



**Autarquia associada à Universidade de São Paulo**

**DEGRADAÇÃO POR RADIAÇÃO DE RESÍDUOS BIOLÓGICOS  
(AFLATOXINAS) PRODUZIDOS EM LABORATÓRIO DE ALIMENTOS**

**VLADIMIR DIAS ROGOVSKI**

**Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do Grau de  
Mestre em Ciências na Área de Tecnologia  
Nuclear – Aplicações.**

**Orientadora:  
Dra. Anna Lúcia C. H. Villavicencio**

**São Paulo  
2009**

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Anna Lúcia C. H. Villavicencio, pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela orientação e pela grande ajuda na realização deste trabalho, contribuindo para o meu crescimento profissional;

Ao IPEN, especialmente ao Centro de Tecnologia das Radiações, representado pelo Dr. Wilson Aparecido Parejo Calvo, gerente do CTR, e pela Dra. Margarida Hamada, chefe de divisão de pesquisa e desenvolvimento do CTR, pelo constante apoio e pré-disposição em ajudar e na busca por soluções;

Ao Dr. Benedito Corrêa, pela colaboração e ensinamentos, assim como por estar sempre à disposição para esclarecimentos e disponibilizar seu laboratório e materiais, sem o qual este trabalho não poderia ser realizado;

À Dra. Edlayne Gonzalez pela constante ajuda na quantificação das amostras, disponibilizando equipamentos de seu laboratório, imprescindíveis para realização desta pesquisa;

À Dra. Simone Aquino, pelos ensinamentos e todo suporte prestado na realização deste trabalho;

Aos engenheiros Elizabeth S. R. Somessari e Carlos Gaia da Silveira, por todo auxílio prestado na irradiação das amostras;

À Comissão Nacional de Energia Nuclear, pela concessão da bolsa de estudo;

Aos meus colegas de laboratório, Thaise, Renato, Michel, Camilo, Priscila, Gustavo e todas as outras pessoas que no momento não me recordo os nomes, por todo apoio dado ao longo desta trajetória.

*"A arte de escutar é como uma luz que dissipa a escuridão da  
ignorância"*

*Dalai Lama*

# DEGRADAÇÃO POR RADIAÇÃO DE RESÍDUOS BIOLÓGICOS (AFLATOXINAS) PRODUZIDOS EM LABORATÓRIO DE ALIMENTOS

Vladimir Dias Rogovschi

## RESUMO

Muitos fungos filamentosos podem produzir metabólitos secundários, denominados micotoxinas, podendo ser encontradas em produtos alimentícios e produtos agrícolas. Um dos principais gêneros de fungos micotoxigênicos relacionados à cadeia alimentar é o *Aspergillus* spp. Existem mais de 400 micotoxinas descritas na literatura, sendo as mais comuns as aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>. As micotoxinas são frequentemente encontradas em alimentos e são consideradas como um dos mais perigosos contaminantes, sendo a aflatoxina B<sub>1</sub> classificada no Grupo 1 pela “*International Agency of Research on Cancer*”. As aflatoxinas são termorresistentes, resistindo por mais de uma hora em autoclave, fazendo-se necessário outro meio de degradação dessas toxinas. Este trabalho teve como objetivo observar os efeitos da radiação gama de <sup>60</sup>Co e de feixes de elétrons na degradação das aflatoxinas e comparar os danos causados na morfologia do fungo *Aspergillus flavus*. O fungo foi cultivado em agar batata dextrose (PDA) por 10 dias e posteriormente foi transferido para o meio agar coco, sendo mantido por 14 dias à 25 °C. Após esta etapa o agar coco foi triturado até se tornar um meio pastoso homogêneo e foi irradiado com doses de 2,5, 5,0, 10 e 20 kGy. As amostras utilizadas na microscopia eletrônica de varredura foram irradiadas com as doses de 0, 2,5, 5,0, 10 e 20 kGy com fontes de <sup>60</sup>Co e de feixes de elétrons. A irradiação com acelerador de elétrons apresentou uma degradação ligeiramente superior à radiação gama, reduzindo 29,93 %, 34,50 %, 52,63 % e 72,30 % para as doses de 2,5, 5,0, 10 e 20 kGy, respectivamente. A microscopia eletrônica de varredura demonstrou que as doses de 2,5 até 10 kGy não causaram danos no fungo, porém com a dose de 20 kGy pode-se observar danos nas estruturas fúngicas.

## **RADIATION DEGRADATION OF BIOLOGICAL WASTE (AFLATOXINS) PRODUCED IN FOOD LABORATORY**

**Vladimir Dias Rogovschi**

### **ABSTRACT**

Many filamentous fungi can produce secondary metabolites, called mycotoxins, which can be found in food and agricultural products. One of the main genera of mycotoxigenic fungi related to the food chain is the *Aspergillus* spp. There are over 400 mycotoxins described in the literature, the most common the aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>. The mycotoxins are commonly found in foods and are considered one of the most dangerous contaminants. The aflatoxin B<sub>1</sub> is classified in group one by the International Agency of Research on Cancer. Aflatoxins resisting for more than one hour in autoclave making it necessary to other means of degradation of these toxins. This work aimed to observe the effects of gamma radiation of <sup>60</sup>Co and electron beams in the degradation of aflatoxins and compare the damage caused on the morphology of the *Aspergillus flavus*. The fungus was grown on potato dextrose agar (PDA) for 10 days and was subsequently transferred to coconut agar medium, and maintained for 14 days at 25 °C. After this step the coconut agar was ground to become a homogeneous pasty and was irradiated with doses of 2.5, 5.0, 10 and 20 kGy. The samples used in scanning electron microscopy were irradiated with doses of 0, 2.5, 5.0, 10 and 20 kGy with sources of <sup>60</sup>Co and electron beams. Irradiation with electron accelerator showed a slightly higher degradation to gamma radiation, reducing 29.93 %, 34.50 %, 52.63 % and 72.30 % for doses of 2.5, 5.0, 10 and 20 kGy, respectively. The Scanning Electron Microscopy showed that doses of 2.5 to 10 kGy did not cause damage to the fungus, but with a dose of 20 kGy it can be observed fungal damage to structures.

## SUMÁRIO

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
3.1 Fungos produtores de aflatoxinas.....	15
3.2 Condições ambientais reguladoras da biossíntese das aflatoxinas.....	16
3.3 Biossíntese das aflatoxinas.....	16
3.4 Fatores que afetam a sobrevivência, crescimento e produção de aflatoxinas por <i>Aspergillus</i> .....	17
3.5 Luz como mediador da biossíntese da aflatoxinas.....	18
3.6 Fonte de carbono.....	18
3.7 Fonte de nitrogênio.....	19
3.8 Influência da temperatura na produção de aflatoxinas.....	19
3.9 Atividade de água e pH.....	20
3.10 Métodos de pré tratamento das amostras.....	20
3.10.1 Extração líquido-líquido.....	21
3.10.2 Extração com fluído supercrítico.....	21
3.11 Métodos de separação.....	22
3.11.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	22
3.11.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	22
3.11.3 Cromatografia Gasosa (CG).....	22
3.11.4 Método Imunoenzimático (ELISA).....	23
3.12 Legislação.....	23
3.12.1 Consumo Humano.....	23
3.12.2 Alimentos para consumo animal.....	24
3.13 Irradiação.....	24
3.13.1 Fontes de irradiação.....	26
3.13.2 Raios gama.....	26
3.13.3 Feixes de elétrons.....	27
3.13.4 Raios X.....	27
3.14 Microscopia eletrônico de varredura (MEV).....	28

<b>4. MATERIAIS E METODOS.....</b>	<b>29</b>
4.1 Cepa.....	29
4.2 Preparo do meio de cultura.....	29
4.3 Preparo das amostras.....	29
4.4 Irradiação das amostras.....	31
4.5 Extração de aflatoxinas.....	32
4.6 Cromatografia em Camada Delgada.....	32
4.7 Quantificação das aflatoxinas.....	34
4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	34
4.9 Análise Estatística.....	35
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>47</b>

## LISTA DE TABELAS

### Página

TABELA 1 - Propriedades químicas das aflatoxinas.....	13
TABELA 2 - Limites aceitáveis de aflatoxinas presente no leite, milho e amendoim.....	24
TABELA 3 – Níveis de aflatoxina B <sub>1</sub> (µg kg <sup>-1</sup> ) obtidos na quantificação das amostras irradiadas em fonte de <sup>60</sup> Co com doses de 0, 2,5, 5,0, 10 e 20 kGy.....	36
TABELA 4 - Níveis de aflatoxina B <sub>1</sub> (µg kg <sup>-1</sup> ) irradiadas em acelerador de elétrons com doses de 0, 2,5, 5,0 10 e 20 kGy.....	37

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
FIGURA 1 - Estrutura química das aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub> .....	12
FIGURA 2 - Precursores e metabólitos terminais na biossíntese das aflatoxinas.....	17
FIGURA 3 - Placa de petri contendo resíduo de ágar coco triturado.....	30
FIGURA 4 - Copo coletor contendo resíduo de ágar coco triturado.....	30
FIGURA 5 - Fonte de <sup>60</sup> Co Gammacell 220 (A.E.C. Ltda.).....	31
FIGURA 6 - Acelerador Industrial de Elétrons tipo Dynamitron, da Radiation Dynamics Inc.....	32
FIGURA 7 - Aplicação das amostras em Cromatofolha Alumínio Sílica Gel 60.....	33
FIGURA 8 - Cromatografia em Camada Delgada.....	33
FIGURA 9 - Fotodensitômetro Shimadzu CS 9000.....	34
FIGURA 10 - Quantidade média de aflatoxina B <sub>1</sub> (µg kg <sup>-1</sup> ) presente nas amostras controle (0 kGy) e irradiadas em fonte de <sup>60</sup> Co com doses de 2,5, 5,0, 10 e 20 kGy.....	38
FIGURA 11 - Quantidade média de aflatoxina B <sub>1</sub> (µg kg <sup>-1</sup> ) presente nas amostras controle (0 kGy) e irradiadas em acelerador de elétrons com doses de 2,5, 5,0, 10 e 20 kGy.....	39
FIGURA 12 - Valores de aflatoxina B <sub>1</sub> (µg kg <sup>-1</sup> ) obtidos na quantificação das amostras processadas em fonte de <sup>60</sup> Co, com doses de 0, 2,5, 5,0, 10 e 20 kGy.....	40
FIGURA 13 - Valores de aflatoxina B <sub>1</sub> (µg kg <sup>-1</sup> ) obtidos na quantificação das amostras processadas com feixes de elétrons, com doses de 0, 2,5, 5,0, 10 e 20 kGy.....	40
FIGURA 14 - Imagens microscópicas das alterações fúngicas após a aplicação da dose de 2,5 kGy (esquerda: <sup>60</sup> Co; direita: feixes de elétrons).....	43
FIGURA 15 - Imagens microscópicas das hifas e micélio após a irradiação (superior: 5,0 kGy <sup>60</sup> Co e feixes de elétrons; inferior: 10 kGy, <sup>60</sup> Co e feixes de elétrons).....	44

FIGURA 16 - Imagens microscópicas das alterações causadas após a irradiação com 20 kGy (superior:  $^{60}\text{Co}$  e inferior: feixes de elétrons).....45

## 1. INTRODUÇÃO

Durante anos os fungos estiveram incluídos no Reino Vegetal e desde 1960 sua classificação passou a ser feita em um Reino a parte, o Reino Fungi. Os fungos são seres eucarióticos unicelulares ou pluricelulares, e seus esporos estão amplamente distribuídos no solo, plantas, matéria orgânica em decomposição, água, ar e poeira, portanto, produtos, de origem animal e vegetal, não processados podem ser contaminados por diversas espécies de fungos (ERDOGAN, 2004; FILTENBORG, 1996; MILLER, 1995; PRADO, 2002; PRADO *et al.*, 2008; TRABULSI *et al.*, 1999).

Diversos fungos filamentosos podem produzir substâncias tóxicas, denominadas micotoxinas, frequentemente encontradas em alimentos e produtos agrícolas. Os fungos micotoxigênicos relacionados à cadeia alimentar pertencem a três gêneros principais: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. As micotoxinas são substâncias de massas molares baixas produzidas na fase log (exponencial) de crescimento, e são classificadas como metabolismo secundário, não apresentando nenhuma função no metabolismo normal envolvendo o desenvolvimento dos fungos.

Existem mais de 400 micotoxinas descritas na literatura, sendo as mais comuns as aflatoxinas (AF), ocratoxina A, fumonisina, desoxinivalenol, patulina, toxina T-2 e zearalenona (ZHENG *et al.*, 2006). As micotoxinas são frequentemente encontradas em alimentos de diversas partes do mundo, principalmente nas zonas tropicais e subtropicais, onde as condições climáticas são favoráveis à produção dessas micotoxinas, sendo consideradas como um dos mais perigosos contaminantes de produtos alimentícios, utilizados tanto na alimentação humana como animal (ABDULKADAR *et al.*, 2004; AZIZ *et al.*, 1998; RODRIGUEZ-AMAYA e SABINO, 2002). Os seres humanos podem ser expostos à aflatoxinas de duas maneiras, uma direta e a outra indireta. A forma direta ocorre por meio da ingestão de alimentos de origem vegetal contaminados, e a forma indireta ocorre por meio da ingestão de produtos de origem animal contaminados. Sabe-se que para ocorrer a contaminação por micotoxinas, é

necessário o crescimento prévio de fungos, no entanto, a contaminação por fungos não significa a presença de micotoxinas. É necessário que exista um potencial para a sua produção (CAST, 2003; SWEENEY e DOBSON, 1998).

A biossíntese de aflatoxinas tem muitos meios de regulação. A utilização da genética e ferramentas das ciências genômicas ao longo da última década (BHATNAGAR *et al.*, 2008) tem expandido o conhecimento de máquinas regulatórias, mostrando que muitos fatores ambientais controlam a biossíntese de aflatoxinas, incluindo o desenvolvimento, a luz (CALVO *et al.*, 2002), fonte de carbono, temperatura e pH (O'BRIAN *et al.*, 2007; PRICE *et al.*, 2005).

Existem quatro aflatoxinas principais, denominadas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (FIGURA 1). As letras, "B" e "G", se referem à cor de sua fluorescência sob luz ultravioleta. As aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> apresentam coloração azul (Blue) sob luz ultravioleta e as aflatoxinas G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> emitem coloração verde (Green) sob luz ultravioleta. Os números, "1" e "2", indicam a distância de migração relativa em placa de Cromatografia de Camada Delgada.

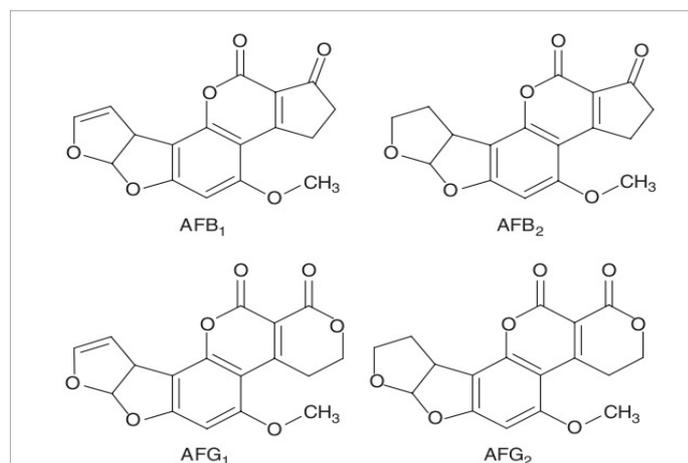


FIGURA 1 - Estrutura química das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (COPPOCK e CHRISTIAN, 2007).

Existem outras aflatoxinas de menor importância, mas a aflatoxina B<sub>1</sub> é o hepatocarcinógeno natural mais potente em mamíferos, sendo classificado no Grupo 1 (provável carcinógeno) pela “*International Agency of Research on Cancer*” (CAST, 2003; IARC, 1993; PRADO *et al.*, 2008; SQUIRE, 1981). A aflatoxina é resistente a muitos agentes químicos e físicos, resistindo por mais de uma hora em autoclave e a meios ácidos ou alcalinos de esterilização (van DYCK *et al.*, 1982). De acordo com a Instrução Normativa nº. 7, de 06 de junho de 1997, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) determina que todos os resíduos gerados em laboratórios biológicos devem ser autoclavados a fim de ser descontaminados. Em virtude da estabilidade das aflatoxinas ao calor, elas são degradadas a uma temperatura superior à obtida na autoclave (120 °C), fazendo-se necessário o uso de outra fonte para a degradação dessas toxinas (TABELA 1).

TABELA 1 - Propriedades químicas das aflatoxinas.

<b>Aflatoxina</b>	<b>Fórmula molecular</b>	<b>Massa molar</b>	<b>Ponto de fusão (°C)</b>
B <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312	268-269
B <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314	286-289
G <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	244-246
G <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	237-240

Fonte: BUTTLER, 1974.

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- Avaliar as diferentes doses de radiação na degradação de aflatoxinas produzidas por *Aspergillus flavus* inoculado em meio de cultura ágar coco;
- Comparar os efeitos dos feixes de elétrons e fonte de  $^{60}\text{Co}$  nos resíduos de aflatoxinas produzidos em laboratório;
- Avaliar os efeitos da radiação gama e feixes de elétrons na estrutura morfológica do *Aspergillus flavus* em microscópio eletrônico de varredura.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Fungos produtores de aflatoxinas

As aflatoxinas (AF) foram descobertas após um surto de intoxicação alimentar, que levou ao óbito mais de cem mil perus, após consumirem ração contaminada proveniente do Brasil e da África. Análises revelaram que o fungo *Aspergillus flavus* foi o responsável pela produção de compostos fluorescentes, denominados de aflatoxina (RUSTOM, 1997; SARGEANT *et al.*, 1961; ZAIKA e BUCHANAN, 1987).

As aflatoxinas são as micotoxinas mais importantes, sendo produzidas por quatro espécies de fungos do gênero *Aspergillus*. Essas espécies são *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius* e *Aspergillus pseudotamarii*. Somente o *A. flavus* e o *A. parasiticus* tem importância econômica, devido à grande capacidade de se desenvolverem em áreas de temperaturas altas e umidade baixa e contaminar diversos tipos de alimento, apresentando afinidade por grãos e sementes oleaginosas, sendo o amendoim, milho e algodão os produtos de maior importância (CAST, 2003; ICMSF, 1996; ITO *et al.*, 2001; KURTZMAN *et al.*, 1987; PITT, 2000).

Segundo Pitt (1993) o *A. flavus* tem potencial para produzir aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. Geralmente, as aflatoxinas G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> não são produzidas por esta espécie, embora alguns relatos mencionasse a produção de aflatoxinas G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> por isolados identificados como *A. flavus* (MPHANDE *et al.*, 2004; TAKAHASHI *et al.*, 2004; VAAMONDE *et al.*, 1995). As espécies de *A. flavus* podem ser divididas em grupos S e L. O grupo S produz numerosos esclerócios pequenos (< 400 µm de diâmetro) e grandes quantidades de aflatoxinas, e o grupo L produz menos esclerócios, porém são maiores (> 400 µm de diâmetro) e com menos aflatoxinas. Os esclerócios são aglomerados de hifas, pigmentados, que resistem a condições ambientais desfavoráveis sendo capazes de permanecerem dormentes por um período de tempo longo.

### 3.2 Condições ambientais reguladoras da biossíntese das aflatoxinas

Muitas condições ambientais interferem na biossíntese das aflatoxinas, como a luz, temperatura, atividade de água, umidade, pH, fonte de nitrogênio, fonte de carbono e metais (CALVO *et al.*, 2004; LUCHESE e HARRIGAN, 1993; PRICE *et al.*, 2005). A compreensão de como esses fatores impactam sobre a biossíntese das aflatoxinas é crítica, pois ela é importante na determinação do papel da formação das aflatoxinas. Infelizmente, as redes reguladoras envolvidas em sensoriamento e transmissão de estímulos ambientais e nutricionais não são bem compreendidas. Price *et al.* (2005) analisaram o efeito de quatro condições ambientais específicas e observaram que a temperatura tem o maior efeito na biossíntese das aflatoxinas, seguido pelo pH, fonte de nitrogênio e fonte de carbono. Schmidt-Heydt *et al.* (2008) examinaram a temperatura e atividade de água em relação ao crescimento no metabolismo secundário de várias espécies fúngicas, incluindo *A. parasiticus*, e observaram que as condições de estresse intermediários ao organismo foram mais favoráveis para a produção de micotoxinas.

### 3.3 Biossíntese das aflatoxinas

Muitos fatores ambientais controlam a biossíntese das aflatoxinas (FIGURA 2), incluindo fonte de carbono, temperatura e pH (GEORGIANNA e PAYNE, 2009). A biossíntese das aflatoxinas foi alvo de muitos artigos e revisões bibliográficas, tendo sido praticamente entendida (BHATNAGAR *et al.*, 2003; SWEENEY e DUBSON, 1998; SWEENEY e DUBSON, 1999; YU *et al.*, 2002). Primeiramente o acetato e o malonil CoA são convertidos em uma unidade de hexanoil CoA por um ácido graxo sintetase, sendo transformado em ácido norsolorínico por uma poliketídeo sintetase. O ácido norsolorínico é o primeiro precursor estável na biossíntese das aflatoxinas. O poliketídeo forma Versicolorina B, após sofrer aproximadamente 12 a 17 conversões enzimáticas. Segue-se então uma rota com a formação de Versicolorina A, dimetilesterigmatocistina, esterigmatocistina (ST), O-metilesterigmatocistina (OMST), aflatoxina B<sub>1</sub> e aflatoxina G<sub>1</sub>. O outro caminho envolve a conversão de

Versicolorina B, dihidrodimetilesterigmatocistina, dihidroesterigmatocistina, dihidro-O-metilesterigmatocistina, aflatoxina B<sub>2</sub> e aflatoxina G<sub>2</sub>.

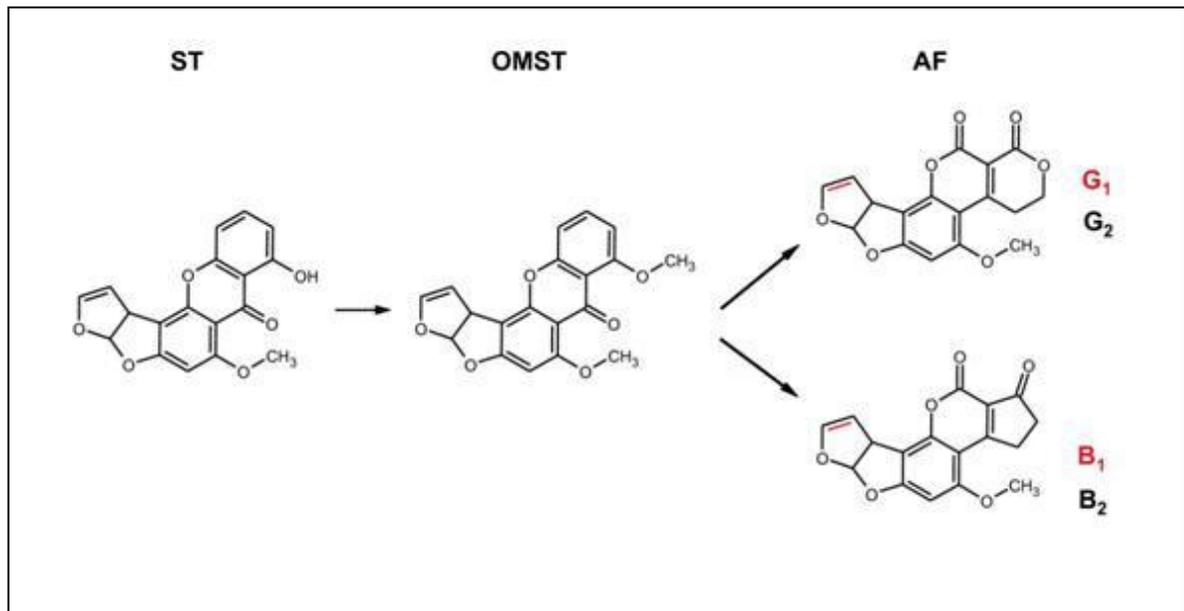


FIGURA 2 - Precursores e metabólitos terminais na biossíntese das aflatoxinas.

Fonte: Carbone *et al.*, 2007.

### 3.4 Fatores que afetam a sobrevivência, crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus*

A produção de aflatoxinas é resultado da interação entre fungo, hospedeiro e meio ambiente, e a interação apropriada desses fatores determina o grau de colonização, o tipo e a quantidade de micotoxinas que serão produzidas (GOURAMA e BULLERMAN, 1995; PITT, 2000).

O crescimento de fungos aflatoxigênicos é influenciado, entre outros fatores, pela atividade de água, temperatura, grãos quebrados, aeração, inóculo fúngico, interações microbianas e presença de insetos. O controle de umidade é

fator de grande importância para evitar o acúmulo de toxinas em grãos armazenados e sementes oleaginosas. Se o produto tiver baixa atividade de água e for armazenado em condições de baixa umidade relativa, provavelmente não ocorrerá desenvolvimento de fungos e conseqüentemente de toxinas (CAST, 2003). Altos níveis de contaminação estão associados com o crescimento de *Aspergillus* após a colheita e armazenamento inadequado (BHAT, 1988).

### **3.5 Luz como mediador da biossíntese das aflatoxinas**

Dentre as diversas condições ambientais que modulam a biossíntese das aflatoxinas, o efeito da luz está se tornando um dos mais bem descritos na literatura. Calvo *et al.* (2004) mostraram que a luz afeta a transcrição de vários genes envolvidos no desenvolvimento de esclerócios de *A. flavus* (CALVO *et al.*, 2004). A produção de ácido ciclopiazônico e aflatoxina, pelo *Aspergillus flavus*, é regulada pelo *veA*, gene necessário para a formação do esclerócito (KATO *et al.*, 2003). Purschwitz *et al.* (2008) descobriram que a luz vermelha e a luz branca inibem a biossíntese de micotoxinas, enquanto a luz azul tem um caráter estimulante.

### **3.6 Fonte de carbono**

Muitos autores relatam que a fonte de carbono tem papel determinante na biossíntese das aflatoxinas (ABDOLLAHI e BUCHANAN, 1981a, 1981b; BUCHANAN, 1984; DAVIS e DIENER, 1968; MATELE e ADY, 1965; WISEMAN e BUCHANAN, 1987), porém, não está claro se a fonte de carbono regula diretamente a biossíntese das aflatoxinas ou se modula sua síntese geral através do metabolismo. Ao contrário da produção da maioria dos metabólitos secundários que são reprimidos por açúcares simples, a produção de aflatoxinas é estimulada por glicose, tais como a frutose (DAVIS e DIENER, 1968). Um elevado grau de glicose tem sido correlacionado com a produção de aflatoxinas (APPLEBAUM e BUCHANAN, 1979; SHIH e MARTH, 1974).

Em uma tentativa de compreender melhor a fonte de carbono para a biossíntese das aflatoxinas, alguns estudos relatam as taxas de incorporação de

acetato marcado nas aflatoxinas em relação à glicose (HSIEH e MATELES, 1970). Curiosamente, verificou-se o acetato preferencialmente incorporado às aflatoxinas, mesmo durante condições em que a concentração de glicose foi quatro vezes superior ao acetato. Este resultado sugere que as aflatoxinas são sintetizadas a partir da glicose extra mitocondrial derivada da acetil coenzima A (HSIEH e MATELES, 1970; SHANTHA e MURTHY, 1981).

### 3.7 Fonte de nitrogênio

As fontes de nitrogênio têm sido amplamente estudadas como um fator importante na biossíntese das aflatoxinas (LUCHESE e HARRIGAN, 1993; PAYNE e BROWN, 1998). Várias fontes de nitrogênio foram analisadas e pode-se observar que as fontes orgânicas de nitrogênio são superiores para a biossíntese de aflatoxinas (DAVIS *et al.*, 1967) e o nitrato inibe a produção de aflatoxinas (KACHHOLZ e DEMAIN, 1983). No entanto, as fontes de nitrogênio agem de forma diferente na produção de esterigmatocistina em *Aspergillus nidulans*, com o nitrato estimulando a sua produção e a amônia causando a inibição (FENG e LEONARD, 1998).

Em comparação com diferentes populações de *Aspergillus flavus*, proveniente da América do Norte e do Oeste da África, a regulação da biossíntese das aflatoxinas por nitrato apresenta-se de forma diferente. As cepas da América do Norte sofrem menos interferência do nitrato em relação às cepas do oeste africano. Isto ocorre, provavelmente, devido a uma proteína adicional, AreA, presente nas cepas americanas (EHRlich e COTTY, 2002).

### 3.8 Influência da temperatura na produção de aflatoxinas

A temperatura ótima para a produção de aflatoxinas é entre 28 °C e 30 °C, com sua produção diminuindo com temperaturas próximas de 37 °C. As aflatoxinas são conhecidas por serem compostos estáveis ao calor (MANN *et al.*, 1967; YAZDANPANA *et al.*, 2005). Em estudo realizado por Schindler *et al.* (1967), a produção máxima de aflatoxinas ocorre a 24 °C, não sendo produzida

em temperatura inferior a 18 °C ou superior a 35 °C. Diener e Davis (1967) relataram a produção de aflatoxinas em amendoim a 40 °C, no entanto, Schroeder e Hein (1967) demonstraram que as aflatoxinas não são produzidas em quantidades significantes a temperaturas acima de 35 °C em algodão, amendoim e arroz, sugerindo que as aflatoxinas não sofreram interferência do substrato. Em um trabalho realizado em meios sólidos e líquidos, a produção de aflatoxinas diminuiu linearmente com o aumento ou diminuição da temperatura em relação à temperatura ótima para a biossíntese (28 °C - 30 °C) (O'BRIAN *et al.*, 2007).

### **3.9 Atividade de água e pH**

O nível de produção de aflatoxinas sofre grande influência da atividade de água (Aa) e do pH (PITT e HOCKING, 1997; PITT, 1987). A atividade de água ótima para a produção de aflatoxinas é de aproximadamente 0,99, com o mínimo em torno de 0,80-0,83 (PITT e MISCAMBLE, 1995). As aflatoxinas são produzidas em grande quantidade com altas atividades de água (0,98 - 0,99) e sofrem uma drástica redução com atividades de água próximas de 0,85.

O *Aspergillus flavus* e o *A. parasiticus* podem crescer com pH variando de 2,0 até 10, e a produção de aflatoxinas por *A. parasiticus* se dá em pH entre 3,0 e 8,0, com pH ótimo próximo de 6,0 (ICMSF, 1996).

### **3.10 Métodos de pré-tratamento das amostras**

A maioria dos métodos utilizados para a determinação de micotoxinas depende de uma correta extração e um bom método de lavagem, exceto o método de ELISA, que não necessita a lavagem (CHU, 1992). Estes procedimentos são muito importantes para a realização dos protocolos, assim como são os que consomem mais tempo, e afetarão a escolha final do procedimento de detecção. O método de extração utilizado para remover as micotoxinas da matriz biológica depende da estrutura da toxina. Metabólitos polares, como as fumonisinas, requerem a presença de água e toxinas

hidrofóbicas como as aflatoxinas dependem de solventes orgânicos (SHEPHARD, 1998; HOLCOMB *et al.*, 1992; AOAC, 1997). A escolha do solvente depende do substrato em que será realizada a extração (WILKES e SUTHERLAND, 1998). O uso de compostos clorados utilizados para a extração está sendo gradualmente reduzido devido aos danos ambientais. A etapa de lavagem usada nos protocolos é o processo mais importante, com a pureza da amostra afetando a sensibilidade dos resultados (AOAC, 1997).

### **3.10.1 Extração líquido-líquido**

A extração líquido-líquido vem ganhando muito interesse dentre os métodos de pré-tratamento para aflatoxinas (FACCHIN e PASQUINI, 1998). Isto ocorre, provavelmente, devido à facilidade de operação em relação às demais técnicas e a robustez do equipamento. Esta técnica envolve a exploração das diferentes solubilidades da toxina na fase aquosa e em fase orgânica imiscível, para extrair o composto em um solvente deixando o resto da matriz no outro. Deste modo, solventes como o hexano e ciclohexano são usados para remover compostos apolares, como por exemplo, lipídios e colesterol. O procedimento é efetivo para diversas toxinas e funciona bem em pequenas escalas de preparação (BAUER e GAREIS, 1987).

### **3.10.2 Extração com fluido supercrítico**

A extração com fluido supercrítico utiliza o CO<sub>2</sub> para extrair o composto desejado de uma matriz. Isso funciona bem devido ao poder de diluição alto, no entanto, essa técnica não é muito utilizada para análises de rotina devido ao custo alto e a necessidade de equipamentos específicos (YOUNG e GAMES, 1992; HOLCOMB *et al.*, 1996).

## **3.11 Métodos de separação**

Existem diversos métodos de cromatografia disponíveis para a análise de micotoxinas, como por exemplo, a Cromatografia em Camada Delgada (CCD),

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia Gasosa (CG) e o método imunoenzimático ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) (SHEPHARD, 1998; VALENTA, 1998).

### **3.11.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) é a técnica mais popular na determinação de micotoxinas. Seu custo baixo e simplicidade são as principais vantagens deste processo analítico. A separação significativa das micotoxinas a partir de compostos não desejados confere especificidade e sensibilidade a essa técnica. A principal desvantagem é relacionada ao processo de aplicação das amostras nas placas (COKER, 1984).

### **3.11.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Análises modernas de micotoxinas dependem do uso de vários adsorventes no cromatógrafo líquido de alta eficiência, dependendo da estrutura física ou química das micotoxinas. Colunas de fase reversa, como por exemplo, as colunas C-18, são usadas para a separação e purificação de toxinas, dependendo de sua polaridade (GIACOMELLI *et al.*, 1998; REINHARD e ZIMMERLI, 1999; SHEPHARD *et al.*, 1990).

### **3.11.3 Cromatografia Gasosa (CG)**

O Cromatógrafo Gasoso (CG) é usado na identificação e quantificação de micotoxinas em amostras de alimentos, e muitos protocolos foram desenvolvidos para esses produtos. Normalmente este sistema está associado com espectrômetro de massa. Muitas micotoxinas não são voláteis, necessitando de um tratamento prévio antes da utilização do CG, conhecido como derivatização, que consiste em transformar um composto químico em um produto de estrutura química similar, chamado de derivativo (SCOTT, 1995).

### **3.11.4 Método Imunoenzimático (ELISA)**

O teste ELISA está se tornando muito popular devido ao custo baixo e facilidade de aplicação (MORGAN, 1989; GORYACHEVA *et al.*, 2007). Os kits de ELISA disponíveis no comércio para a detecção de micotoxinas são normalmente baseados na ligação entre a toxina e o anticorpo (FREMY e CHU, 1989).

### 3.12 Legislação

No Brasil estão em vigor a Portaria n.º 183, de 21 de março de 1996, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Resolução n.º 274, de 15 de outubro de 2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que estabelece os limites permissíveis de aflatoxinas presente em leite, milho e amendoim para o consumo humano, e para alimentos destinados ao consumo animal está em vigor a portaria MA/SNAD/SFA n.º 7, de 09 de novembro de 1988 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

#### 3.12.1 Consumo Humano

##### → Resolução n.º 274 de 15 de outubro de 2002 (ANVISA):

Estabelece os limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, milho e amendoim (TABELA 2).

TABELA 2 - Limites aceitáveis de aflatoxinas presente no leite, milho e amendoim.

Alimento	Aflatoxinas	Limite
Leite, leite fluído e leite em pó	M <sub>1</sub>	0,5 µg L <sup>-1</sup> 5,0 µg kg <sup>-1</sup>
Derivados de milho	B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> + G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub>	20 µg kg <sup>-1</sup>
Derivados de amendoim	B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> + G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub>	20 µg kg <sup>-1</sup>

Fonte: RDC n.º. 274/02.

→ **Portaria n.º 183 de 21 de março de 1996 (MAPA):**

Estabelece o limite máximo de 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para a somatória das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>.

### 3.12.2 Alimentos para consumo animal

→ **Instrução Normativa n.º 08 de 18 de maio de 1988 (MAPA):**

O parágrafo segundo dessa instrução normativa determina os padrões de identidade e qualidade para o farelo de polpa crítica estabelecidos pela portaria SEFIS n.º 7 de 09 de novembro de 1988 com o limite máximo de 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para as aflatoxinas.

### 3.13 Irradiação

A irradiação é um fenômeno físico onde ocorre a emissão e propagação de energia através do espaço ou de uma matéria (RADOMYSKI *et al.*, 1994). O termo radiação é utilizado para designar processos físicos de emissão e propagação de energia, seja por intermédio de fenômenos ondulatórios, seja por meio de partículas dotadas de energia cinética (AQUINO, 2003; USDA, 1985; FDA, 1985; FDA, 1994; FDA, 1997).

A irradiação é o processo de aplicação desta energia a um material, com a finalidade de esterilizá-los através da destruição de microrganismos, parasitas, insetos e outras pragas. O tipo de irradiação usada é a chamada ionizante, pois ela produz partículas eletricamente modificadas (íons). A grande diferença entre os raios gama provenientes de uma fonte de <sup>60</sup>Co e os elétrons oriundos de um acelerador industrial, é o seu poder de penetração. A radiação gama tem um poder de penetração alto, no entanto, é menor a taxa de dose e o feixe de elétrons gerado por um acelerador tem um poder de penetração menor, mas taxa de dose de radiação alta (DIEHL, 1995). A unidade utilizada denomina-se Gray (Gy), onde 1,0 Gy é equivalente à energia de 1,0 joule absorvido por 1,0 kg de material (SATIN, 1993). A irradiação de aflatoxina vem sendo alvo de muitos estudos devido a frequente incidência desta micotoxina em produtos

agrícolas, causando um impacto negativo na economia (RUSTOM, 1997; AZIZ *et al.*, 2007). Somente nos Estados Unidos da América a perda econômica devido às micotoxinas está em torno de 932 milhões de dólares, sendo as aflatoxinas os maiores causadores desta perda (CAST, 2003).

As radiações ionizantes podem modificar características físicas, químicas e propriedades biológicas dos materiais irradiados. Atualmente, as principais aplicações industriais da radiação são esterilização dos produtos de saúde, incluindo produtos farmacêuticos, irradiação de alimentos e produtos agrícolas (para vários objetivos finais, tais como desinfestação, aumento da vida de prateleira, inibição do brotamento, controle de pragas e esterilização) e modificação de materiais. Um impulso significativo foi dado à indústria de irradiação com o advento dos reatores nucleares, que têm a capacidade de produzir radioisótopos. Emissores de raios gama, como o  $^{60}\text{Co}$ , se tornou popular para aplicações médicas e industriais. Muitos irradiadores de raios gama foram construídos e estima-se que cerca de 200 estão em funcionamento atualmente nos Estados membros da Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA). Nos últimos anos, o uso de aceleradores de elétrons como uma fonte de radiação (e por vezes equipados com conversor de raios X) está aumentando. No entanto, irradiadores gama são difíceis de substituir, especialmente para produtos não uniformes e de alta densidade. O  $^{60}\text{Co}$  é utilizado quase exclusivamente como fonte de radiação gama para uso industrial, principalmente por causa de seu fácil método de produção e a sua não solubilidade em água (IAEA, 2005).

A irradiação tem diversas vantagens em relação a outros métodos de tratamentos, como por exemplo, esterilização de produtos de saúde utilizando-se óxido de etileno (EtO) e calor. No caso da esterilização por raios gama, tais vantagens incluem: os produtos tratados podem ser utilizados imediatamente; o aumento da temperatura do produto é mínimo durante o processo; elevada penetrabilidade (o produto pode ser processado na sua embalagem final).

### 3.13.1 Fontes de irradiação

De acordo com o “*Codex Alimentarius General Standard*”, existem três tipos principais de fontes utilizadas em irradiadores para o tratamento de produtos alimentícios (FAO, 1984):

1. Radiação gama proveniente de radionuclídeos como o  $^{60}\text{Co}$  e o  $^{137}\text{Cs}$ ;
2. Fontes de feixes de elétrons, com energia de até 10 MeV;
3. Fontes de raios X, com energia de até 5,0 MeV.

Devido à penetrabilidade alta, os raios gama e raios X podem ser utilizados em produtos de grande espessura e/ou densidade alta. Para as situações em que apenas um tratamento superficial é necessário, pode-se utilizar acelerador de elétrons devido à penetrabilidade baixa e taxa de dose elevada, podendo processar uma grande quantidade de produtos em um período de tempo curto, diminuindo o custo por unidade de produto.

### 3.13.2 Raios gama

Os raios gama utilizados no processamento de alimentos são obtidos a partir de grandes fontes de  $^{60}\text{Co}$ . Este tipo de radiação é essencialmente monoenergéticos (o  $^{60}\text{Co}$  emite simultaneamente dois fótons por desintegração com energias de 1,17 e 1,33 MeV). Utilizando técnicas analíticas, tais como o ponto de kernel ou Método de Monte Carlo, é possível calcular a dose de radiação distribuída nos produtos alimentícios, mesmo quando a geometria das fontes for muito complicada. A profundidade de dose resultando na distribuição de produtos alimentícios normalmente se assemelha a uma curva exponencial. A irradiação dos dois lados do produto é frequentemente utilizada para aumentar a uniformidade de dose (OLIVEIRA, 2000; SAYLOR, 2000).

### 3.13.3 Feixes de elétrons

Os elétrons emitidos por aceleradores têm um estreito limite de energia espectral (geralmente inferior a aproximadamente 10 % do valor da energia nominal). A energia dos elétrons que atinge o produto é controlada por ímãs. O intervalo de um elétron em um meio é limitado (ao contrário do que acontece com os fótons) e está estreitamente relacionada com a sua energia. Se a carga a ser tratada for muito espessa, apenas um tratamento superficial será possível. Por exemplo, uma energia de 3,0 MeV só pode ser utilizado para tratamentos de superfície (HAYASHI, 1998), uma vez que penetram a uma profundidade de apenas cerca de 1,0 cm na água. O limite máximo da energia que pode ser utilizada no tratamento de alimentos é de 10 MeV, para evitar a indução de radioatividade nos alimentos por meio de reações nucleares (FAO, 1984; WHO, 1981; MILLER, 1987; McKEOWN, 1998).

### 3.13.4 Raios X

Os princípios dos irradiadores de raios X são essencialmente os mesmos que os aceleradores de elétrons (AIKAWA, 2000; CLELAND e PAGEAU, 1987). Os raios X são emitidos quando elétrons acelerados por alta voltagem são lançados contra átomos e sofrem frenagem, perdendo energia. O limite máximo da energia para os irradiadores de raios X é de 5,0 MeV, para evitar qualquer indução de radioatividade nos alimentos irradiados (FAO, 1984; McLAUGHLIN *et al.*, 1989).

### 3.14 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é uma ferramenta muito importante para observar os aspectos morfológicos dos fungos, permitindo a obtenção de resultados mais seguros e precisos. As amostras biológicas têm que ser preservadas por desidratação para serem observadas em microscópios eletrônicos, pois, eles operam sob alto vácuo e as amostras podem não resistir à retirada de água pelo sistema de vácuo (MAY-DE MIO *et al.*, 2006). A secagem por Ponto Crítico, introduzida há mais de 50 anos, é a técnica de desidratação

para materiais biológicos mais utilizada na preparação das amostras. Este procedimento elimina líquidos das amostras, evitando os efeitos de tensão superficial por não permitir que a interface líquido/gás se desenvolva. A passagem do estado líquido para o gasoso no Ponto Crítico ocorre sem essa interface, pois, as densidades do líquido e do gás são iguais nesse ponto (PATHAN *et al.*, 2008).

O microscópio eletrônico de varredura utiliza um feixe de elétrons diretamente na amostra a ser observada, tendo o funcionamento semelhante ao microscópio eletrônico de transmissão (MET), com a diferença que o MET fornece informações da estrutura interna do material a ser observado e o MEV fornece informações da superfície da amostra. Para visualização eficaz de uma amostra no MEV geralmente é necessário que a superfície da amostra seja condutora de eletricidade, portanto, não há dificuldade em estudar amostras de metal limpo, no entanto, materiais não condutores, como cerâmicas, polímeros e materiais biológicos, não estão aptos a serem observados no MEV, sendo comum o revestimento da amostra com uma fina camada de ouro ou carbono (~10 nm) por pulverização (GOODHEW *et al.*, 2001).

## 4. MATERIAIS E METODOS

### 4.1 Cepa

Foi utilizada cepa de *Aspergillus flavus*, 250 GM, produtora de aflatoxina B<sub>1</sub>, cedida pelo Laboratório de Micotoxinas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

### 4.2 Preparo do meio de cultura

O Meio de Cultura Ágar Coco (LIN e DIANESE, 1976) foi preparado com 115 mL de leite de coco, 10 g de ágar bacteriológico e 500 mL de água destilada. O meio foi autoclavado por 20 minutos a uma temperatura de 120 °C e pressão de 1,0 atmosfera. Após esse procedimento o meio foi distribuído em placas de petri.

### 4.3 Preparo das amostras

As cepas de *Aspergillus flavus* foram isoladas em ágar batata dextrose por 10 dias e posteriormente inoculadas em ágar coco sendo incubadas em estufa D.B.O. a uma temperatura de 25 °C durante 14 dias. Após o crescimento das colônias, os conteúdos das placas de Petri contendo *Aspergillus flavus* foram triturados até adquirirem um aspecto pastoso, com o intuito de produzir um resíduo laboratorial homogêneo. Após essa etapa as amostras destinadas ao acelerador de elétrons foram separadas em dez lotes, de "A" até "J", contendo 25 g do resíduo. Cada lote foi homogeneizado separadamente e fracionado em cinco subamostras, correspondendo às doses de 0 kGy, 2,5 kGy, 5,0 kGy, 10 kGy e 20 kGy. As amostras destinadas à fonte de <sup>60</sup>Co Gammacell foram separadas em 10 lotes, de 1 até 10 e foram preparadas conforme descrito anteriormente. As subamostras destinadas ao acelerador de elétrons foram acondicionadas em placas de petri, cobrindo toda a superfície das placas, com uma espessura de 3,0 mm (FIGURA 3), sendo mantidas a uma temperatura de -28 °C, e as amostras

destinadas à fonte de  $^{60}\text{Co}$  foram acondicionadas em copos coletores com tampa (FIGURA 4) e foram armazenadas à  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

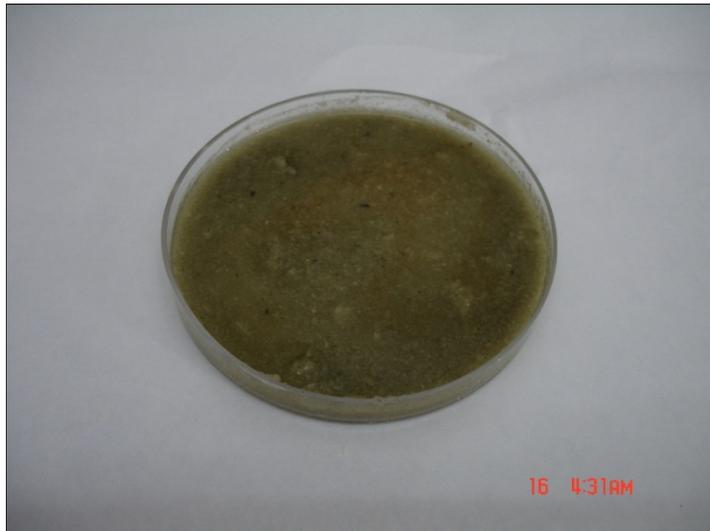


FIGURA 3 - Placa de petri contendo resíduo de ágar coco triturado.



FIGURA 4 - Copo coletor contendo resíduo de ágar coco triturado.

#### 4.4 Irradiação das amostras

Dois lotes de dez amostras foram irradiados, com doses de 2,5 kGy, 5,0 kGy, 10 kGy e 20 kGy em fonte de  $^{60}\text{Co}$ , Gammacell 220 (A.E.C. Ltda.) (FIGURA 5) com taxa de dose de  $2,14 \text{ kGy h}^{-1}$ , e em um Acelerador Industrial de Elétrons tipo Dynamitron, da Radiation Dynamics Inc. (Modelo: DC1500/25-JOB188; Energia: 1,5 MeV; Corrente de feixes: 0,3 – 25 mA; Varredura: 120 cm (48"); Potência: 150 kW; Potência do feixe: até 37,5 kW) (FIGURA 6), com as mesmas doses descritas acima, taxa de dose de  $11,2 \text{ kGy s}^{-1}$ , ambos equipamentos estão localizados no Centro de Tecnologia das Radiações (IPEN-CNEN/SP). Dosímetros Red Perpex-batch HL (640 nm) foram utilizados.



FIGURA 5 - Fonte de  $^{60}\text{Co}$  Gammacell 220 (A.E.C. Ltda.).



FIGURA 6 - Acelerador Industrial de Elétrons tipo Dynamitron, da Radiation Dynamics Inc.

#### 4.5 Extração de aflatoxinas

Para a extração das aflatoxinas, todo o conteúdo das placas e copos foi retirado e colocado em Erlenmeyers. Para cada 5,0 g de amostra foi adicionado 15 mL de clorofórmio. Os frascos foram agitados por 30 minutos e o extrato foi filtrado em terra diatomácea para a diminuição dos interferentes, e o produto obtido foi evaporado em banho maria para a realização da Cromatografia em Camada Delgada (SOARES e RODRIGUEZ-AMAYA, 1989).

#### 4.6 Cromatografia em Camada Delgada

Os resíduos foram descongelados e ressuspensos em 500  $\mu\text{L}$  e alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  foram aplicadas a 1,0 cm da base inferior da cromatofolha alumínio sílica gel 60G (Merck<sup>®</sup>) (FIGURA 7), previamente ativadas em estufa por duas horas a uma temperatura de 50 °C. Os padrões de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e

G<sub>2</sub> foram aplicados na quantidade de 5,0 µL. O cromatograma foi realizado à temperatura ambiente, em cuba cromatográfica com fase móvel de Clorofórmio e Acetona (9:1 v/v). Após este procedimento a placa foi observada sob luz ultravioleta (365 nm), comparando-se as manchas que surgiram entre o extrato e os padrões para realizar a identificação (FIGURA 8).



FIGURA 7 - Aplicação das amostras em Cromatofolha Alumínio Sílica Gel 60.



FIGURA 8 - Cromatografia em Camada Delgada.

#### 4.7 Quantificação das aflatoxinas

A quantificação das aflatoxinas foi realizada no Laboratório de Farmacologia do Instituto Biológico de São Paulo em um Fotodensitômetro Shimadzu CS 9000 com lâmpada de xenônio e limite de detecção de  $0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Figura 9).



FIGURA 9 - Fotodensitômetro Shimadzu CS 9000.

#### 4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após a irradiação das amostras, uma fração de aproximadamente  $1,0 \text{ cm}^2$  foi retirada e colocada para fixação no reagente Karnovisk por 48 h. Após esta etapa o material foi lavado três vezes em água destilada sendo de 10 minutos cada lavada. Em seguida o material foi submerso em tetróxido de ósmio por duas horas em geladeira. As amostras foram novamente lavadas em água

destilada conforme descrito anteriormente e em seguida foram desidratadas em álcool, conforme descrito na continuação:

- a) Álcool 70 % (15 min.);
- b) Álcool 80 % (15 min.);
- c) Álcool 90 % (15 min.);
- d) Álcool 95 % (15 min.);
- e) Álcool 100 % (15 min.);
- f) Álcool 100 % (15 min.);
- g) Álcool 100 % (15 min.);
- h) Álcool 100 % (15 min.).\*\*\*

\*\*\*Conservar em geladeira de três a quatro dias.

Após a desidratação foi realizado o Ponto Crítico e a Metalização com ouro e em seguida foi observado em microscópio eletrônico de varredura.

#### **4.9 Análise Estatística**

A análise estatística dos resultados foi realizada aplicando-se a análise de variância ANOVA para a presença de efeitos significativos ( $p < 0,05$ ). Neste caso foi aplicado o teste de Tukey, para determinar as diferenças entre as médias, por intermédio do software *GraphPad Prism 5*.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração média de aflatoxina B<sub>1</sub> em meio de cultura ágar coco foi de 46,17 µg kg<sup>-1</sup> a 0 kGy. Após a irradiação em fonte de <sup>60</sup>Co, com doses de 2,5 kGy, 5,0 kGy, 10 kGy e 20 kGy, os teores de aflatoxina B<sub>1</sub> encontrados estão apresentados na Tabela 3. As concentrações de aflatoxina B<sub>1</sub> irradiadas em acelerador de elétrons podem ser observadas na Tabela 4. Observando as amostras de aflatoxinas pode-se detectar apenas a aflatoxina B<sub>1</sub>. As demais aflatoxinas, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> não foram detectadas.

TABELA 3 – Níveis de aflatoxina B<sub>1</sub> (µg kg<sup>-1</sup>) obtidos na quantificação das amostras irradiadas em fonte de <sup>60</sup>Co com doses de 0, 2,5, 5,0, 10 e 20 kGy.

<b>Amostras</b>	<b>0 kGy</b>	<b>2,5 kGy</b>	<b>5,0 kGy</b>	<b>10 kGy</b>	<b>20 kGy</b>
<b>1</b>	47,86 <sup>a</sup>	36,81 <sup>b</sup>	30,46 <sup>c</sup>	24,09 <sup>d</sup>	16,08 <sup>e</sup>
<b>2</b>	39,52 <sup>a</sup>	34,80 <sup>b</sup>	26,24 <sup>c</sup>	22,62 <sup>d</sup>	18,49 <sup>e</sup>
<b>3</b>	42,18 <sup>a</sup>	32,27 <sup>b</sup>	30,42 <sup>c</sup>	26,27 <sup>d</sup>	14,13 <sup>e</sup>
<b>4</b>	46,88 <sup>a</sup>	37,18 <sup>b</sup>	31,57 <sup>c</sup>	24,57 <sup>d</sup>	12,44 <sup>e</sup>
<b>5</b>	46,36 <sup>a</sup>	33,90 <sup>b</sup>	29,10 <sup>c</sup>	21,63 <sup>d</sup>	14,56 <sup>e</sup>
<b>6</b>	50,19 <sup>a</sup>	35,58 <sup>b</sup>	33,32 <sup>c</sup>	22,00 <sup>d</sup>	14,92 <sup>e</sup>
<b>7</b>	48,63 <sup>a</sup>	38,26 <sup>b</sup>	32,47 <sup>c</sup>	25,45 <sup>d</sup>	14,39 <sup>e</sup>
<b>8</b>	49,58 <sup>a</sup>	39,84 <sup>b</sup>	28,02 <sup>c</sup>	26,86 <sup>d</sup>	13,15 <sup>e</sup>
<b>9</b>	41,50 <sup>a</sup>	34,27 <sup>b</sup>	32,10 <sup>c</sup>	24,39 <sup>d</sup>	16,01 <sup>e</sup>
<b>10</b>	48,99 <sup>a</sup>	37,08 <sup>b</sup>	30,03 <sup>c</sup>	23,64 <sup>d</sup>	13,35 <sup>e</sup>
<b>Média</b>	<b>46,17</b>	<b>36,00</b>	<b>30,37</b>	<b>24,15</b>	<b>14,75</b>
<b>DP*</b>	<b>3,76</b>	<b>2,26</b>	<b>2,16</b>	<b>1,74</b>	<b>1,76</b>

\*Desvio Padrão

<sup>a,b,c,d,e</sup> Letras diferentes diferem significativamente (p < 0,05)

TABELA 4 - Níveis de aflatoxina B<sub>1</sub> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) irradiadas em acelerador de elétrons com doses de 0, 2,5, 5,0 10 e 20 kGy.

<b>Amostras</b>	<b>0 kGy</b>	<b>2,5 kGy</b>	<b>5,0 kGy</b>	<b>10 kGy</b>	<b>20 kGy</b>
<b>1</b>	47,86 <sup>a</sup>	33,45 <sup>b</sup>	28,00 <sup>b</sup>	19,98 <sup>c</sup>	13,87 <sup>d</sup>
<b>2</b>	39,52 <sup>a</sup>	36,28 <sup>b</sup>	28,25 <sup>b</sup>	23,87 <sup>c</sup>	13,69 <sup>d</sup>
<b>3</b>	42,18 <sup>a</sup>	31,98 <sup>b</sup>	31,60 <sup>b</sup>	17,84 <sup>c</sup>	11,56 <sup>d</sup>
<b>4</b>	46,88 <sup>a</sup>	32,52 <sup>b</sup>	28,09 <sup>b</sup>	22,08 <sup>c</sup>	13,13 <sup>d</sup>
<b>5</b>	46,36 <sup>a</sup>	31,19 <sup>b</sup>	30,13 <sup>b</sup>	22,29 <sup>c</sup>	13,01 <sup>d</sup>
<b>6</b>	50,19 <sup>a</sup>	34,40 <sup>b</sup>	29,90 <sup>b</sup>	24,37 <sup>c</sup>	15,51 <sup>d</sup>
<b>7</b>	48,63 <sup>a</sup>	35,29 <sup>b</sup>	32,70 <sup>b</sup>	19,99 <sup>c</sup>	10,51 <sup>d</sup>
<b>8</b>	49,58 <sup>a</sup>	29,96 <sup>b</sup>	29,18 <sup>b</sup>	23,77 <sup>c</sup>	12,11 <sup>d</sup>
<b>9</b>	41,50 <sup>a</sup>	31,93 <sup>b</sup>	30,21 <sup>b</sup>	23,12 <sup>c</sup>	10,02 <sup>d</sup>
<b>10</b>	48,99 <sup>a</sup>	37,58 <sup>b</sup>	33,29 <sup>b</sup>	21,40 <sup>c</sup>	14,52 <sup>d</sup>
<b>Média</b>	<b>46,17</b>	<b>32,35</b>	<b>30,24</b>	<b>21,87</b>	<b>12,79</b>
<b>DP*</b>	<b>3,76</b>	<b>3,15</b>	<b>1,91</b>	<b>2,09</b>	<b>1,74</b>

\*Desvio Padrão

<sup>a,b,c,d</sup> Letras diferentes diferem significativamente ( $p < 0,05$ )

Fixando o nível de significância de 95 %, a análise de variância (ANOVA) demonstrou diferença significativa entre as amostras controle e irradiadas com diferentes doses, tanto para as amostras irradiadas em fonte de <sup>60</sup>Co como em acelerador de elétrons. Apenas entre as amostras de 2,5 kGy e 5,0 kGy, irradiadas no acelerador de elétrons, não foi observado diferença significativa. Entre as amostras irradiadas em fonte de <sup>60</sup>Co e feixes de elétrons apenas as amostras irradiadas com 2,5 kGy apresentaram diferença significativa. A quantidade média de aflatoxina B<sub>1</sub> presente nas amostras controle (0 kGy) foi de 46,17  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Nas amostras de 2,5 kGy, 5,0 kGy, 10 kGy e 20 kGy irradiadas em fonte de <sup>60</sup>Co a quantidade média foi de 36,00  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , 30,37  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , 24,15  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e 14,75  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente (FIGURA 10). Para as amostras processadas com feixes de elétrons as médias foram de 32,35  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , 30,24  $\mu\text{g kg}^{-1}$

$\text{kg}^{-1}$ ,  $21,87 \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $12,79 \mu\text{g kg}^{-1}$ , para as doses de 2,5, 5,0, 10 e 20 kGy (FIGURA 11).

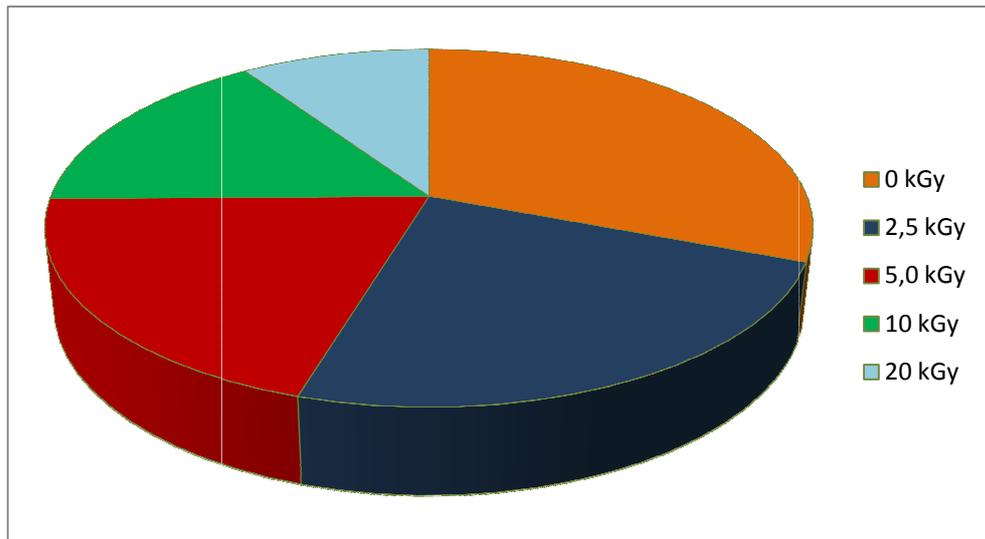


FIGURA 10 - Quantidade média de aflatoxina B<sub>1</sub> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) presente nas amostras controle (0 kGy) e irradiadas em fonte de  $^{60}\text{Co}$  com doses de 2,5, 5,0, 10 e 20 kGy.

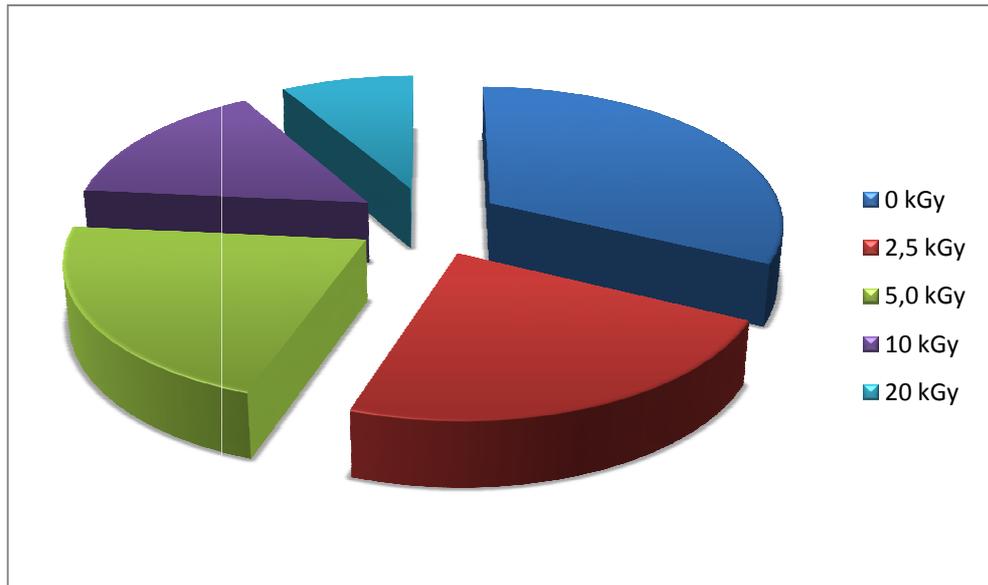


FIGURA 11 - Quantidade média de aflatoxina B<sub>1</sub> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) presente nas amostras controle (0 kGy) e irradiadas em acelerador de elétrons com doses de 2,5, 5,0, 10 e 20 kGy.

Nas amostras irradiadas em fonte de  $^{60}\text{Co}$  com 2,5 kGy pode-se observar uma redução de 22,03 % em relação à amostra não irradiada (controle), e para as amostras irradiadas com doses de 5,0 kGy, 10 kGy e 20 kGy, a redução foi de 34,22 %, 47,69 % e 68,05 %, respectivamente, podendo ser observada na Figura 12. Para as amostras processadas com feixes de elétrons, a redução foi de 29,93 %, 34,50 %, 52,63 % e 72,3 % para as doses de 2,5, 5,0, 10 e 20 kGy, respectivamente (FIGURA 13).

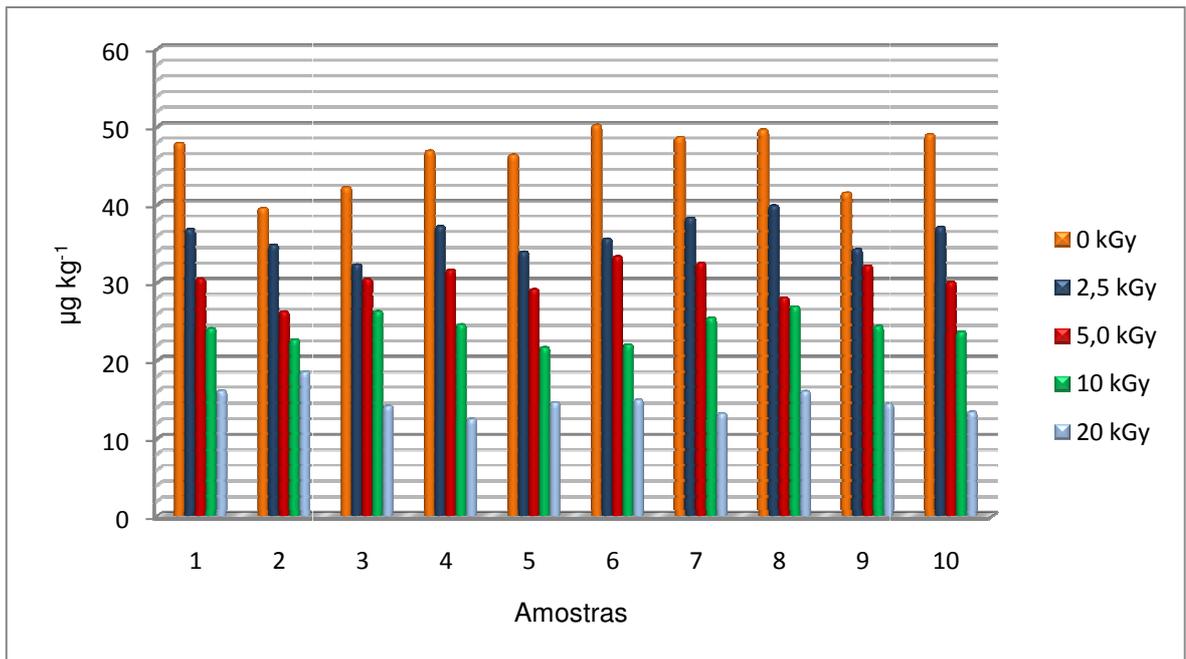


FIGURA 12 - Valores de aflatoxina B<sub>1</sub> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) obtidos na quantificação das amostras processadas em fonte de  $^{60}\text{Co}$ , com doses de 0, 2,5, 5,0, 10 e 20 kGy.

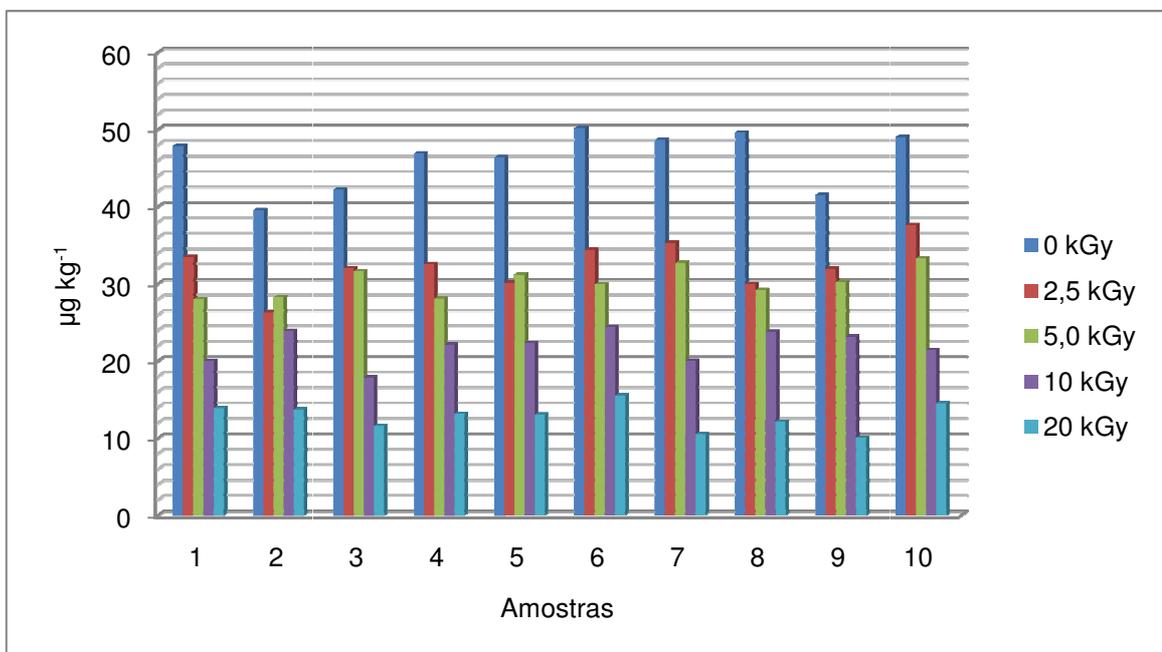


FIGURA 13 - Valores de aflatoxina B<sub>1</sub> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) obtidos na quantificação das amostras processadas com feixes de elétrons, com doses de 0, 2,5, 5,0, 10 e 20 kGy.

Prado (2005) irradiou amostras de amendoim naturalmente contaminadas com doses de 1,0 kGy, 5,0 kGy, 10 kGy, 15 kGy, 20 kGy, 25 kGy e 30 kGy, não observando praticamente nenhuma destruição da aflatoxina B<sub>1</sub> nas amostras de amendoim, contaminadas naturalmente, irradiadas com doses de 1,0 a 10 kGy, porém, nas amostras contaminadas artificialmente, a redução foi de aproximadamente 20 % com as mesmas doses, mas com doses superiores, de 15 kGy até 30 kGy a redução de aflatoxina B<sub>1</sub> foi de aproximadamente 49-72 %.

Segundo Aziz e Youssef (2002) o tratamento de produtos agrícolas e alimentos com dose de 5,0 kGy foi capaz de destruir de 44 % a 48 % de aflatoxina B<sub>1</sub>, de 16-20 % de ocratoxina A e 56-75 % de zearalenona, enquanto a utilização de 10 kGy reduz a aflatoxina B<sub>1</sub> em 82-88 % e zearalenona em 88-94 %, mas apenas 44-48 % de ocratoxina A. Os autores também reportaram que a utilização de 20 kGy foi suficiente para degradar a aflatoxina B<sub>1</sub> e zearalenona a níveis não detectáveis e reduzir a ocratoxina A em 72-76 %. Aziz e Moussa (2004), após tratamento de milho, semente de amendoim e grão de bico, com dose de 4,0 kGy, revelaram uma degradação de aproximadamente 64,5 % de aflatoxina B<sub>1</sub>, de 35,8-40 % de ocratoxina A e 58 % para zearalenona, enquanto o tratamento com 6,0 kGy foi capaz de reduzir de 74,3 a 76,7 % de aflatoxina B<sub>1</sub>, de 51,3 a 69,2 % de ocratoxina A e 78 % de zearalenona.

Patel *et al.* (1989) constataram que a aflatoxina é resistente à radiação gama em condições de baixa umidade, porém, quanto maior o teor de água da amostra, mais eficiente é o processo de irradiação. De acordo com trabalho realizado por Aquino *et al.* (2005), a irradiação de aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, com doses de 2,0, 5,0 e 10 kGy, foi mais eficiente com a utilização da dose de 2,0 kGy em relação com a dose de 5,0 kGy, fato esse explicado devido à diferença na atividade de água, de 0,91 nas amostras tratadas com 2,0 kGy e 0,88 nas amostras tratadas com 5,0 kGy. As amostras irradiadas com 10 kGy, com atividade de água de 0,94, foram degradadas completamente, sendo o processo de radiólise formador de um grande número de radicais livres e outras espécies iônicas excitadas, aumentando o efeito indireto da irradiação.

De acordo com um estudo realizado por Patel *et al.* (1989) onde foi adicionado à aflatoxina, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a uma concentração de 5 %, a degradação da aflatoxina foi completa quando aplicada uma dose de apenas 1,0 kGy, indicando que o peróxido de hidrogênio potencializa os efeitos da radiação gama. O mesmo autor realizou outro experimento adicionando água ( $H_2O$ ) em uma concentração de 50 µg de aflatoxina, sendo irradiada em fonte de  $^{60}Co$  a uma dose de 10 kGy, resultando em uma degradação de 40 % da aflatoxina. Estes resultados estão em desacordo com os resultados obtidos no presente trabalho, onde a aflatoxina  $B_1$  sofreu uma redução de aproximadamente 34,22 % e 47,69 % após a irradiação em fonte de  $^{60}Co$  com doses de 5,0 e 10 kGy e 34,50% e 52,63% após o processamento por feixes de elétrons.

Estudo realizado por van Dyck (1982) mostrou uma completa destruição de aflatoxina  $B_1$  com doses superiores a 10 kGy, porém em outra repetição realizada nesse mesmo estudo, utilizando-se a mesma dose de irradiação, a degradação foi de 90 %, supondo-se que a atividade de água foi fator determinante na degradação da aflatoxina  $B_1$ . As interações desses radicais livres e moléculas ativas, produzidas durante o processo de irradiação, com a aflatoxina  $B_1$  livre, promovem uma degradação mais eficiente dessa micotoxina (SAMARAJEEWA *et al.*, 1990). Ferreira-Castro *et al.* (2007) obtiveram uma redução de aproximadamente 21 % para a fumonisina  $B_1$ , irradiada com dose de 5,0 kGy, não observando redução para a fumonisina  $B_2$ . Para a dose de 10 kGy, o mesmo autor obteve uma redução de aproximadamente 62,5 % para a fumonisina  $B_1$  e 40 % para a fumonisina  $B_2$ , demonstrando que a irradiação é eficaz na degradação de outras micotoxinas.

### **5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura**

De acordo com Goodhew *et al.* (2001) o Microscópio Eletrônico de Varredura é uma ferramenta mais versátil que o Microscópio Óptico, pois, oferece uma maior resolução, maior aumento e conseqüentemente melhor visualização das amostras. Neste trabalho foi analisado o efeito da radiação gama e feixes de elétrons nas estruturas morfológicas do fungo *Aspergillus flavus*. As doses

utilizadas foram de 2,5, 5,0, 10 e 20 kGy. As estruturas morfológicas do fungo não sofreram danos com as doses de 2,5 até 10 kGy (FIGURA 14 e 15), no entanto, observou-se uma grande destruição das hifas e dos micélios, que apresentaram um aspecto de derretimento após a irradiação com 20 kGy (FIGURA 16). Braghini *et al.* (2009) observaram alterações proporcionais ao aumento da dose nas estruturas morfológicas do fungo *Alternaria alternata* irradiado com doses de 2,0, 5,0 e 10 kGy, onde as hifas ficaram com aspectos desidratados e com rupturas.

Em um estudo conduzido por Murillo *et al.* (1999) observou-se a penetração das hifas de *Fusarium moniliforme* em grãos de milho. Ferreira-Castro *et al.* (2007) demonstraram que a radiação ionizante causa modificações nas estruturas fúngicas que aumentaram proporcionalmente ao aumento da dose, sugerindo que essas modificações são atribuídas ao efeito direto da radiação ionizante nas células fúngicas.

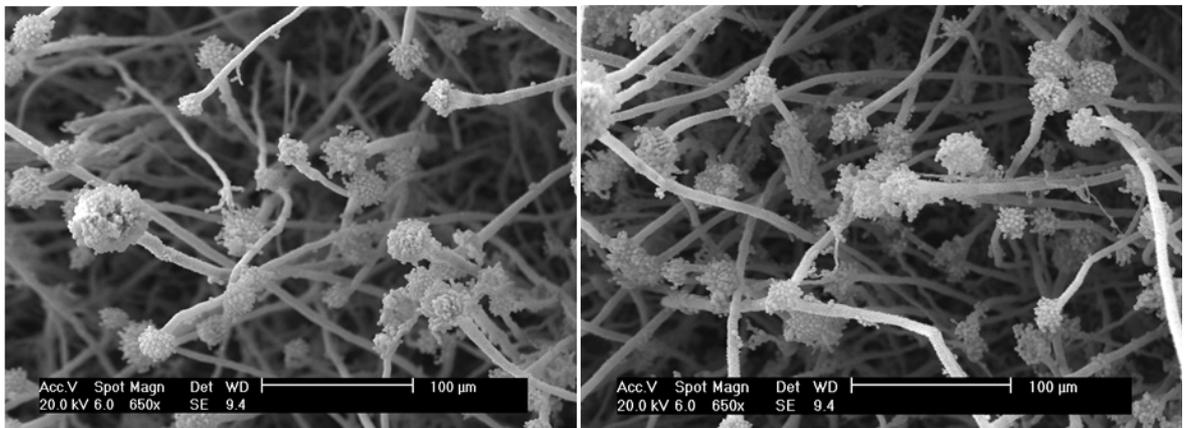


FIGURA 14 - Imagens microscópicas das alterações fúngicas após a aplicação da dose de 2,5 kGy (esquerda:  $^{60}\text{Co}$ ; direita: feixes de elétrons).

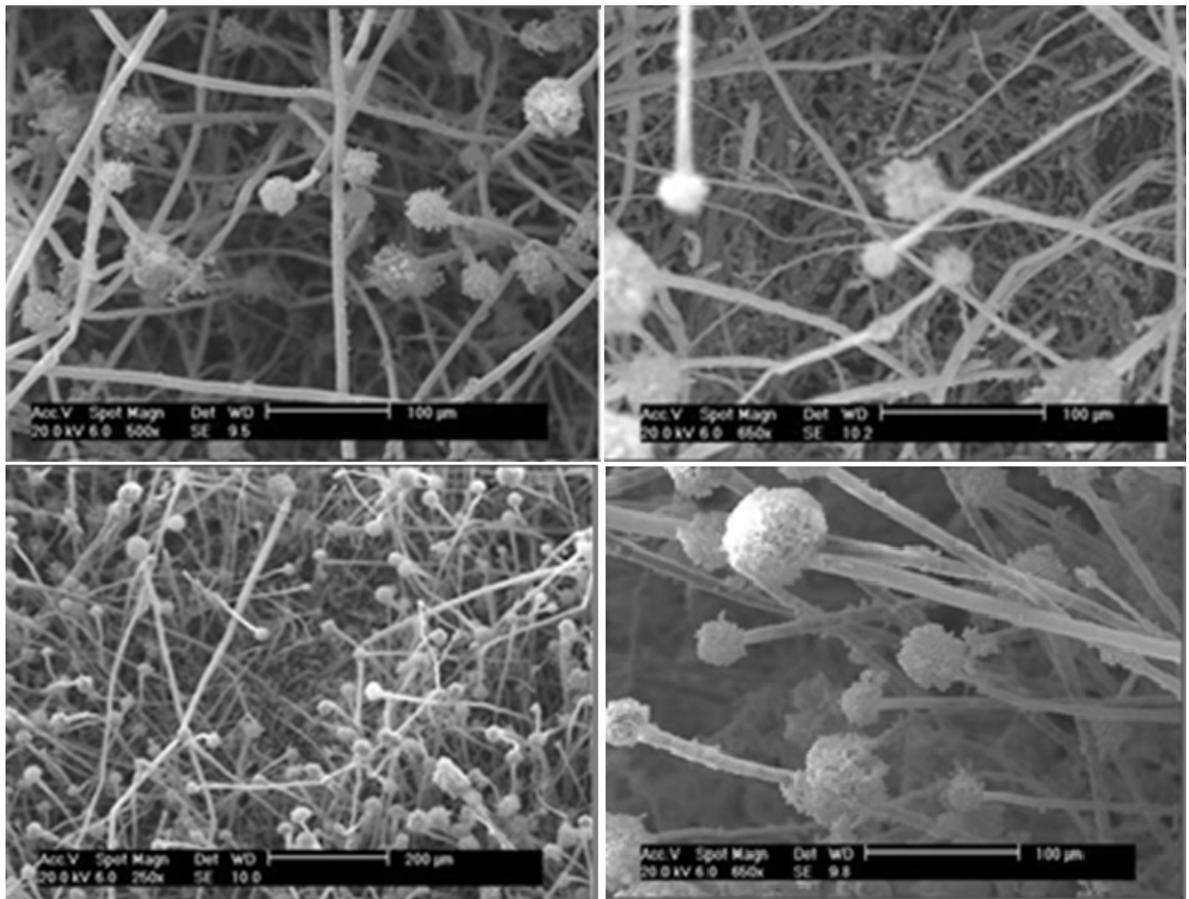


FIGURA 15 - Imagens microscópicas das hifas e micélio após a irradiação (superior: 5,0 kGy  $^{60}\text{Co}$  e feixes de elétrons; inferior: 10 kGy,  $^{60}\text{Co}$  e feixes de elétrons).



FIGURA 16 - Imagens microscópicas das alterações causadas após a irradiação com 20 kGy (superior:  $^{60}\text{Co}$  e inferior: feixes de elétrons).

## 6. CONCLUSÃO

- Neste trabalho, as doses utilizadas reduziram significativamente a aflatoxina B<sub>1</sub>, porém, nenhuma das doses utilizadas foi capaz de degradar a aflatoxina B<sub>1</sub> a níveis não detectáveis;
- Ao comparar os efeitos da radiação gama e dos feixes de elétrons, pode-se concluir que ambos foram eficiente na degradação da aflatoxina B<sub>1</sub> e apenas na dose de 2,5 kGy houve diferença significativa entre os tratamentos;
- A visualização em MEV demonstrou ser uma excelente ferramenta para observar as alterações nas estruturas fúngicas devido à resolução de imagens alta e grande poder de aumento, possibilitando observar com clareza os efeitos causados nas estruturas fúngicas após o tratamento por radiação gama e feixes de elétrons.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABDOLLAHI, A.; BUCHANAN, R.L. Regulation of aflatoxin biosynthesis: characterization of glucose as an apparent inducer of aflatoxin production. **J. Food Sci.**, v. 46, p. 143-146, 1981a.

ABDOLLAHI, A.; BUCHANAN, R.L. Regulation of aflatoxin biosynthesis: induction of aflatoxin production by various carbohydrates. **J. Food Sci.**, v. 46, p. 633-635, 1981b.

ABDULKADAR, A.H.W.; AL-ALI, A.A.; AL-KILDI, A.M.; AL-JEDAH, J.H. Mycotoxins in food products available in Qatar. **Food Control**, v. 15, p. 543-548, 2004.

AIKAWA, Y. A new facility for X-ray irradiation and its application. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 57, p. 609-612, 2000.

APPLEBAUM, A.; BUCHANAN, R.L. Intracellular concentration of cAMP and cGMP in an aflatoxigenic strain of *Aspergillus parasiticus*. **J. Food Sci.**, v. 44, p. 116-117, 1979.

AQUINO, S. **Efeitos da radiação gama no crescimento de *Aspergillus flavus* produtor de aflatoxinas e no emprego da técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR) em amostras de grãos de milho inoculadas artificialmente.** 2003. Dissertação (mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

AQUINO, S; FERREIRA, F.; RIBEIRO, D.H.B.; CORRÊA, B.; GREINER, R.; VILLAVICENCIO, A.L.C.H. Evaluation of viability of *Aspergillus flavus* and aflatoxins degradation in irradiated samples of maize. **Braz. J. Microbiol.**, v. 36, p. 352-356, 2005.

ASSOCIATION OF ANALYTICAL COMMUNITIES (AOAC). **Official Methods of Analysis**. Int. Gaithersburg. Maryland, 1997.

AZIZ, N.H.; EL-FAR, F.M.; SHAHIN, A.A.M.; ROUSHY, S.M. Control of *Fusarium* moulds and fumonisin B<sub>1</sub> in seeds by gamma-irradiation. **Food Control**, v. 18, p. 1337-1342, 2007.

AZIZ, N.H.; EL-ZEANY, S.A.; MOUSSA, A.A. Influence of  $\gamma$ -irradiation and maize lipids on the production of aflatoxin B<sub>1</sub> by *Aspergillus flavus*. **Food**, v. 46, p. 327-331, 2002.

AZIZ, N.H.; MOUSSA, L.A.A. Reduction of fungi and mycotoxins formation in seeds by gamma-radiation. **J. Food Safety**, v. 24, p. 109-127, 2004.

AZIZ, N.H.; YOUSSEF, Y.A.; EL-FOULY, M.Z.; MOUSSA, L.A. Contamination of some common medicinal plant samples and spices by fungi and their mycotoxins. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, v. 39, p. 279-285, 1998.

BAUER, J.; GAREIS, M. Ochratoxin A in food chain. **J. Vet. Med. Ser. B**, v. 34, p. 613-627, 1987.

BUCHANAN, R.L. Ability of various carbon sources to induce and support aflatoxin biosynthesis by *Aspergillus parasiticus*. **J. Food Saf.**, v. 6, p. 271-279, 1984.

BHAT, R.V. Moulds deterioration of agricultural commodities during transit: problems faced by developing countries. **Int. J. Food Microbiol.** v. 7, p. 219-228, 1988.

BHATNAGAR, D.; EHRLICH, K.C.; CLEVELAND, T.E. Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. **Appl. Microbiol. Biot.** v. 61, p. 83-93, 2003.

BHATNAGAR, D.; RAJASEKARAN, K.; PAYNE, G.A.; BROWN, R.L.; YU, J. The “omics” tools: genomics, proteomics, metabolomics and their potential for solving the aflatoxin contamination problem. *World Mycotoxin J.*, v. 1, p. 3-12, 2008.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.º 274, de 15 de outubro de 2002. **Aprova o regulamento técnico sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim e no milho.** Publicada no D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 16 de outubro de 2002.

BRASIL. MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria n.º 08, de 18 de maio de 1988. **Seção I, Para qualquer matéria prima a ser utilizada diretamente ou como integrante para rações destinadas ao consumo animal.** Publicada no D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 09 de novembro de 1988.

BRASIL. MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria n.º 183, de 21 de março de 1996. **Art. 1 Adotar regulamento técnico MERCOSUL sobre limite máximo de aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho, aprovado pela resolução de Grupo Mercado Comum do Sul n.º 56/94, de 01 de janeiro de 1995.** Publicada no D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 25 de março de 1996.

BUTTLER, W.H. Aflatoxin. In: PURCHASE, I.F.H. (Ed). *Mycotoxins*. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1974, p. 1-28.

CALVO, A.M.; BOK, J.; BROOKS, W.; KELLER, N.P. VeA is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 70, p. 4733-4739, 2004.

CALVO, A.M.; WILSON, R.A.; BOK, J.; BROOKS, J.W.; KELLER, N.P. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol. Mol. Rev.*, v. 66, p. 447-459, 2002.

CARBONE, I.; RAMIREZ-PRADO, J.; JAKBEK, J.L.; HORN, B.W. Gene duplication, modularity and adaptation in the evolution of aflatoxin gene cluster. ***BMC Evol. Biol.***, v. 10, p. 1-12, 2007.

CARY, J.W. Secondary metabolite gene cluster in filamentous fungi. In: ARORA, D., BRIDGE, P.D.; BHATNAGAR, D. (Eds). ***Handbook of Fungal Biotechnology***. New York, N.Y.: Marcel Dekker, 2003. p. 81-94.

CHU, F.S. Handbook of applied mycology. In: BHATNAGAR, D.; LILLEHOJ, E.B.; ARORA, D.K. (Ed.). ***Mycotoxins in ecological systems***. New York, N.Y.: Marcel Dekker, 1992.

CLELAND, M.R.; PAGEAU, G.M. Comparison of X-ray and gamma-ray sources for industrial radiation processes. ***Nucl. Instrum. Methods***, v. 24, p. 967-972, 1987.

COPPOCK, R.W.; CHRISTIAN, R.G. Aflatoxins. In: GUPTA, R.C. (Ed). ***Veterinary Toxicology***. Hopkinsville, K.Y.: Academic Press, 2007. p. 1224.

COKER, R.D. High performance liquid chromatography and other chemical quantification methods used in the analysis of mycotoxins in foods. In: GILBERT, J. (Ed.). ***Analysis of food contaminants***. London, U.K.: Elsevier, 1984, p. 207-263.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (CAST). ***Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems. Task Force Report***, Ames, Iowa, USA, n. 139, 2003.

DAVIS, N.D.; DIENER, U.L. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* from carbon sources. ***Appl. Microbiol.***, v. 16, p. 158-159, 1968.

DAVIS, N.D.; DIENER, U.L.; AGNIHOTRI, V.P. Production of aflatoxins B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub> in chemically defined medium. ***Mycopathol. Mycol. Appl.***, v. 31, p. 251-256, 1967.

DIEHL, J.F. Safety of Irradiated Foods: 2. ed. revised and expanded. New York, N.Y.: ***Marcel Dekker Inc.***, p. 91-115, 1995.

DIENER, U.L.; DAVIS, N.D. Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids by *Aspergillus flavus* in sterile peanuts. ***J. Am. Oil Chem. Soc.***, v. 44, p. 259-263, 1967.

DYCK, P.J. van; TOBBACK, P.; FEYS, M.; VOORDE, H. van de. Sensitivity of aflatoxin B<sub>1</sub> to ionizing radiation. ***Appl. Environ. Microb.***, v. 43, p. 1317-1319, 1982.

EHRlich, K.C.; COTTY, P.J. Variability in nitrogen regulation of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* strains. ***Appl. Microbiol. Biotechnol.***, v. 60, p. 174-178, 2002.

ERDOGAN, A. The aflatoxin contamination of some pepper types sold in Turkey. ***Chemosphere***, v. 56, p. 321-325, 2004.

FACCHIN, I.; PASQUINI, C. Extração líquido-líquido em sistemas de fluxo. ***Quím. Nova***, v. 21, p. 60-68, 1998.

FENG, G.H.; LEONARD, T.J. Culture conditions control expression of the genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans*. ***Appl. Environ. Microbiol.***, v. 64, p. 2275-2277, 1998.

FERREIRA-CASTRO, F.L.; AQUINO, S.; GREINER, R.; RIBEIRO, D.H.B.; REIS, T.A.; CORRÊA, B. Effects of gamma radiation on maize samples contaminated with *Fusarium verticillioides*. ***Appl. Radiat. Isotopes***, v. 65, p. 927-933, 2007.

FDA Filing of food additive petition. Notice U.S. **Food and Drug Administration**, Federal Reg. v. 59, p. 43848-43849, 1994.

FDA Irradiation in the production, processing, and handling of food. Final rule. U.S. **Food and Drug Administration**, Fed. Reg. v. 50, p. 29658-29659, 21 CFR part 179, 1985.

FDA Irradiation in the production, processing, and handling of food. Final rule. U.S. **Food and Drug Administration**, Fed. Reg. v. 62, p. 64107-64121, 1997.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C.; THRANE, D.U. Moulds in food spoilage. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 33, p. 85-102, 1996.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Codex General Standard for Irradiated Foods and Recommended International Code of Practice for the Operation of Radiation Facilities used for the Treatment of Food**. Codex Alimentarius, FAO/WHO, Rome, 1984.

FREMY, J.M. ; CHU, F.S. Immunochemicals methods of analysis for aflatoxins. In: **Mycotoxins in Dairy Products**. New York, N.Y.: Van Emond, 1989, p. 97-125.

FRISVAD, J.C.; SKOUBOE, P.; SAMSON, R.A. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B<sub>1</sub>, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 28, p. 442-453, 2005.

GEORGIANNA, D.R.; PAYNE, G.A. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: From gene to genome. **Fungal Genet. Biol.**, v. 46, p. 113-125, 2009.

GIACOMELLI, L.; BOGGETTI, H.; AGNELLI, H.; ANUNZIATA, J.; SILBER, J.J.; CATTANA, R. Relevant physicochemical factors in chromatographic separation of *Alternaria alternata* mycotoxins. **Anal. Chim. Acta**, v. 370, p. 79-89, 1998.

GOODHEW, P. J.; HUMPHREYS, J.; BEANLAND, R. **Electron microscopy and analysis**. Taylor & Francis, London, p. 251, 2001.

GORYACHEVA, Y.; DESAEGER, S.; EREMIN, S.A.; VAN PETEGHEM, C. Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection: evolution from single to multiple analyte screening: A review. **Food Add. Contam.**, v. 10, p. 1169-1183, 2007.

GOURAMA, H.; BULLERMAN, L.B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: a Review. **J. Food Protect.**, v. 58. p. 1395-1404, 1995.

HAYASHI, T. Decontamination of dry food ingredients and seeds with 'soft-electrons' (low-energy electrons). **Food Sci. Technol. Int.**, v. 4, p. 114-120, 1998.

HOLCOMB, M.; THOMPSON, Jr., H.C.; COOPER, W.M.; HOPPER, M.L. SFE extraction of aflatoxins (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, and G<sub>2</sub>) from corn and analysis by HPLC. **J. Supercrit. Fluids**, v. 9, p. 118-121, 1996.

HOLCOMB, M.; WILSON, D.M.; TRUCKSESS, M.W.; THOMPSON Jr., H.C. Determination of aflatoxins in food products by chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 624, p. 341-352, 1992.

HSIEH, D.P.; MATELES, R.I. The relative contribution of acetate and glucose to aflatoxin biosynthesis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 208, p. 482-486, 1970.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). **Gamma irradiators for radiation processing**. IAEA, Vienna, 2005.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In: **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, IARC, Lyon, 1993, v. 56.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGY SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). Toxigenic Fungi: *Aspergillus*. In: ***Microorganisms in foods: characteristics of food pathogens***, London, 1996, v. 5.

ITO, Y.; PETERSON, S.W.; WICKLOW, Q.T.; GOTO, T. *Aspergillus pseudotamarii*, new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section Flavi. ***Mycol. Res.***, v. 105, p. 233-239, 2001.

KACHHOLZ, T.; DEMAINE, A.L. Nitrate repression of averufin and aflatoxin biosynthesis. ***J. Nat. Prod.***, v. 46, p. 499-506, 1983.

KATO, N.; BROOKS, W.; CALVO, A.M. The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development. ***Eukaryot. Cell***, v. 2, p. 1178-1186, 2003.

KLINCH, M.A. *Aspergillus flavus*: The major producer of aflatoxin. ***Mol. Plant Pathol.***, v. 8, p. 713-722, 2007.

KURTZMAN, C.P.; HORN, B.W.; HESSELTINE, C.W. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari*. ***Int. J. Gen. Mol. Microbiol.***, v. 53, p. 147-158, 1987.

LANDERS, K.E.; DAVIS, N.D.; DIENER, U.L. Influence of atmospheric gases on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Peanut. ***Phytopathology***, v. 57, p. 1086-1090, 1967.

LIN, M.T.; DIANESE, J.C.A. Coconut agar medium for rapid detection production by *Aspergillus* spp. ***Phytopathology***, v. 66, p. 1466-1469, 1976.

LUCHESE, R.H.; HARRIGAN, W.F. Biosynthesis of aflatoxin – the role of nutritional factors. ***J. Appl. Bacteriol.***, v. 74, p. 5-14, 1993.

MANN, G.E.; CODIFER, L.P. DELLEAR, F.G. Effect of heat on aflatoxin in oil seed meals. **J. Agric. Food Sci.**, v. 15, p. 1090-1092, 1967.

MAY-DE MIO, L.L.; NOVAES, Q. S; ALVES E. Estudo morfológico de urediniósporos de fungos causadores de ferrugem por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura - Avaliação de metodologias de preparação. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 267-273, 2006.

McKEOWN, J. Photon energy limits for food irradiation: a feasibility study. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 53, p. 55-61, 1998.

McLAUGHLIN, W.L.; BOYD, A.W.; CHADWICK, K.H.; McDONALD, J.C.; MILLER, A. **Dosimetry for Radiation Processing**. London: Taylor and Francis, 1989.

MILLER, A.; HEDEMANN-JENSEN, P. Measurements of induced radioactivity in electron and photon irradiated beef. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 38, p. 507-512, 1987.

MILLER, J.D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **J. Stored Prod. Res.**, v. 31, p. 1-16, 1995.

MORGAN, M.R.A. Mycotoxin immunoassays (with special reference to ELISA). **Tetrahedron**, v. 45, p. 2237-2249, 1989.

MPHANDE, F.A.; SIbAME, B.A.; TAYLOR, J.E. Fungi, aflatoxins, and cyclopiazonic acid associated with peanut retailing in Botswana. **J. Food Protec.**, v. 67, p. 96-102, 2004.

MURILLO, I.; CAVALLARIN, L.; SAN SEGUNDO, B. Cytology of infection of maize seedlings by *Fusarium moniliforme* and immunolocalization of the pathogenesis-related PRms protein. **Biochem. Cell Biol.**, v. 89, p. 737-747, 1999.

O'BRIAN, G.R.; GEORGIANNA, D.R.; WILKINSON, J.R.; YU, J.; ABBAS, H.K. The effects of elevated temperature on gene transcription and aflatoxin biosynthesis. **Mycology**, v. 99, p. 232-239, 2007.

OLIVIEIRA, C.; SALGADO, J.; BOTELHO, M.L.; FERREIRA, L.M. Dose determinations by Monte Carlo calculations. *Radiat. Phys. Chem.*, v. 57, p. 667-670, 2000.

PAYNE, G.A.; BROWN, M.P. Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v. 36, p. 329-362, 1998.

PATEL, U.D.; GOVINDARAJAN, P.; DAVE, P.J. Inactivation of aflatoxin B<sub>1</sub> by using synergistic effect of hydrogen peroxide and gamma radiation. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 55, p. 465-467, 1989.

PATHAN, A.K.; BOND, J.; GASKIN, R.E. Sample preparation for scanning electron microscopy of plant surfaces-Horses for courses. *Micron.*, v. 39, p. 1049-1061, 2008.

PEREIRA, M.M.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus parasiticus*. *B. CEPPA*, v. 20, p. 141-156, 2002.

PITT, J.I. Corrections to species names in physiological studies on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *J. Food Protec.*, v. 56, p. 265-269, 1993.

PITT, J.I. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 53, p. 266-269, 1987.

PITT, J.I. Toxigenic fungi: which are important? *Med. Mycol.*, v. 38, p. 17-22, 2000.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. *Fungi and Food Spoilage*. London: Blackie Academic and Professional, 1997.

PITT, J.I.; MISCAMBLE, B.F. Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *J. Food Prot.*, v. 58, p. 86-90, 1995.

PRICE, M.S.; CONNERS, S.B.; TACHDJIAN, S.; KELLY, R.M.; PAYNE, G.A. Aflatoxin conducive and non-conducive growth conditions reveal new gene associations with aflatoxin production. ***Fungal Genet. Biol.***, v. 42, p. 506-518, 2005.

PRADO, G. **Influência da irradiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ) na microbiota fúngica e aflatoxina B<sub>1</sub> e em amendoim (*Arachis hypogaea* L.)**. 2005. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S.; MOREIRA, A.P.A.; LIMA, A.S.; SOUZA, R.A.; ALVES, M. C. Determinação de aflatoxina B<sub>1</sub> em pimenta (*Piper nigrum* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L.) por cromatografia em camada delgada e densitometria. ***Quim. Nova***, v. 31, p. 514-517, 2008.

PURSCHWITZ, J.; MULLER, S.; KASTNER, C.; SCHOSER, M.; HAAS, H. Functional and physical interaction of blue and red light sensors in *Aspergillus nidulans*. ***Curr. Biol.***, v. 18, p. 255-259, 2008.

RADOMYSKI, T.; MURANO, E.A.; OLSON, D.G; MURANO, P.S. Elimination of pathogens of significance in food by low-dose irradiation: a review. ***J. Food Prot.***, Des Moines, v. 57, p. 73-86, 1994.

REINHARD, H.; ZIMMERLI, B. Reversed-phase liquid chromatographic behavior of the mycotoxins citrinin and ochratoxin A. ***J. Chromatogr. A***, v. 862, p. 147-159, 1999.

ROBENS, J.; CARDWELL, K.F. The cost of mycotoxin management in United States. In: ABBAS, H.K. (Ed). ***Aflatoxin and Food Safety***. Boca Raton, FL: Taylor & Francis, 2005. p. 1-12.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: The last decade in review. ***Braz. J. Microbiol.***, v. 33, p. 1-11, 2002.

RUSTOM, I.Y.S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chem.**, v. 59, p. 57-67, 1997.

SAMARAJEWA, U.; SEN, A.C.; COHEN, M.D.; WEI, C.I. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. **J. Food Protec.**, v. 53, p. 489-501, 1990.

SARGEANT, K.; SHERIDAN, A.; O KELLY, J.; CARNAGHAN, R.B.A. Toxicity associated with samples of groundnuts. **Nature**, v. 192, p. 1095-1097, 1961.

SATIN, M. The case of food irradiation. **International Conference of the Agricultural Research Institute**, p. 93-110, 1993.

SAYLOR, M.C.; JORDAN, T.M. Application of mathematical modeling technologies to industrial radiation processing. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 57, p. 697-700, 2000.

SCHINDLER, A.F.; PALMER, J.G.; EISENBERG, W.V. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* as related to various temperatures. **Appl. Microbiol.**, v. 15, p. 1006-1009, 1967.

SCHMIDT-HEYDT, M.; MAGAN, N.; GEISEN, R. Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 284, p. 142-149, 2008.

SCHROEDER, H.W.; HEIN Jr., H. Aflatoxins: production of the toxins in vitro in relation to temperature. **Appl. Microbiol.**, v. 15, p. 441-445, 1967.

SCOTT, P.M. Mycotoxin methodology. **Food Addit. Contam.**, v. 12, p. 395-403, 1995.

SHANTHA, T.; MURTHY, V.S. Influence of tricarboxylic acid cycle intermediates and related metabolites on biosynthesis of aflatoxin by resting cells of *Aspergillus flavus*. ***Appl. Environ. Microbiol.***, v. 42, p. 758-761, 1981.

SHEPHARD, G.S. Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins. ***J. Chromatogr. A***, v. 815, p. 31-39, 1998.

SHEPHARD, G.S.; SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; GELDERBLOM, W.C.A. Quantitative determination of fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. ***J. Liq. Chromatogr.***, v. 13, p. 2077-2087, 1990.

SHIH, C.H.; MARTH, E.H. Some cultural conditions that control biosynthesis of lipid and aflatoxin by *Aspergillus parasiticus*. ***Appl. Microbiol.***, v. 27, p. 452-456, 1974.

SOARES, L.M.V. AND RODRIGUES-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multitoxin thin-layer chromatographic. ***J. Assoc. Off. Anal. Chem.***, v. 72, p. 22-26, 1989.

SQUIRE, R.A. Rating animal carcinogens: a proposed regulatory approach. ***Science***, v. 214, p. 877-880, 1981.

SWEENEY, M.J.; DOBSON, A.D.W. Molecular biology of mycotoxins biosynthesis. ***FEMS Microbiol. Lett.*** v. 175, p. 149-163, 1999.

SWEENEY, M.J.; DOBSON, A.D.W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. ***Int. J. Food Microbiol.***, v. 41, p. 141-158, 1998.

TAKAHASHI, H.; KAMIMURA, H.; ICHINOE, M. Distribution of aflatoxin-producing *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in sugarcane fields in the southernmost islands of Japan. ***J. Food Protec.***, v. 67, p. 90-95, 2004.

TRABUSLI, L.R. *et al.* Biologia dos fungos. In: GOMPertz, O.F. *et al.* **Microbiologia Médica**. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 365-374.

USDA **Irradiation in the production, processing, and handling of food**. Federal Register. 50:29658, 1985.

VAAMONDE, G.; DEGROSSI, C.; COMERIO, R.; FERNANDEZ PINTO, V. *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* en mani cultivado en la provincia de Córdoba (Argentina): características diferenciales y capacidad aflatoxicogênica. **Boletim da Sociedade Argentina de Botânica**, v. 30, p. 191-198, 1995.

VALENTA, H. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. **J. Chromatogr. A**, v. 815, p. 75-92, 1998.

VAN EGMOND, H.P.; JONKER, M.A. Worldwide regulations on aflatoxins. In: ABBAS, H.K. (Ed.). **Aflatoxin and Food Safety**. Boca Raton, FL: Taylor & Francis, 2005. p. 77-93.

WILKES, J.G.; SUTHERLAND, J.B. Sample preparation and high-resolution separation of mycotoxins possessing carboxyl groups. **J. Chromatogr. B**, v. 717, p. 135-156, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Wholesomeness of Irradiated Food**. Geneva: WHO, 1981.

WISEMAN, D.W.; BUCHANAN, R.L. Determination of glucose level needed to induce aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. **Can. J. Microbiol.**, v. 33, p. 828-830, 1987.

YAZDANPANA, H.; MOHAMMADI, T.; ABOUHOSSAIN, G.; MAJID-CHERAGHALI, A. Effect of roasting on degradation of aflatoxins in contaminated pistachio nuts. **Food Chem. Toxicol.**, v. 43, p. 1135-1139, 2005.

YOUNG, J.C.; GAMES, D.E. Supercritical Fluid Chromatography of *Fusarium* Mycotoxins. **J. Chromatogr.**, v. 627, p. 247-254, 1992.

YU, J.; BHATNAGAR, D.; EHRLICH, K.C. Aflatoxin bisynthesis. **Rev. Iber. Micol.** v. 19, p. 191-200, 2002.

YU, J.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T.E. Completed sequence of aflatoxin pathway gene cluster in *Aspergillus parasiticus*. **FEBS Lett.**, v. 564, p. 126-130, 2004.

ZAICA, L.L.; BUCHANAN, R.L. Review of compounds affecting the biosynthesis or bioregulation of aflatoxins. **J. Food Protect.**, v. 50, p. 691-708, 1987.

ZHENG, M.; RICHARD, J.L.; BINDER, J.A. Review of Rapid Methods for the Analysis of Mycotoxins. **Mycopathologia**, v. 161, p. 261-273, 2006.