIC e <i>P. griseoroseum</i>	31
CONCLUSÕES	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
APÊNDICE.....	41

RESUMO

VIVAN, Juliana, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2002. **Produção da Micotoxina Citrinina por *Penicillium* spp.** Professor Orientador: Jorge Luiz Cavalcante Coelho. Conselheiros: Prof^a Flávia Maria Lopes Passos e Dr^a Virgínia Maria Chaves-Alves.

O fungo *Penicillium expansum*, produtor de enzimas pectinolíticas e xilanolíticas, as quais possuem aplicação na indústria têxtil, na indústria de bebidas, principalmente na clarificação de sucos e vinhos, e na indústria de alimentos, está incluído entre as espécies toxigênicas capazes de produzir micotoxinas, dentre elas a citrinina. A presença dessa micotoxina inviabiliza a utilização de *P. expansum* na indústria de alimentos. Com o propósito de analisar a possibilidade desse fungo produzir simultaneamente as enzimas de interesse e a citrinina, foram verificadas seis linhagens de *Penicillium*, que vêm sendo utilizadas em estudos de produção de pectinases e xilanasas na Universidade Federal de Viçosa. Dois métodos de análise, cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica-gel e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa, foram utilizados com o único propósito de detectar citrinina. Dentre as seis linhagens, *P. citrinum* (principal produtor de citrinina), *P. expansum* GF (linhagem toxigênica isolada de maçãs deterioradas), *P. expansum* VIC, *P. griseoroseum*, *P. roqueforti* e *P. camemberti*, apenas *P. citrinum* e *P. expansum* GF produziram citrinina nos três meios de cultivo

testados (Timonin, YES e Aveia). *P. roqueforti* produziu citrinina apenas em caldo Timonin e os demais não a produziram em nenhum dos meios testados. Apenas o fungo *P. citrinum* foi capaz de produzir citrinina sob condições de incubação estática e em agitação rotacional a 150 rpm, em longos períodos de tempo (40 dias). O fungo *P. expansum* GF produziu a citrinina somente em condições estáticas, os demais fungos testados, *P. expansum* VIC, e *P. roqueforti*, também cultivados em ambas as condições, foram incapazes de produzir citrinina. Deste modo, pode-se concluir que os fungos *P. expansum* VIC e *P. griseoroseum* não representam perigo quanto à produção de citrinina, quando utilizados na indústria de alimentos, pois não têm capacidade de produzir a micotoxina nas mesmas condições em que produzem as enzimas de interesse, poligalacturonase e xilanase.

ABSTRACT

VIVAN, Juliana, M.S. Universidade Federal de Viçosa, February 2002.
Production of the Mycotoxin Citrinin by *Penicillium* spp. Adviser: Jorge Luiz Cavalcante Coelho. Committee members: Flávia Maria Lopes Passos and Virginia Maria Chaves-Alves.

The fungus *Penicillium expansum*, which produces pectinolytic and xylanolytic enzymes with application in the textile, food and beverage industries, is one of the toxigenic species capable of producing mycotoxins, one of which is citrinin. The presence of this mycotoxin would preclude the use of *P. expansum* in the food industry. Six lineages of *Penicillium* that are being used in studies of pectinase and xylanase production at the Universidade Federal de Viçosa were therefore evaluated for possible simultaneous production of the enzymes of interest and citrinin. Both thin layer (TLC) and reverse phase liquid (HPLC) chromatographies were used to detect citrinin. Of the six lineages evaluated, *P. citrinum* (principal citrinin producer), *P. expansum* GF (a toxigenic lineage isolated from rotten apples), *P. expansum* VIC, *P. camemberti*, and *P. roqueforti*, only *P. citrinum* and *P. expansum* GF produced citrinin in the three culture media tested (Timonin, YES and oatmeal). *P. roqueforti* produced citrinin only in Timonin broth while the other lineages did not produce this mycotoxin in any of the media used. Only *P. citrinum* was able to produce citrinin when cultivated

both with (150 rpm) and without agitation for long periods (40 days). The fungus *P. expansum* GF only produced citrinin under static growth conditions. The other fungi evaluated (*P. expansum* VIC, and *P. roqueforti*) were also cultivated with and without agitation but did not produce citrinin under either growth condition. It can therefore be concluded that *P. expansum* VIC and *P. griseoroseum* represent no threat to the food industry in terms of citrinin production since these fungi are unable to produce this mycotoxin under the conditions used to produce the enzymes of interest polygalacturonase and xylanase.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de fungos na produção de alimentos, como pães, bebidas alcoólicas e alimentos fermentados provenientes da cozinha oriental, é conhecida desde tempos remotos, e esse conhecimento vem acompanhando o desenvolvimento científico e tecnológico do homem. Atualmente, muitos desses fungos possuem ampla aplicação na produção de queijos, carnes, enzimas, ácidos orgânicos, vitaminas, antibióticos e esteróides. No entanto, deve-se considerar também o importante papel dos fungos no que diz respeito às doenças de plantas, animais e humanos, até mesmo na perda de colheita e de alimentos, pelo fato de produzirem metabólitos secundários, conhecidos como micotoxinas.

Micotoxinas produzidas por alguns fungos filamentosos podem contaminar grande variedade de alimentos e ração animal. Devido aos seus vários efeitos tóxicos e à sua alta resistência a tratamentos térmicos, a presença de micotoxinas em alimentos é potencialmente perigosa para a saúde humana e animal, causando significativo impacto na economia, pelas perdas geradas na criação de animais e na produção de alimentos.

Muitos são os fatores biológicos e ambientais que interferem na produção de micotoxinas na cadeia alimentar e esses, quase sempre, agem durante o processamento e o armazenamento dos alimentos.

O interesse científico pelas micotoxinas teve início em 1960, na Inglaterra, quando, em poucas semanas, cem mil perus faleceram após a ingestão de ração à base de amendoim contaminado com micotoxina (aflatoxina) produzida por *Aspergillus flavus*.

A citrinina produzida por várias espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Monascus* foi descoberta em 1931, sendo inicialmente estudada com o propósito de ser empregada como antibiótico. Entretanto, tal propósito ficou frustrado após a demonstração de sua atividade nefrotóxica em 1955 (HETHERINGTON e RAISTRICK, 1931; DAMODARAN et al., 1973; BETINA, 1984). Essa descoberta gerou crescente preocupação em torno de suas propriedades, uma vez que os fungos produtores dessa micotoxina são contaminantes naturais de frutas e grãos, com potencial toxicidade para consumidores de tais produtos. De fato, *Penicillium expansum*, principal produtor da micotoxina patulina e outras, como a citrinina, é constantemente isolado de diversos tipos de alimentos, inclusive do tecido de frutas sadias, principalmente maçãs. No entanto, a produção dessas duas micotoxinas ocorre normalmente apenas nos casos em que a superfície da fruta tenha sido danificada. Portanto, a presença de micotoxinas como citrinina e patulina em suco de maçã comercial pode ser usada como indicador de qualidade do produto, uma vez que, removendo as porções lesadas da fruta "in natura", ocorre diminuição superior a 90% de toda a micotoxina existente (MACHINSKI e MÍDIO, 1995).

Os fungos são os microrganismos mais utilizados industrialmente para a produção de enzimas, principalmente por secretarem maiores quantidades destas, quando comparados a bactérias e leveduras.

O fungo *P. expansum*, produtor de patulina e citrinina, tem sido testado quanto à produção de algumas enzimas usadas industrialmente, como as poligalacturonases e as xilanases.

A enzima xilanase é utilizada em processos de biopolpação nas indústrias de papel e celulose e no processamento de fibras vegetais como linho, juta e rami. Na indústria têxtil, além das xilanases, enzimas pectinolíticas como as poligalacturonases são usadas no processo de desengomagem, que resulta na liberação das fibras de uso em tecelagem.

O uso associado de pectinases, xilanases e celulases tem aplicação na indústria de alimentos, na remoção de sólidos em suspensão durante o processamento de sucos de frutas e liquefação de vegetais, no preparo de dextranas como espessante de alimentos, na indústria vinícola, entre outros. A maceração enzimática de tecidos de frutas e de vegetais é de grande importância na clarificação de sucos e vinhos, no processamento de conservas e hortaliças, na extração de óleo de oliva, na produção de alimentos para bebês e na fermentação do café, cacau e fumo.

Tendo em vista o amplo potencial dos fungos filamentosos como produtores de enzimas de interesse biotecnológico, o presente trabalho teve como objetivo determinar se as linhagens de *P. expansum* e *P. griseoroseum*, ambas isoladas em Viçosa-MG e produtoras de enzimas pectinolíticas e xilanolíticas, são também capazes de produzir a micotoxina citrinina nas mesmas condições em que produzem tais enzimas. Para isso, utilizou-se como controle o fungo *P. citrinum*, principal produtor de citrinina. Também foram analisadas as linhagens *P. expansum* GF (espécie toxigênica) e duas espécies, *P. roqueforti* e *P. camemberti*, amplamente utilizadas na indústria para a produção de alimentos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Micotoxinas

Micotoxinas são metabólitos secundários resultantes do metabolismo normal de alguns fungos filamentosos que proliferam em alimentos e rações animais. Como contaminantes tóxicos, despertam grandes preocupações desde 1960 e são reconhecidos como potencial ameaça para a saúde humana e animal, além de provocarem perdas econômicas devido à deterioração dos alimentos (BETINA, 1984).

Alguns fungos filamentosos são capazes de produzir micotoxinas e aqueles que as produzem, em geral, só sintetizam tipos particulares. Os fungos toxigênicos somente produzem micotoxinas em certas condições de pH, temperatura, umidade e injúria mecânica no produto, dependendo do tipo de substrato, somados aos fatores biológicos, como a susceptibilidade dos vegetais à infecção fúngica. Infelizmente, muitos desses fatores aparecem durante a colheita, o processamento, a conservação e o armazenamento dos alimentos (PRIETA et al., 1994). As condições climáticas dos países tropicais (temperatura e umidade elevadas) favorecem a proliferação de fungos nos produtos agrícolas, principalmente grãos, determinando altos teores de micotoxinas nos alimentos provenientes dessas regiões. Isso pode acarretar sérios reflexos para a economia dos países que, a exemplo do Brasil, mantêm

o equilíbrio de sua balança comercial baseado na exportação de grandes quantidades de grãos (CAZENAVE e MIDIO, 1998). Além disso, a comercialização global, oriunda do avanço tecnológico, faz com que os frutos e grãos sejam armazenados nos períodos das entressafras em condições de temperatura que permitem o desenvolvimento de fungos psicrótrópicos, representados por *Penicillium* spp., dentre outros (ROSS et al., 1998).

Os fungos são responsáveis por significantes perdas econômicas de alimentos em todo o mundo, podendo crescer e produzir micotoxinas durante o cultivo e após a colheita nas folhas e nos talos, em grãos e sementes e até mesmo em produtos como carne e leite (BETINA, 1984). Frutas contaminadas por esses microrganismos exibem áreas de consistência mole ("podridão"), manchas marrons úmidas, que aumentam rapidamente em temperaturas moderadas. Em condições úmidas, o fungo pode esporular dando aspecto pulverulento à superfície da lesão. Este é um modo bastante comum de deterioração em maçãs armazenadas, causada geralmente por *P. expansum* (BETINA, 1984; VIÑAS, 1993; RYU e HOLT, 1993).

A produção de aflatoxina por cepas do fungo *Aspergillus flavus* tem sido freqüentemente observada em muitos tipos de grãos como nozes moídas, trigo, arroz, cevada, milho, ervilhas secas, aveia, além de sementes de algodão, coco e batata-doce. Em muito desses produtos, além da aflatoxina, outras micotoxinas também foram encontradas, dentre elas a citrinina (BETINA, 1984).

2.2. Citrinina

A citrinina, um metabólito benzopirano tóxico (3R-trans)-4,6-Dihidro-8-hidroxi-3,4,5-trimetil-6-oxo-3H-2-benzopirano-7-ácido carboxílico (RIBEIRO et al., 1997) (Figura 1), possui fórmula molecular bruta $C_{13}H_{14}O_5$ e peso molecular de 250,24. Também conhecida como antimicina, foi isolada como antibiótico em 1931 e, posteriormente, em 1955, classificada como micotoxina devido a sua atividade hepatonefrotóxica em animais e humanos (HETHERINGTON e RAISTRICK, 1931; DAMODARAN et al., 1973; PHILLIPS et al., 1980; ROSA et al., 1985; RIBEIRO et al., 1997).

A citrinina é sólida e amarela, quando cristalizada em etanol absoluto. Apresenta ponto de fusão em torno de 175°C. É praticamente insolúvel em água, solúvel em etanol aquecido, benzeno, clorofórmio, acetato de etila e pouco solúvel em éter de petróleo e etanol. Nas amostras de solo apresenta coloração amarelo-limão em pH 4,5 e vermelho-vivo em pH 9,9 (BETINA, 1984).

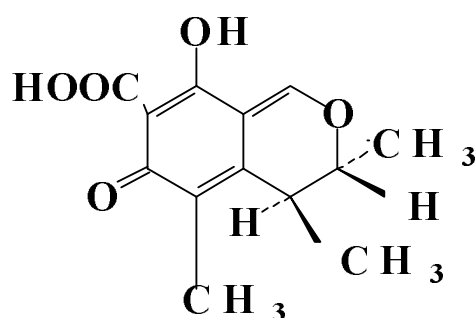


Figura 1. Estrutura química da citrinina.

Fonte: RIBEIRO et al. (1997).

A citrinina é um metabólito secundário primeiramente isolado de *Penicillium citrinum* Thom (HETHERINGTON e RAISTRICK, 1931); de espécies de *Aspergillus* (DERUIER et al., 1992; HAJJAJ et al., 1999) e *Monascus* (BLANC et al., 1995; HAJJAJ et al., 1999).

P. citrinum é considerado o principal e mais eficiente produtor de citrinina, mas fungos toxigênicos, como *P. expansum*, *P. viridicatum*, *P. roqueforti*, *P. verrucosum*, *P. steckii*, *P. corylophilum*, *Aspergillus carneus*, *A. terreus*, *A. candidus*, *A. niveus*, *Monascus ruber* e *M. purpureus*, podem também produzi-la em grandes quantidades (BETINA, 1984; FRISVAD e SAMSON, 1991; VIÑAS et al., 1993; BLANC et al., 1995; COMERIO et al., 1998; MALMSTROM et al., 2000).

2.2.1. Ocorrência da Citrinina

A produção da micotoxina citrinina é amplamente distribuída, pois é encontrada como contaminante natural em vários tipos de grãos como o milho (JACKSON, et al., 1978; NELSON et al., 1979, 1985; COMERIO et al., 1998), o trigo, o centeio, a aveia, a cevada (SCOTT et al., 1972; COMERIO et al., 1998) e o amendoim (POHLAND e WOOD, 1987). Trabalhos realizados em isolados de *P. expansum* presentes em maçãs e sucos de maçãs processados comercialmente relatam a ocorrência de citrinina e outros metabólitos tóxicos nas partes deterioradas da fruta (VIÑAS et al., 1993; MIDIO e MARTINS, 2000). Na Argentina, a ocorrência natural de citrinina foi constatada em linhagem de *P. citrinum*, freqüentemente isolado de milho, trigo, soja, arroz e amaranto (TONON et al., 1996; COMERIO et al., 1998). No Japão, a ocorrência dessa micotoxina em mofos de arroz amarelado recebeu a denominação de “síndrome do arroz amarelo” (SAITO et al., 1971; COMERIO et al., 1998). No Brasil, foram encontrados muitos isolados de cereais associados a essa micotoxina, causando doenças em animais como porcos e aves, porém nenhuma doença diagnosticada em humanos foi relatada (ROSA et al., 1985; COMERIO et al., 1998). Isso se deve ao fato de a contaminação humana ocorrer, provavelmente, devido ao consumo de citrinina em baixas concentrações, cujo efeito cumulativo somente é expresso após consumo por longo período de tempo (MIDIO e MARTINS, 2000).

2.2.2. Intoxicação por Citrinina

Devido à grande ocorrência em vários tipos de alimentos, a citrinina, reconhecida como uma micotoxina hepatonefrotóxica, tomou-se potencialmente importante, em razão de poder ser ingerida por animais e humanos, causando graves doenças (JACKSON e CIEGLER, 1978; BETINA, 1984; ROSA et al., 1995).

Os sintomas de intoxicação por citrinina em algumas espécies de animais, de idade entre 8 a 12 semanas, foram: tremores musculares, dificuldade de locomoção, respiração ofegante e sialorréia. Os animais

mostraram-se apáticos e tristes, alguns com constipação, outros com diarreia. Em alguns casos, houve ocorrência de óbito (ROSA et al., 1985).

Segundo AMES et al. (1976), a presença de citrinina produzida por *P. citrinum* em ração de aves, ocasionou aumento no consumo de água por esses animais, acompanhado por diarreia. Segundo esses autores, de acordo com a dosagem de citrinina ingerida, os animais desenvolviam lesões agudas ou crônicas. KROGH et al. (1973; 1978), estudando distúrbios ocasionados por intoxicação de citrinina em porcos, verificaram que estas lesões eram de caráter hemorrágico, com alteração do quadro hematológico, necrose hepática e renal e fibrose intersticial renal.

Demonstrando seu potencial tóxico, estudos evidenciaram que esse metabólito secundário possui ação em animais domésticos, como porcos e cachorros, sendo uma nefrotoxina para os monogástricos (SWEENEY e DOBSON, 1998), a qual prejudica os túbulos contornados distais e proximais dos rins, tanto nos segmentos retos como nos contorcidos (PHILLIPS et al., 1980; ROSA et al., 1985). Segundo Berndt (1990), citado por COMERIO et al. (1998), a citrinina foi prejudicial ao funcionamento renal em todas as espécies em que foi testada.

Em experimentos realizados por CIEGLER et al. (1977), em embriões de galinha, a citrinina demonstrou atividade teratogênica, semelhante à patulina, como malformações nas extremidades (patas), bicos, exoencefalia e exoftalmia e, ocasionalmente, embriões, apresentando a cabeça e o pescoço virados para a esquerda ao invés da direita, como normalmente ocorre. A dosagem letal (DL_{50}) de citrinina em embriões de galinha, com quatro dias, foi 80,5 μg por ovo, com limite superior de 131 μg e um limite inferior de 54,3 μg . Os valores de DL_{50} oral para ratos e coelhos foram 35 e 19 mg kg^{-1} , respectivamente. Segundo ROSA et al. (1985), em suínos, a concentração de 1 mg kg^{-1} de citrinina em cevada contaminada é tóxica. Em regiões de ocorrência natural de nefropatia micotóxica, os alimentos apresentavam um índice dessa micotoxina na faixa de 0,16 a 2 mg kg^{-1} . No entanto, até o momento, não foram estabelecidos índices de toxicidade para esta micotoxina, assim como Limite Máximo Permitido, nem para alimentos e nem para rações animais (MIDIO e MARTINS, 2000).

VIÑAS et al. (1993) constataram a toxicidade de citrinina, sendo esta capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas, como *Bacillus cereus* e *B. subtilis*. Também possui propriedade antifúngica, antiprotozoária, efeitos na diferenciação e no dimorfismo micelial. O efeito em humanos ainda é pouco conhecido (BETINA, 1984; SWEENEY e DOBSON, 1998).

GUPTA et al. (1979) observaram que a citrinina, em testes com ratos, causou significantes mudanças nos parâmetros hematológicos, depressão do sistema nervoso central, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade.

Posteriormente, GUPTA et al. (1986), estudando os efeitos de várias doses (15, 25 e 35 mg kg⁻¹) de citrinina na atividade de alguns hormônios, enzimas e substratos relacionados com a via glicolítica em ratos, verificaram que no sangue, no fígado, nos rins e no cérebro de ratos tratados com citrinina, ocorriam decréscimo significativo nas atividades de adenosina-trifosfatase, hexoquinase, lactato desidrogenase, decréscimo nos níveis de ácido láctico e ácido pirúvico e aumento no nível de glicose no sangue, nos rins e no cérebro, além de decréscimo de glicogênio no fígado. Observaram também aumento do nível de cortisol, triiodotironina e tiroxina no soro e diminuição do nível de insulina.

Muitos estudos sobre a carcinogenicidade da citrinina têm sido realizados em camundongos e ratos. Resultados negativos foram sempre considerados devido ao pequeno número de animais testados ou à pouca duração do experimento. Em um estudo em que citrinina foi incorporada na ração de ratos, durante 80 dias, na concentração de 1 g kg⁻¹, um grande número de tumores foi observado. Todavia, eram benignos e foram considerados apenas como adenomas celulares. Portanto, não existem evidências de carcinogenicidade desse composto (MIDIO e MARTINS, 2000).

Na célula, a ação da citrinina é resultante do acúmulo na mitocôndria e interferência com o sistema de transporte de elétrons (RIBEIRO et al., 1997). Esse processo, que depende de pH, não afeta a integridade da membrana celular, porém provoca uma inibição na síntese de DNA e, subseqüentemente, de RNA e proteína. Existem controvérsias sobre a ação mutagênica e genotoxicidade de citrinina (SABATER-VILAR et al., 1999). Trabalhos

realizados por esses autores indicaram que a citrinina não é mutagênica, porém a sua biotransformação pode provocar efeitos mutagênicos.

2.3. Enzimas Fúngicas de Interesse Comercial

Fungos pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Rhizopus* apresentam alta atividade xilanólítica e pectinolítica. Esses fungos, em geral, são saprófitas, capazes de secretar várias enzimas extracelulares que degradam diversos polímeros (FAWOLE e ODUNFA, 1992). Os fungos filamentosos, que são produtores de xilanases e pectinases, são estudados com particular interesse, uma vez que eles secretam as enzimas no meio extracelular e a concentração de enzima secretada é muito maior do que aquelas de leveduras e bactérias, que geralmente não as secretam (GOODENOUGH e GOODENOUGH, 1993). Além disso, a atividade da xilanase fúngica é maior do que nas bactérias (KULKARNI et al., 1999).

O uso associado de xilanases, pectinases e celulases ocorre na indústria de alimentos, para a remoção de sólidos em suspensão, durante o processamento de suco de frutas e liquefação de vegetais (VAN DER BROECK et al., 1990; TENKANEN et al., 1992), no preparo de dextranas como espessante de alimentos, na indústria vinícola (TAN et al., 1987; WONG et al., 1988; KHASIN et al., 1993) e no tratamento de resíduos e efluentes (DE RONZO, 1977), entre outros.

De acordo com VAN DER BROECK et al. (1990), as xilanases melhoram algumas características do pão, como firmeza da casca e do miolo e textura. Na Europa, o uso tanto de brometo de potássio na massa do pão quanto de dióxido de enxofre na massa do biscoito tem sido vetado por reduzir a elasticidade do glúten. Em substituição a esses compostos estão as hemicelulases, incluindo as xilanases (MUTSAERS, 1991).

Outras aplicações das xilanases incluem hidrólise de xilana a carboidratos fermentáveis por bioconversão e remoção de hemicelulose (GILBERT et al., 1992) e obtenção de xilobiose, xilotriose e outros xilooligossacarídeos para serem usados como padrões para cromatografia (WONG et al., 1988).

As pectinases são comercialmente importantes em inúmeros processos industriais, incluindo extração, clarificação e despectinização de sucos de frutas, extração de óleos vegetais e maceração de frutas e vegetais, resultando em alimentos homogêneos (FOGARTY et al., 1990).

A maceração enzimática de tecidos de frutas e vegetais é de grande importância na clarificação de sucos e vinhos, no processamento de conservas e hortaliças, na extração de óleo de oliva, na produção de alimentos para bebês e na fermentação do café, cacau e fumo (CHESSON, 1980; WHITAKER, 1984; Mc LELLAN et al., 1985; MANACHINI et al., 1988; ALAÑA et al., 1989, FAWOLE e ODUNFA, 1992; BEHERE et al., 1993).

Portanto, fungos utilizados na produção de enzimas de interesse para a indústria de alimentos não devem ser produtores de micotoxinas ou outros metabólitos tóxicos.

Em trabalho realizado para averiguar a produção de patulina por *P. expansum* VIC, linhagem que vem sendo testada como produtora de enzimas despolimerizantes da parede celular de vegetais, FERREIRA (2000) verificou que não há produção daquela micotoxina, quando da produção de tais enzimas. Tendo em vista a necessidade de qualidade em alimentos, constantes esforços devem ser realizados no sentido de se obter um controle eficiente a fim de evitar a contaminação por citrinina em sucos de frutas processados, alimentos enlatados, queijos e derivados, ração para animais e grande quantidade de grãos. Para tal, teve-se como objetivo determinar se as linhagens de *P. expansum* VIC e *P. griseoroseum*, ambas isoladas a partir de plantas vegetais e em estudos de produção de enzimas pectinolíticas e xilanolíticas, são também capazes de produzir citrinina simultaneamente à produção de tais enzimas. Para isso, utilizaram-se os fungos *P. citrinum*, como padrão e principal produtor de citrinina; *P. expansum*, denominado GF, linhagem selvagem isolada a partir de maçãs deterioradas, no Laboratório de Fisiologia de Microrganismo – Bioagro; e os fungos *P. camemberti* e *P. roqueforti*, que possuem ampla utilização na indústria de alimentos para a fabricação de queijos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Determinar se diferentes espécies do gênero *Penicillium*, produtoras de enzimas pectinolíticas e xilanolíticas, são capazes de produzir citrinina nas mesmas condições e nos meios em que produzem tais enzimas de uso na indústria de alimentos.

3.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar a produção de citrinina por linhagens de *Penicillium* em diferentes meios de cultura.
2. Avaliar a produção de xilanases e pectinases nos meios de cultura simultaneamente à produção de citrinina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa.

4.1. Produção de Citrinina por Diferentes Linhagens de *Penicillium*

4.1.1. Microrganismos

Os fungos utilizados para o experimento foram seis diferentes linhagens de *Penicillium*: *P. citrinum* CCT 3281, adquirida no Instituto André Tosello - Campinas/SP (utilizado como padrão); *P. expansum* GF, linhagem toxigênica isolada a partir de maçã deteriorada em temperatura ambiente, no Departamento de Microbiologia/UFV-MG e produtora da micotoxina patulina; *P. expansum* VIC e *P. griseoroseum* CCT 6421, linhagens isoladas no Departamento de Fitopatologia/UFV-MG, a partir de sementes de plantas florestais; *P. camemberti* CCT 4461 e *P. roqueforti* CCT 0062, ambas adquiridas no Instituto André Tosello.

4.1.2. Manutenção da Cultura e Produção do Inóculo

Os microrganismos foram estocados em geladeira, em temperaturas de 5 a 10°C, em meio ágar-aveia inclinado, composto de 40 g L⁻¹ de farinha de aveia e 15 g L⁻¹ de ágar-ágar.

Para a produção dos inóculos, as culturas estocadas foram repicadas em tubos de ensaio, contendo o mesmo meio, e incubadas a 25°C por nove dias.

4.1.3. Obtenção e Padronização da Suspensão de Esporos

As suspensões de esporos foram obtidas por meio de raspagem superficial das culturas, mantidas em meio ágar-aveia, com alça de platina. Os esporos foram transferidos para solução estéril de Tween 80 a 0,5% (v/v). As suspensões foram homogeneizadas em agitador de tubos tipo vortex e diluídas 100 vezes, para contagem em câmara de Neubauer. A concentração de esporos nos meios de cultura foi padronizada para cerca de 10⁶ esporos mL⁻¹.

4.1.4. Condições de Cultivo

As suspensões de esporos foram inoculadas em frascos erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de um dos três diferentes meios, descritos na literatura como indutores de citrinina:

I - Meio Timonin (modificado por RODIG et al., 1966) com a seguinte composição: 80 g de D-glicose; 3,0 g de NaNO₃; 1,0 g de KH₂PO₄; 0,5 g de KCl; 0,05 g MgSO₄.7H₂O; 0,005 g de Fe₂(SO₄)₃.7H₂O; 0,005 g de ZnSO₄ em 1000 mL de água destilada, pH 6,0.

II - Caldo de extrato de levedura (YES), preparado de acordo com DAVIS et al. (1975), contendo 20 g de extrato de levedura e 50 g de sacarose em 1000 mL de água destilada, pH 6,0.

III - Meio aveia semi-sólido (JACKSON et al., 1978), contendo 1 kg de aveia em 333 mL de água destilada, pH 6,0.

Os meios de cultura foram autoclavados a 121°C, por 20 minutos, e as culturas foram incubadas a 25°C sem agitação, no escuro, por 21 dias. Esse experimento foi feito em duplicata, com uma repetição.

Após 21 dias, 10 mL de extrato de cada cultura foram preparados e analisados em cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica-gel e em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa, para a detecção de citrinina.

4.1.5. Extração de Citrinina

A citrinina foi extraída dos meios de cultura de acordo com o descrito por VIÑAS et al. (1993). Após os períodos de crescimento, os meios de cultura foram filtrados em peneira de 400 malhas por polegada quadrada (poros de 37 µm). De cada meio de cultura, 10 mL foram coletados e extraídos por duas vezes em 10 mL de clorofórmio. As fases orgânicas foram combinadas, desidratadas com sulfato de sódio (Na₂SO₄) e evaporadas a vácuo por meio de Rotavapor, a 40°C. O extrato foi, então, ressuspendido em 2 mL de clorofórmio e usado para quantificar a micotoxina por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica-gel e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa.

4.1.6. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A solução-padrão estoque de citrinina foi preparada dissolvendo-se 5 mg de citrinina cristalina pura (Sigma) em 10 mL de clorofórmio. Essa solução foi estocada em frasco de vidro escuro, a 4°C, para evitar sua degradação. Volumes de 10 µL (contendo 5 µg mL⁻¹) da solução-padrão de citrinina e 100 µL de cada extrato foram aplicados em placas de vidro CCD Sílica-gel G60, 5 x 20 cm, com espessura da camada de 0,25 mm (Sigma-Aldrich Z12, 269-6). O cromatograma foi desenvolvido no sistema de solvente: clorofórmio:metanol:água (65:25:4) (HAJJAJ et al., 1999).

Quando observada sob luz UV, em comprimento de onda curto (254 nm), a citrinina apresenta coloração púrpura e, em comprimento de onda longo (366 nm), amarelo fluorescente (BETINA, 1984).

4.1.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em Fase Reversa

Para detecção de citrinina nas amostras, 20 μL do extrato obtido na extração foram injetados no aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa, paralelamente às soluções de citrinina padrão estoque, preparadas nas diferentes concentrações (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em clorofórmio). A curva-padrão foi determinada através dos valores obtidos da área dos picos de concentração dessas alíquotas (Figura 2). A detecção da citrinina nas amostras foi feita por meio de comparação do tempo de retenção dos padrões.

A análise das amostras foi realizada de acordo com BETINA (1984), utilizando-se coluna Nucleosil C_{18} Shimadpack (4,6 mm de diâmetro interno X 25 cm) de fase reversa. O solvente utilizado para a fase móvel foi 0,30 mol mL^{-1} de ácido fosfórico, acetonitrila e 2-propanol (45:40:15 v/v/v) com fluxo de 0,95 mL min^{-1} , com eluição isocrática. O equipamento utilizado para as análises quantitativas foi o Shimatzu 10 Ai, com sistema binário de bombas e injetor automático com detector UV 340 nm.

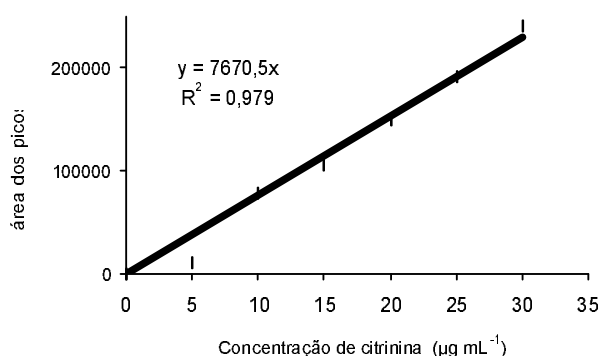


Figura 2. Curva-padrão de citrinina -SIGMA.

4.2. Curva de Produção de Citrinina

4.2.1 Microrganismos

Os fungos utilizados para o experimento foram *P. citrinum* CCT 3281, *P. expansum* GF, (controles positivos), *P. expansum* VIC e *P. roqueforti* CCT 0062 (controles negativos).

Todos os fungos foram inoculados em frascos de 125 mL, contendo 25 mL de meio de extrato de levedura.

Os frascos foram incubados a 25°C no escuro, sem agitação e com agitação rotacional a 150 rpm durante 40 dias. As culturas foram então analisadas em duplicata, quanto à presença de citrinina. Para isso, 5,0 mL dos extratos foram retirados no 9°, 12°, 15°, 18°, 21°, 24° e 40° dia de crescimento para as análises cromatográficas.

Os procedimentos de extração realizados foram os mesmos utilizados no primeiro experimento de determinação da produção de citrinina, item 3.1, assim como as análises em cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica-gel e em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa.

4.3. Produção de Citrinina, Poligalacturonase e Xilanase

4.3.1. Microrganismos

Os fungos utilizados para a dosagem enzimática de xilanase e poligalacturonase, juntamente à produção de citrinina, foram o *P. citrinum* CCT 3281, *P. expansum* GF, *P. expansum* VIC e *P. griseoroseum* CCT 6421.

4.3.2. Manutenção da Cultura e Produção do Inóculo

Os microrganismos foram armazenados e os inóculos foram produzidos conforme descrito no item 4.1.2.

4.3.3. Obtenção e Padronização da Suspensão de Esporos

As suspensões de esporos foram preparadas e utilizadas conforme descrito no item 4.1.3.

4.3.4. Condições de Cultivo

As suspensões de esporos foram inoculadas em frascos erlenmeyer de 250 mL, contendo 25 mL de dois diferentes meios, descritos na literatura como indutores da micotoxina citrinina (meio I) e das enzimas (meio II).

Meio I. Caldo de extrato de levedura, conforme descrito no item 4.1.4;

Meio II. Farelo de Trigo, contendo: 2,0 g de KH_2PO_4 ; 0,62 g de K_2HPO_4 ; 1,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1,0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, acrescidos de extrato de levedura (0,06%), e farelo de trigo (0,3%) em 1.000 mL de H_2O destilada, pH 6,0.

Os meios de cultura foram previamente esterilizados em autoclave a 121°C, por 20 minutos.

As soluções de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10%), extrato de levedura (0,06%), as fontes de carbono e os sais KH_2PO_4 ; K_2HPO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foram autoclavadas separadamente.

Os frascos contendo os fungos foram incubados em agitador rotacional a 150 rpm, a 25°C, durante 120 horas.

Após o cultivo dos fungos, a massa micelial produzida foi separada do meio de cultura através de filtração, utilizando-se peneira de 400 malhas por polegada quadrada (poro de 37 μm), secas e pesadas.

A citrinina presente no filtrado foi analisada em cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica-gel.

4.3.5. Poligalacturonase

Para determinação da atividade da poligalacturonase (PG), foi utilizado o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), descrito por MILLER (1959) e modificado no Laboratório de Fisiologia de Microrganismo/BIOAGRO, UFV.

O substrato para PG foi preparado a partir do ácido poligalacturônico cítrico (Sigma), com uma concentração final de 1,0%, dissolvido em tampão acetato de sódio 100 mMoles L⁻¹, pH 4,8 e NaCl 50 mMoles L⁻¹. Volumes de 1,5 mL do substrato e 0,5 mL do filtrado de cultura (enzima bruta) foram incubados por 20 minutos, a 40°C. Após decorrido o tempo, alíquotas de 250 µL dessa mistura foram adicionadas a tubos de ensaio já contendo 1,0 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 750 µL de água destilada, sendo a mistura aquecida em banho de água fervente por cinco minutos. As leituras foram feitas em espectrofotômetro Beckman DU Series 640, a 540 nm, após diluição da solução em 8,0 mL de água destilada e agitação em agitador de tubos tipo vortex.

O controle da reação foi feito pela adição de 250 µL da mistura de reação ao reagente DNS no tempo zero, que foi fervido, diluído e as absorvâncias avaliadas conforme descrito acima. O ácido D-galacturônico foi utilizado para determinar a curva-padrão (Figura 3) na faixa de concentração de 0 a 7,5 mMoles L⁻¹. A atividade enzimática foi expressa como a quantidade de poligalacturonase que produz 1 µmol de açúcar redutor por minuto, por mL de extrato bruto.

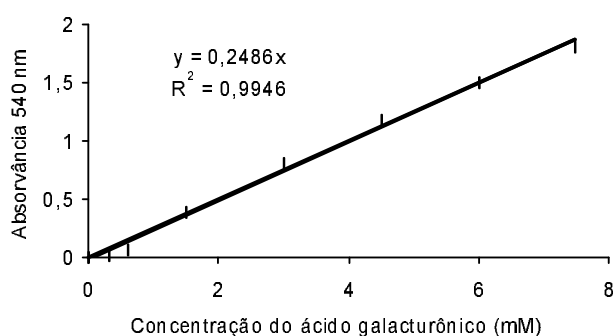


Figura 3. Curva-padrão de ácido galacturônico.

4.3.6. Xilanase

A atividade enzimática foi determinada de acordo com HALTRICH et al. (1993). O filtrado da cultura foi utilizado para dosar a atividade da enzima pela determinação de açúcares redutores liberados a partir de xilana, pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), descrito por MILLER (1959) e modificado no Laboratório de Fisiologia de Microrganismo/BIOAGRO, UFV.

O substrato para xilanase foi preparado a partir de xilana "birchwood" (Sigma) 1,0% (p/v), diluída em solução-tampão fosfato 50 mMoles L⁻¹, pH 5,5. Uma mistura de 1,5 mL do substrato e 0,5 mL do filtrado de cultura (enzima bruta) foi incubada em 20 minutos, a 40°C. Após decorrido o tempo, alíquotas de 250 µL dessa mistura foram adicionadas a tubos de ensaio, contendo previamente 1,0 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 750 µL de água destilada, para a dosagem dos açúcares redutores liberados. A mistura foi aquecida em banho de água fervente por cinco minutos. As leituras foram feitas em espectrofotômetro Beckman DU Series 640, a 540 nm, após diluição da solução em 8,0 mL de água destilada e agitação em agitador de tubos tipo vortex. O controle da reação foi feito pela adição de 250 µL da mistura de reação ao reagente DNS no tempo zero, que foi fervido, diluído e as absorvâncias avaliadas conforme descrito acima. A curva-padrão (Figura 4) foi estabelecida usando D-xilose (Sigma) numa faixa de concentração de 0 a 7,5 mMoles L⁻¹. A atividade enzimática foi expressa como a quantidade de xilanase que produz 1 µmol de açúcar redutor por minuto por mL de extrato bruto.

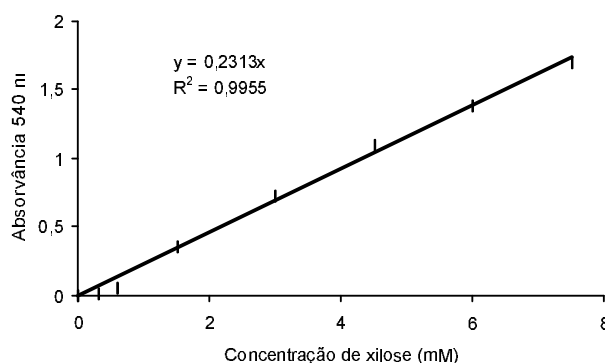


Figura 4. Curva-padrão de xilose.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção de Citrinina por Diferentes Linhagens de *Penicillium* ssp.

Apenas *P. citrinum*, descrito na literatura como o melhor produtor de citrinina (BETINA, 1984), e *P. expansum* GF, linhagem selvagem, isolada de maçã deteriorada (FERREIRA, 2000), foram capazes de produzir citrinina nos três meios de cultura testados; Timonin (T), extrato de levedura (YES) e aveia (A). *P. roqueforti* produziu a micotoxina apenas em meio Timonin, enquanto as outras três linhagens testadas (*P. expansum* VIC, *P. griseoroseum*, *P. camemberti*) não produziram quantidade de citrinina detectável pela metodologia usada (Figura 5).

O fungo *P. citrinum* apresentou forte pigmentação amarelo-citrino no reverso da colônia quando cultivado em meio ágar-aveia e, posteriormente, no meio semi-sólido, composto por aveia e água. Este pigmento apresentou fluorescência amarela sob radiação ultravioleta de 365 nm e coloração púrpura a 254 nm, conforme descrito por BETINA (1984), e foi identificado como citrinina pela CCD em sílica-gel.

A revelação da cromatografia qualitativa em camada delgada dos extratos, sob luz ultravioleta de 365 nm, mostrou manchas em forma de

cometa, de fluorescência amarelada, com R_f aproximado de 0,5, idênticas ao padrão de citrinina usado (Figura 5). Este padrão de cromatografia em camada delgada está de acordo com ROSA et al. (1995).

Segundo FRISVAD e SANSOM (1991), existem diferenças, quanto à toxigenicidade, entre as espécies de fungos produtores de micotoxinas e também entre os fungos da mesma espécie, porém, de diferentes linhagens. Além disso, deve-se levar em consideração que a não-produção de toxina pelo fungo *P. expansum* VIC pode ser devida ao fato dessa linhagem, estar sendo mantida em laboratório por vários anos, ter perdido a sua capacidade toxigênica.

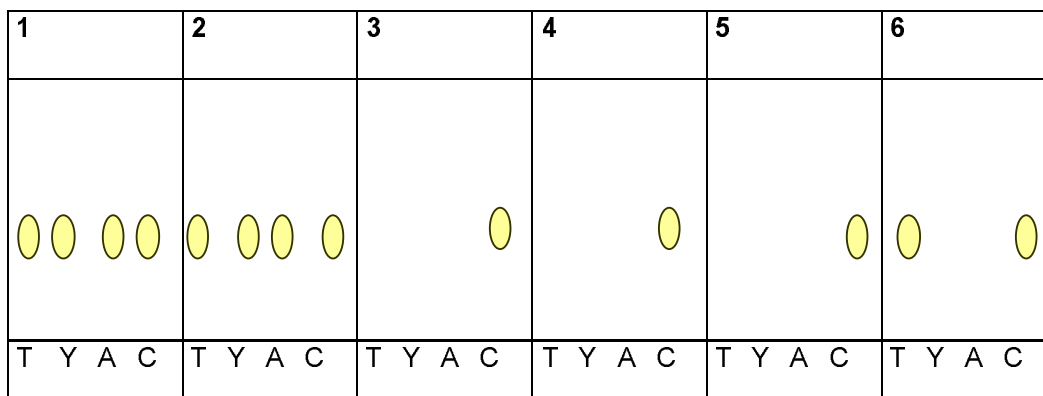


Figura 5. Representação gráfica da produção de citrinina por linhagens de *Penicillium* spp. por CCD em sílica-gel. Cromatogramas: **1)** *P. citrinum* (controle), **2)** *P. expansum* GF, **3)** *P. expansum* VIC, **4)** *P. griseoroseum*, **5)** *P. camemberti* e **6)** *P. roqueforti*. Os fungos foram crescidos em condições estáticas de incubação, durante 21 dias, no escuro, a 25°C em meios Timonin (T), YES (Y) e aveia (A). Alíquotas de 100 µL de extrato de cada cultura e 10 µL do padrão de citrinina – SIGMA, 500 µg mL⁻¹ (C), foram aplicadas no sistema de solvente: clorofórmio:metanol:água (65:25:4), com R_f de 0,5.

A concentração da amostra-padrão de citrinina, utilizada para comparação da intensidade das manchas formadas, foi de 500 µg mL⁻¹. De acordo com TANIWAKI et al. (1992) a intensidade da fluorescência é proporcional à concentração de citrinina. Na amostra derivada do meio de cultura do fungo *P. citrinum*, a coloração amarela fluorescente, característica da citrinina, foi mais intensa que na amostra-padrão, sugerindo que a concentração de citrinina no sobrenadante da cultura de *P. citrinum* está acima de 5 µg mL⁻¹, uma vez que o extrato foi concentrado 5 vezes durante a extração da citrinina e foram adicionados 10 vezes mais amostras do que o padrão de citrinina usado na CCD em sílica-gel. Nas amostras positivas, contendo os extratos dos meios de cultura de *P. expansum* GF e *P. roqueforti*, a intensidade da mancha de citrinina também foi mais intensa que a do padrão de citrinina.

Os demais fungos testados (*P. expansum* VIC, *P. camemberti*, e *P. griseoroseum*) não apresentaram nenhum tipo de mancha característica de citrinina nas placas. A ausência ou presença da citrinina nos meios de cultivo desses fungos foi comprovada por CLAE em fase reversa (Tabela 1).

Tabela 1. Análise quantitativa por CLAE em fase reversa, da citrinina produzida pelos fungos *P. citrinum*, *P. expansum* GF, *P. expansum* VIC, *P. griseoroseum*, *P. camemberti* e *P. roqueforti*, crescidos sem agitação, durante 21 dias, no escuro, a 25 °C.

FUNGOS	CITRININA (µg mL ⁻¹)		
	MEIOS DE CULTURA		
	TIMONIN	YES	AVEIA
<i>P. citrinum</i>	1,18	7,34	0,09
<i>P. expansum</i> GF	0,48	4,96	0,61
<i>P. expansum</i> VIC	ND	ND	ND
<i>P. camemberti</i>	ND	ND	ND
<i>P. roqueforti</i>	4,17	ND	ND
<i>P. griseoroseum</i>	ND	ND	ND

pH dos meios de cultivo: 6,0.

ND = Não-detectado

A análise quantitativa por CLAE em fase reversa mostrou que *P. citrinum* e *P. expansum* produziram 1,18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,48 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de citrinina, respectivamente, em caldo Timonin e 0,09 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,61 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em meio semi-sólido aveia. No entanto, quando crescidos em caldo extrato de levedura (YES), a produção de citrinina por *P. citrinum* e *P. expansum* foi 7,34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 4,96 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. De fato, este meio é comumente o mais utilizado em trabalhos relacionados à produção de citrinina (WYATT, 1977). Segundo esse autor, o meio YES contém os fatores necessários para o crescimento máximo de *P. citrinum* e estes também podem estar relacionados à produção de citrinina. Segundo LE BARS e LE BARS (1998), a composição química do substrato influencia a produção de micotoxina. Quanto maior a quantidade de carboidratos e lipídeos, mais intensa a micotoxigenese. BLANC et al. (1995), estudando linhagens de *Monascus ruber* e *M. purpureus*, verificaram produção de citrinina em concentrações relativamente altas, 370 e 240 mg L^{-1} , respectivamente, em meio YES. Também observaram que concentrações de etanol, 28 g L^{-1} ; e glicose, 45 g L^{-1} , favoreceram a produção de citrinina. No entanto, etanol em altas concentrações, 45 g L^{-1} , inibiu o crescimento. Além disso, fontes de nitrogênio como uréia e metionina desfavoreceram a produção de citrinina.

A produção de uma micotoxina não está associada a uma única espécie de fungo particular; por outro lado, dentro de uma mesma espécie micotoxigênica, nem todas as linhagens possuem essa propriedade. Todavia, quando a possuem, são observadas diferenças no potencial de produção da micotoxina (FRISVAD e SAMSON, 1991; LE BARS e LE BARS, 1998). Os fatores que regulam o crescimento e, conseqüentemente, a produção de citrinina são a composição química do substrato e seu teor de água, além da temperatura. Por exemplo, em estudos realizados em condições controladas, COMERIO et al. (1998) observaram que, para alimentos ricos em amido, como o trigo e milho, a (a_w) atividade de água de 0,775 seria a condição mínima necessária para o crescimento do *P. citrinum*. Conhecido como microrganismo xerófilo, esse fungo cresce muito bem em baixa a_w , porém requer um mínimo de 0,885 de atividade de água para a produção de citrinina. Algum fator semelhante pode ser a explicação para o fato do fungo *P. roqueforti* produzir

citrinina apenas em caldo Timonin e não a produzir nos outros meios testados (aveia e extrato de levedura).

É necessário ressaltar que os dois métodos de análise de cromatografia utilizados (CCD e CLAE em fase reversa) têm o único propósito de detectar citrinina, sem considerar outros compostos de estruturas semelhantes que possam eluir sob as mesmas condições que a toxina. A cromatografia em camada delgada predomina entre as técnicas utilizadas para identificação da citrinina e nenhum método oficial da “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC) utiliza procedimentos de cromatografia líquida (MACHINSKI e MÍDIO, 1995; BRAUSE et al., 1996).

5.2. Curva de Produção de Citrinina pelos Fungos *P. citrinum*, *P. expansum* GF, *P. expansum* VIC e *P. roqueforti*

Através de CCD em sílica-gel foi verificada a produção de citrinina pelas linhagens de *P. citrinum* e *P. expansum* GF, durante todo o período de incubação (40 dias), em caldo extrato de levedura (YES), em condições estáticas de incubação (Figura 6). O fungo *P. citrinum* foi capaz de produzir citrinina em ambas as condições de incubação, estática e agitação rotacional (Figuras 6 e 7), enquanto o fungo *P. expansum* GF apenas produziu citrinina em condições estáticas. Já os fungos *P. expansum* VIC e *P. roqueforti* não produziram citrinina em meio YES, no período analisado, em ambas as condições de incubação (estática e sob agitação).

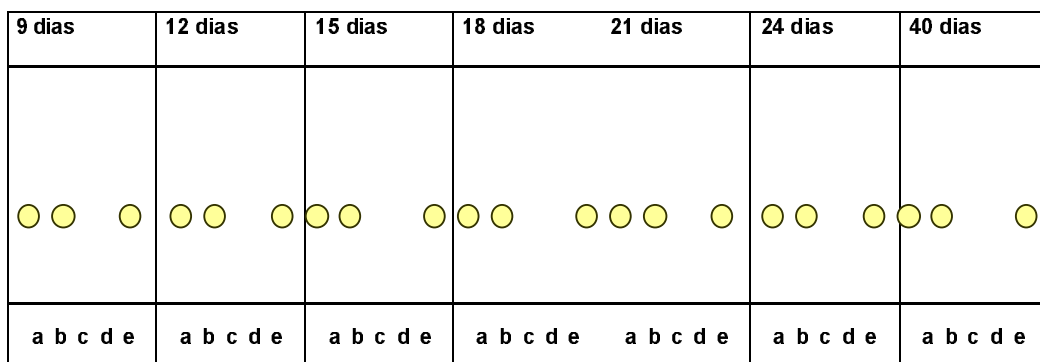


Figura 6. Representação gráfica da produção de citrinina por linhagens de *Penicillium* spp. por CCD em sílica-gel. Cromatogramas: **a)** *P. citrinum*, **b)** *P. expansum* GF, **c)** *P. expansum* VIC, **d)** *P. roqueforti* e **e)** citrinina padrão. Os fungos foram crescidos em caldo extrato de levedura, em condições estáticas de incubação, no escuro, a 25°C, no período de 9, 12, 15, 18, 21, 24 e 40 dias. Alíquotas de 100 µL de extrato de cada cultura e 10 µL de padrão de citrinina - SIGMA, 500 µg mL⁻¹, foram aplicadas no sistema de solvente: clorofórmio:metanol:água (65:25:4), com R_f de 0,5.

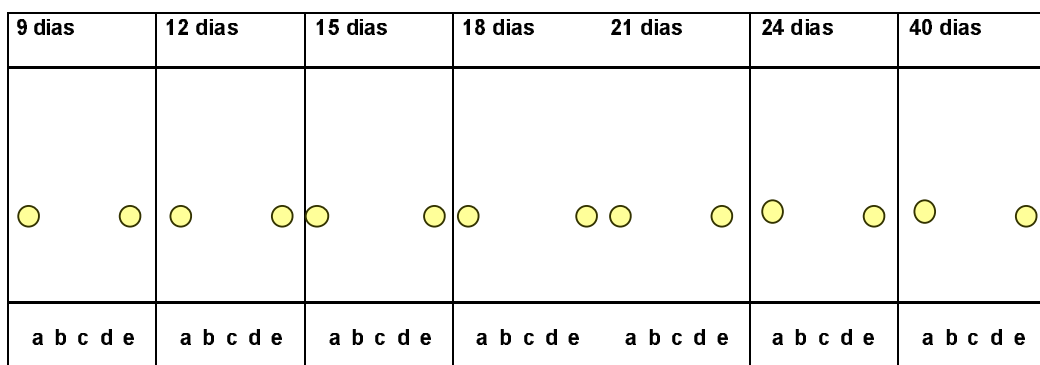


Figura 7. Representação gráfica da produção de citrinina por linhagens de *Penicillium* spp. por CCD em sílica-gel. Cromatogramas: **a)** *P. citrinum*, **b)** *P. expansum* GF, **c)** *P. expansum* VIC, **d)** *P. roqueforti* e **e)** citrinina padrão. Os fungos foram crescidos em caldo extrato de levedura, sob agitação rotacional (150 rpm), no escuro, a 25°C, no período de 9, 12, 15, 18, 21, 24 e 40 dias. Alíquotas de 100 µL de extrato de cada cultura e 10 µL de padrão de citrinina - SIGMA, 500 µg mL⁻¹, foram aplicadas no sistema de solvente: clorofórmio:metanol:água (65:25:4), com R_f de 0,5.

De acordo com MIDIO e MARTINS (2000), fatores intrínsecos e extrínsecos podem afetar a produção de micotoxina, devido ao fato de muitas espécies de fungos produzirem tipos particulares de micotoxinas somente em condições ambientais favoráveis.

Os resultados de CCD em sílica-gel foram confirmados por CLAE em fase reversa, onde a citrinina obteve tempo de retenção próximo de 10 minutos. Foi verificada a produção de citrinina durante todo o período de incubação (9° ao 40° dias) dos fungos *P. citrinum* e *P. expansum* GF, quando ambos foram incubados em condições estáticas, no escuro, a 25°C (Figuras 8 e 9).

A massa micelial não influencia a produção de citrinina por *P. citrinum*, tanto em condição estática quanto sob agitação rotacional (Figuras 9 e 10). A análise quantitativa de citrinina por CLAE em fase reversa mostrou produção crescente de citrinina por *P. citrinum* durante o período do 9° ao 21° dia em ambas as condições de incubação, estática e agitação rotacional (Figuras 9 e 10). Da mesma forma, DAVIS et al. (1975), estudando produção de citrinina por *P. citrinum*, em condições estáticas, observaram início de produção no 8° dia e produção máxima no 21° dia. Após esse período de tempo, a produção de citrinina decaiu rapidamente. No entanto, RODIG et al. (1966) observaram aumento na produção de citrinina após 21 dias de incubação. VAIL e HOMMAN (1990) detectaram produção de citrinina após 20 horas de incubação e um aumento drástico quando a cultura entrou em fase de crescimento estacionário, indicando que a biossíntese de citrinina está realmente associada com o metabolismo secundário. Ao contrário de *P. citrinum*, *P. expansum* GF produziu 1,61 µg mL⁻¹ de citrinina no 9° dia, diminuindo sua produção ao longo do tempo, acompanhada por diminuição de biomassa (Figura 8). Esses resultados diferem dos observados por FRANCO et al. (1997), em que os valores máximos da produção de citrinina por ambos, *P. citrinum* e *P. expansum*, crescidos em meio YES, em condições estáticas de incubação, foram detectados entre o 12° e 14° dia, com decréscimo desta em seguida. Por sua vez, em agitação rotacional a 150 rpm, o fungo *P. expansum* GF, não produziu citrinina em nenhum dos dias de incubação (Figura 11).

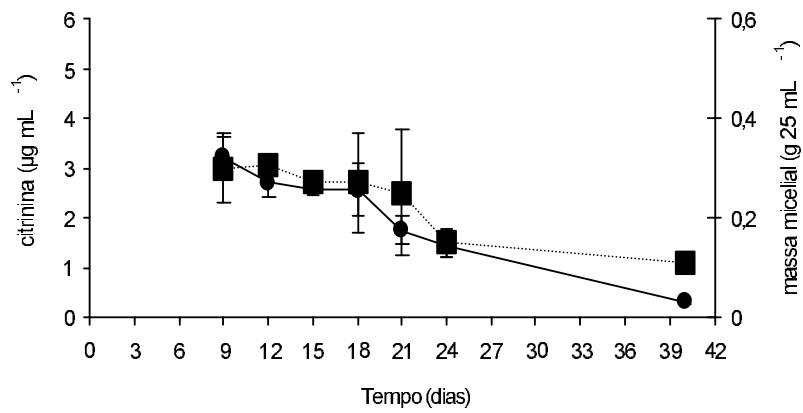


Figura 8. Produção de citrinina (—●—) e crescimento de *P. expansum* GF (—■—) em caldo extrato de levedura (YES), em condições estáticas, a 25°C, no escuro, durante 40 dias.

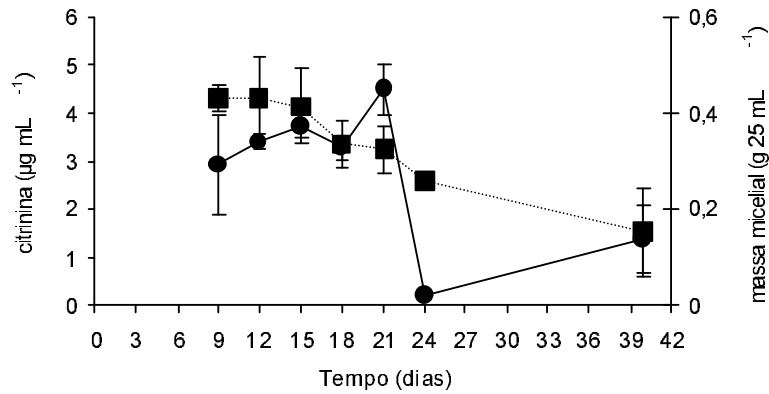


Figura 9. Produção de citrinina (—●—) e crescimento de *P. citrinum* (—■—) em caldo extrato de levedura (YES), em condições estáticas, a 25°C, no escuro, durante 40 dias.

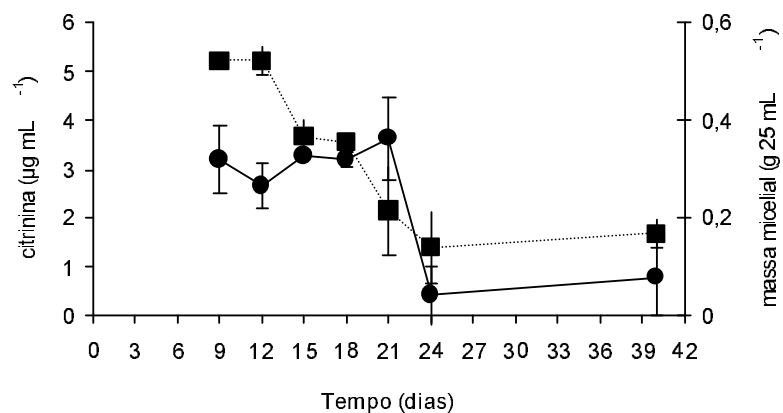


Figura 10. Produção de citrinina (—●—) e crescimento de *P. citrinum* (—■—) em caldo extrato de levedura (YES), em condições de agitação a 150 rpm, a 25°C, no escuro, durante 40 dias.

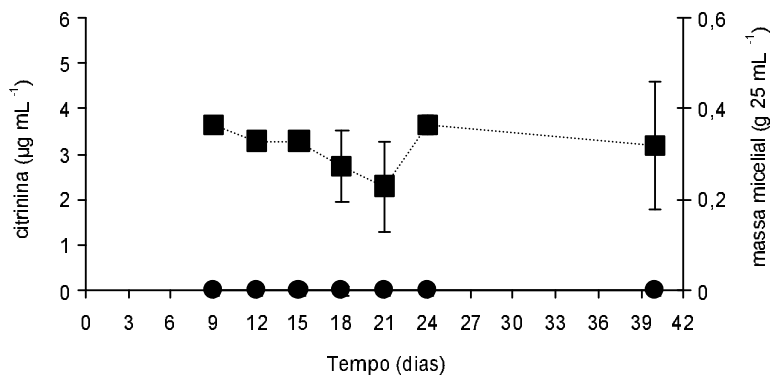


Figura 11. Produção de citrinina (—●—) e crescimento de *P. expansum* GF (—■—) em caldo extrato de levedura (YES), em condições de agitação, a 25°C, no escuro, durante 40 dias.

A produção máxima de citrinina por *P. citrinum* sob agitação rotacional, $1,81 \mu\text{g mL}^{-1}$, foi menor se comparada às condições estáticas, que foi de $2,24 \mu\text{g mL}^{-1}$. Ao contrário, BLANC et al. (1995), ao avaliarem a produção de citrinina em linhagens de *Monascus ruber*, observaram produção de 59 mg L^{-1} em meio contendo etanol e 380 mg L^{-1} em fermentador em condições estáticas de incubação. HAJJAJ et al. (1999), também estudando *Monascus ruber*, observaram que o aumento da oxigenação, tanto por aumento da aeração, quanto da agitação, é essencial para a produção de metabólitos secundários.

De acordo com BETINA (1984), os metabólitos e as enzimas produzidas por *Penicillium* e outros gêneros relacionados estão ausentes em culturas jovens, ou seja, na trofofase, e somente passam a ser produzidos quando a cultura atinge a fase de crescimento estacionário ou a idiofase. Durante este período, alguns nutrientes essenciais tornam-se limitados e, dessa forma, ocorre um drástico aumento de metabólitos secundários, produto final que se acumula em algumas condições de cultivo. Porém, existem casos nos quais algumas espécies de *Penicillium*, como, *Penicillium citrinum*, apresentam produção bifásica de citrinina, ou seja, ocorrendo tanto na fase exponencial quanto na fase estacionária de crescimento do fungo. Além disso, mudanças na composição do meio, pH, temperatura e taxa de aeração podem afetar não apenas a quantidade relativa de metabólitos, mas o tempo de seu aparecimento.

CIEGLER et al. (1977) observaram, em condições estáticas de incubação do fungo *P. expansum*, diminuição da citrinina a partir do 9º e concluíram que esse decréscimo não representou necessariamente degradação de citrinina, mas pode ter sido devido à reação química da citrinina com o substrato. No entanto, DAMOGLU et al. (1984) relatam que a degradação de citrinina pode ser devida à liberação de enzimas durante a lise celular ou outro tipo de degradação.

Curvas de crescimento fúngico e produção de micotoxina podem variar marcadamente entre diferentes linhagens e sistemas de cultivo, com crescimento e produção de toxina, sendo altamente regulados em cada sistema, em condições específicas de estocagem (PASTER et al., 1995).

5.3. Produção de poligalacturonases e xilanases, simultaneamente à produção de citrinina, pelos fungos *P. citrinum*, *P. expansum* VIC, *P. expansum* GF e *P. griseoroseum*

Ocorreu baixa produção de xilanase pela linhagem de *P. expansum* VIC nos dois meios utilizados, farelo de trigo e caldo extrato de levedura (Tabela 2), quando comparado com o trabalho de FERREIRA (2000), que observou produção superior de xilanase no meio de farelo de trigo, embora a produção de poligalacturonase (PG) também tenha sido reduzida. A característica de *P. expansum* VIC, de baixa produção da enzima PG, já havia sido constatada por PINHEIRO (1999), em substrato à base de farelo de trigo.

Quanto à linhagem de *P. expansum* GF, esse fungo demonstrou ser capaz de produzir enzimas xilanolíticas e pectinolíticas em caldo YES, não sendo possível detectar xilanase em farelo de trigo (Tabelas 2 e 3), resultado também encontrado por FERREIRA (2000), analisando a mesma linhagem. Quando o meio farelo de trigo foi utilizado para a produção de PG, foi observada produção da enzima, o que não foi observado para a linhagem VIC.

Os outros fungos testados, *P. griseoroseum* e *P. citrinum*, demonstraram capacidade de produção das enzimas PG e xilanase em caldo YES.

Em geral, exceto quanto à PG de *P. citrinum*, quando a fonte de carbono utilizada como substrato para o crescimento desses fungos foi o farelo de trigo, menor quantidade de enzimas, tanto xilanase quanto PG, foram produzidas.

P. citrinum produziu xilanase apenas em meio YES.

Tabela 2. Produção de Xilanase pelos fungos *P. citrinum*, *P. expansum* VIC, *P. expansum* GF e *P. griseoroseum*

Fungo	Meio de cultivo	Atividade Enzimática ($\mu\text{moles ART mL filtrado min}^{-1}$)
<i>P. expansum</i> VIC	Farelo de trigo	0,131
<i>P. expansum</i> VIC	YES	0,193
<i>P. expansum</i> GF	Farelo de trigo	ND
<i>P. expansum</i> GF	YES	0,421
<i>P. citrinum</i>	Farelo de trigo	ND
<i>P. citrinum</i>	YES	0,798
<i>P. griseoroseum</i>	Farelo de trigo	0,058
<i>P. griseoroseum</i>	YES	1,359

ND= Não-detectado
ART – açúcares redutores totais

Tabela 3. Produção de Poligalacturonase pelos fungos *P. citrinum*, *P. expansum* VIC, *P. expansum* GF e *P. griseoroseum*.

Fungo	Meio de cultivo	Atividade Enzimática ($\mu\text{moles ART.mL filtrado min}^{-1}$)
<i>P. expansum</i> VIC	Farelo de trigo	ND
<i>P. expansum</i> VIC	YES	0,240
<i>P. expansum</i> GF	Farelo de trigo	0,415
<i>P. expansum</i> GF	YES	2,580
<i>P. citrinum</i>	Farelo de trigo	0,530
<i>P. citrinum</i>	YES	ND
<i>P. griseoroseum</i>	Farelo de trigo	0,296
<i>P. griseoroseum</i>	YES	2,526

ND – Não-detectado
ART – açúcares redutores totais

Com o propósito de avaliar a possibilidade de utilização desses fungos para a produção de enzimas na indústria de alimentos, foi analisada a capacidade de produzirem citrinina, nas mesmas condições de produção das enzimas. Através de cromatografia em camada delgada de sílica-gel, ficou demonstrado que nenhuma das linhagens testadas produziu a micotoxina citrinina durante o período de 120 horas, em agitação rotacional a 150 rpm (Figura 12). Nesse caso, o fungo *P. expansum*, bem como *P. griseoroseum*, não representam perigo quanto à produção de citrinina para a indústria de alimentos, pois não têm capacidade de produzir a micotoxina nas mesmas condições em que produzem as enzimas xilanase e poligalacturonase.

1	2
●	●
a b c d e	a b c d e

Figura 12. Representação gráfica da produção de citrinina por linhagens de *Penicillium* ssp. em CCD em sílica-gel, no sistema de solvente clorofórmio:metanol:água (65:25:4). **1)** Farelo de trigo e **2)** Caldo YES. **a)** *P. expansum* VC, **b)** *P. expansum* GF, **c)** *P. citrinum*, **d)** *P. griseoroseum*, **e)** padrão de citrinina – SIGMA, 500 µg mL⁻¹, R_f 0,5. Fungos cultivados em agitação rotacional, a 25°C, no escuro, durante 120 horas.

CONCLUSÕES

Dentre as seis linhagens dos *Penicillia* testadas, apenas *P. citrinum* e *P. expansum* GF, isolados de maçã deteriorada, produziram citrinina nos três meios de culturas analisados (Timonin, YES e aveia). O fungo *P. roqueforti* demonstrou apenas produzir citrinina em meio Timonin. Os demais não produziram a micotoxina em quantidades detectáveis pela metodologia usada em quaisquer dos meios utilizados.

Penicillium citrinum produziu citrinina em todos os tempos de cultivo, tanto incubado na forma estacionária quanto sob agitação rotacional, apresentando um aumento gradativo da citrinina ao longo do período de cultivo, com máximo de produção no 21º dia.

Penicillium expansum GF produziu citrinina em todos os tempos de cultivo analisado na forma estacionária, porém não a produziu no cultivo sob agitação.

Por outro lado, *Penicillium expansum* VIC e *Penicillium griseoroseum* não produziram a citrinina em nenhum meio e em quaisquer das condições de cultivo testadas. Com isso, pode-se concluir que as duas linhagens de fungo, *Penicillium expansum* VIC e *Penicillium griseoroseum*, não representam perigo para a utilização na produção de enzimas para aplicação na indústria de alimentos, em relação à micotoxina citrinina. O mesmo foi observado por FERREIRA (2000) quanto à patulina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAÑA, A.; GABILONDO, A.; HERNANDO, F.; MORAGUES, M.D.; DOMINGUEZ, J.B.; LLAMA, M.J.; SERRA, J.L. Pectin lyase production by *Penicillium italicum* strain. **Applied Environment Microbiology**, v.55, p.1612-1616, 1989.
- AMES, D.D.; WUATT, R.D.; MARKS, H.L.; WASHBURN, K.W. Effect of citrinin, a mycotoxin produced by *Penicillium citrinum*, on laying hens and young broiler chicks. **Poultry Science**, v.55, p.1294-1301, 1976.
- BEHERE, A.; SATYANA RAYAN, V.; PADWAL-DESAI, S.R. Separation and limited characterization of three polygalacturonase of *Aspergillus niger*. **Enzyme Microbial Technology**, v.15, p.158-161, 1993.
- BETINA, V. Citrinin and related substances. In: V. Betina (Ed). **Mycotoxins, Production, Isolation, Separation and Purification**. Elsevier, Sci. Publ. Co. Inc., New York, p. 3-236. 1984.
- BLANC P.J.; LORET M.O.; GOMA, G. Production of citrinin by various species of *Monascus*. **Biotechnology Letters**, v.17, n.3, p.291-294, 1995.
- BRAUSE, A.R.; TRUCKSESS, M.W.; THOMAS, F.S.; PAGE, S.W. Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.79, p.451-455, 1996.
- CAZENAVE, S.O.S.; MIDIO, A.F. Zearelonona – micotoxina com atividade estrogênica presente em alimentos. **Cadernos de Nutrição**, v.16, p.1-13, 1998.

- CHESSON, A. Maceration in relation to the post harvest handling and processing of plant material. **Journal Applied Bacteriology**, v.48, p.1-45, 1980.
- CIEGLER, A.; VESONDER, R.F.; JACKSON, L.K. Production and biological activity of patulin and citrinin from *Penicillium expansum*. **Applied and Environment Microbiology**, v.33, n.4, p.1004-1006, 1977.
- COMERIO, R.; PINTO, V.E.F.; VAAMONDE, G. Influence of water activity on *Penicillium citrinum* growth and kinetics of citrinin accumulation in wheat. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, p.219-223, 1998.
- DAMODARAN, C.; RAMADOSS, C.S. e SHANMUGASUNDARAM, E.R.B. A rapid procedure for the isolation, identification and estimation of citrinin. **Analytical Biochemistry**, v.52, p.482-488, 1973.
- DAMOGLOU, A.P.; DOWNEY, G.A.; SHANNON, W. The production of ochratoxin and citrinin in barley. **Journal of Science of Food Agriculture**, v.35, p.395-400, 1984.
- DAVIS, N.D.; DALBY, D.K.; DIENER, U.L.; SANSING, G.A. Medium-scale production of citrinin by *Penicillium citrinum* in a semi synthetic medium. **Applied Microbiology**, v. 29, n.1, p.118-120, 1975.
- DE RONZO, D.J. Energy from Bioconversion of Waste Materials, Noyes Data Corporation, Park Ridge. New Jersey, USA, 1977.
- DERUILER, J.; JACYNO, J.M.; DAVIS, R.A; CUTIER, H.G. Studies on aldose reductase inhibitors from fungi. 1. Citrinin and related benzopyran derivatives. **Journal of Enzyme Inhibition**, v. 201, n.6, p.201-210, 1992.
- FAO. Mycotoxin Surveillance: a guideline. **Food and Nutrition Paper**, n.21, p.17, 1982.
- FAWOLE, O.B.; ODUNFA, S.A. Pectolytic moulds in Nigeria. **Letters Applied and Microbiology**, v.15, p.266-268, 1992.
- FERREIRA, G. Produção de Patulina por *Penicillium* ssp. **Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola**. Universidade Federal de Viçosa, MG., 52 p., 2000.
- FOGARTY, W.M.; KELLY, C.T. Glucose isomerases. **Microbial Enzymes and Biotechnology**, ed.2, p.199-220, 1990.
- FRANCO, C.M.; FENTE, C.A.; VAZQUEZ, B.; CEPEDA, A.; LALLAOUI, L.; PROGNON, P.; MAHUZIER, G. Simple and sensitive high-performance liquid chromatography-fluorescence method for the determination of citrinin Application to the analysis of fungal cultures and cheese extracts. **Journal of Chromatography**, v.723, n.1, p.69-75, 1996.

- FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage, and mycotoxin production. **Handbook of Applied Mycology**, v.3, p.31-69, 1991.
- GILBERT, M.; BREU, C.; AGUCHI, M.; SADDLER, J.N. Purification and characterization of a xylanase from the thermophilic ascomycete *Thielavia terrestris* 255B. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p.247-259, 1992.
- GOODENOUGH, S.; GOODENOUGH, P. Who needs cellulase? **Journal Biological Education**, v.27, n.2, p.97-102, 1993.
- GUPTA, M.; BANDYOPADHYAY, S.; SASMAL, D. Effect of ochratoxin A and citrinin on liver function and metabolism. **IRCS Medical Science**, v.7, p.320, 1979.
- GUPTA, M.; DOLUI, A.K.; DEY, S.N.; MUKHERJEE S.; MAJUMDER U.K. AND BATARYAL S.K. Effect of the mycotoxin citrinin on some hormones and on enzymes and substrates of the Embden-Meyerhof Pathway in mice. **Toxicol**, v.24, n.5, p.519-523, 1986.
- HAJJAJ, H.; BLANC, P.J.; GROUSSAC, E.; GOMA, G.; URIBELARREA, J.L.; LOUBIERE, P. Improvement of red pigment/citrinin production ratio as a function of environmental conditions by *Monascus ruber*. **Biotechnology and bioengineering**, v.64, n.4, p.497-501, 1999.
- HETHERINGTON, A.C.; RAISTRICK, H. Studies in biochemistry of microorganisms XI. On the production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, citrinin, produced from glucose by *Penicillium citrinum* Thom. **Phil. Trans. R. Soc. London**, v.220, p.269-297, 1931.
- JACKSON, K.; CIEGLER, A. Production and analysis of citrinin in corn. **Applied and Environmental Microbiology**, v.36, n.3, p.408-411, 1978.
- KHASIN, A.; ALCHANATI, I.; SHOHAM, Y. Purification and characterization of thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. **Applied Environmental Microbiology**, v.59, p.1725-1730, 1993.
- KROGH, P.; HALD, B.; PEDERSEN, E.J. Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxin porcine nephropathy. **Acta Pathology Microbiol**, v.81, p.689-695, 1973.
- KROGH, P. Causal association of mycotoxic nephropathy. p.269. 1978. **Acta Pathology Microbiol**, p.269, 1978.
- KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v.23, p.411-456, 1999.

- LE BARS, J.; LE BARS, P. Strategy for safe use of fungi and fungal derivatives in food processing. **Revista de Medicina Veterinária**, v. 149, p. 493-500, 1998.
- MALMSTROM, J.; CHRISTOPHERSEN, C.; FRISVAD, J.C. Secondary metabolites characteristic of *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii* and related species. **Phytochemistry**, v.54, p.301-309, 2000.
- MANACHINI, P.L.; PARINI, C.; FORITNA, M.G. Pectic enzymes from *Aureobasidium pullulans* LV 10. **Enzyme and Microbial Technology**, v.10, p.682-685, 1988.
- Mc LELLAN, M.R.; KIME, R.W.; LIND, L.R. Apple juice clarification with the use of honey and pectinase. **Journal Food Science**, v.50, p.206-208, 1985.
- MÍDIO, A.F.; MARTINS, D.I. Toxicologia de alimentos. São Paulo: Ed. Varela, p. 62-101, 2000.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-431, 1959.
- MUTSAERS, J.H.G.M. Xylanase in bread making. In: Xylans and xylanases **International Symposium**, v.48, p.8-11, 1991.
- NELSON T.S.; BEASLEY J.N.; KIRBY L.K.; JOHNSON Z.B.; BALLAM G.C. Isolation and identification of citrinin produced by *Penicillium lanosum*. **Poultry Science**, v.59, p.2055-2059, 1979.
- NELSON, T.S.; KIRBY, L.K.; BEASLEY, J.N.; JOHNSON, Z.B.; CIEGLER, A. The effect of drying method and storage time on citrinin activity in corn. **Poultry Science**, v.64, p.464-468, 1985.
- PASTER, N.; HUPPERT, D.; BARKAI-GOLAN, R. Production of patulin by different strains of *Penicillium expansum* in pear and apple cultivars stored at different temperatures and modified atmospheres. **Food Additives and Contaminants**, v.51, n.12, p.51-58, 1995.
- PINHEIRO, V. D. Produção e Caracterização Parcial de Xilanases de *Penicillium expansum*. **Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola**. Universidade Federal de Viçosa, MG., 60p, 1999.
- PHILLIPS, R.D.; RAYES, A.W.; BERNDT, W.O.; WILLIAMS, W. Effects of citrinin on renal function and structure. **Toxicology**, v.16, p.123-127, 1980.
- POHLAND, A. E.; WOOD, G.E. Occurrence of mycotoxins in food. In: Krogh, P. (Eds.) **Mycotoxins in Food**, p.35-64, 1987.
- PRIETA, J.; MORENO, M.A.; DÍAZ, S.; SUÁREZ, G.; DOMÍNGUEZ, L. La patulina como indicador de calidad en productos elaborados con manzana. **Alimentaria**, p.75-80, 1994.

- RIBEIRO, S.M.; CHAGAS, G.M.; CAMPELO, A.P.; KLUPPEL, M.L. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. V. Effects on the homeostasis of reactive oxygen species. **Cell Biochemistry and Function**, v.15, p.203-209, 1997.
- RODIG, O.R.; ELLIS, L.C.; GLOVER, I.T. The biosynthesis of citrinin *Penicillium citrinum*. I. Production and degradation of citrinin. **International Symposium on the Chemistry of Natural Products**, v.5, n.7, p.2451-2457, 1966.
- ROSA, C.A.R.; CRUZ, L.C.H.; CHAGAS, W.A.; VEIGA, C.E.M.O. Ocorrência natural de nefropatia micotóxica suína causada pela ingestão de cevada contaminada com citrinina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.3, n.7, p.87-90, 1985.
- ROSS, G.U.; TANIWAKI, M.H.; SABINO, M.; VIZONII, T.; HIROOKA, E.Y. Produção de patulina em maçã (*Malus domestic Borhausen*), cultivares Gala e Fuji inoculadas com *Penicillium* spp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, p.63-67, 1998.
- RYU, D.; HOLT, D.L. Growth inhibition of *Penicillium expansum* by several commonly used food ingredients. **Journal of Food Protection**, v.56, p.902-904, 1993.
- SABATER-VILAR, M.; ROEL, F.M.M.; FINK-GREMMELS, J. Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination. **Mutation Research**, v.444, p.7-16, 1999.
- SAITO, M.; ENOMOTO, M.; TATSUNO, T.; URAGUCHI, K. **Yellowed rice toxins**. In: Ciegler, A., Kadis, S., Ajd. S. J. (Eds). **Microbial Toxins. Fungal Toxins**, v.6, p.299-380, 1971.
- SCOTT, P.M.; WALBEEK, W.V.; KENNEDY, B. Mycotoxins (ochratoxin A, citrinin, and sterigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and other agricultural products. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.20, n.6, p.1103-1109, 1972.
- SWEENEY, M.J.; DOBSON, A.D.W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v.43, p.141-158, 1998.
- TAN, L.U.; YU, E.K.C.; LOUIS-SEIZE, G.W.; SADDLER, J.N. Inexpensive, rapid procedure for bulked purification of cellulase-free β -1,4-D-xylanase of high specific activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v.30, p.96-100, 1987.
- TENKANEN, M.; PULS, J.; POUTANEN, K. Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. **Enzyme Microbial Technology**, v.14, p.566-574, 1992.

- TANIWAKI, M.H.; HOENDERBOOM, C.J.M.; VITALI, A.A.; EIROA, M.N.U. Migration of patulin in apples. **Journal of Food Protection**, v.55: 902-904, 1992.
- TONON, S.A.; MARUCCI, R.S.; JERKE, G.; GARCÍA, A.; VELLON, L.; FERRERAS, J. Hongos contaminantes del arroz producido en la región central del Mercosur. **Alimentaria Latino Americana**, v.214, p.39-45, 1996.
- VAIL R.B.; HOMMAN, M.J. Rapid e sensitive detection of citrinin production during fungal fermentation using HPLC. **Journal of Chromatography**, v.535, p.317-323, 1990.
- VAN DER BROECK, H.C.; DE GRAAFF, L.L.; HILLE, J.D.R.; VAN OUYEN, A.J.J.; HARDER, A. Cloning and expression of fungal xylanase genes and use of the xylanase in bread making and in preparation of feed and paper products. **Eur. Pathology Applied**, v.90, p.202-220, 1990.
- VIÑAS I.; DADON J.; SANCHIS V. Citrinin-producing capacity of *Penicillium expansum* strains from apple packinghouses of Lerida (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v.19, p.153-156, 1993.
- WHITAKER, J.R. Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. **Enzyme and Microbial Technology**, v.6, p.341-349, 1984.
- WONG, K.K.Y.; TAN, L.U.; SADDLER, J.N. Multiplicity of β -1,4- xylanases in microorganisms: functions and applications. **Microbiology Reviews**, v.52, p.305-317, 1988.
- WYATT, R.D. Production of citrinin by *Penicillium citrinum* in different Liquid Media. **Poultry Science**, v. 56, n.1, p.1342-1344, 1977.

APÉNDICE

Apêndice A

Figura 1. A. Cromatografia de fase reversa em HPLC. A) citrinina padrão em concentração de 15 μg , B) *P. citrinum*, C) *P. expansum* GF, D) *P. expansum* VIC, E) *P. griseoroseum*, F) *P. roqueforti* e G) *P. camemberti*, incubados em condições estáticas, a 25 °C, no escuro em caldo extrato de levedura durante 21 dias.

