

**INFLUÊNCIA DA IRRADIAÇÃO GAMA
(⁶⁰CO) NA MICROBIOTA FÚNGICA E NA
AFLATOXINA B₁ EM AMENDOIM
(*Arachis hypogaea* L.)**

GUILHERME PRADO

2005

GUILHERME PRADO

**INFLUÊNCIA DA IRRADIAÇÃO GAMA (^{60}CO) NA
MICROBIOTA FÚNGICA E NA AFLATOXINA B₁ EM
AMENDOIM (*Arachis hypogaea* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do Curso
de Doutorado em Ciência dos Alimentos,
para obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho

Lavras
Minas Gerais - Brasil
2005

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Prado, Guilherme

Influência da irradiação gama (^{60}CO) na microbiota fúngica e na
aflatoxina B₁ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.) / Guilherme Prado. –
Lavras : UFLA, 2005.

186 p. : il.

Orientadora: Eliana Pinheiro de Carvalho

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Amendoim. 2. Irradiação gama. 3. Microbiota. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD-664.0288

-664.8056596

GUILHERME PRADO

**INFLUÊNCIA DA IRRADIAÇÃO GAMA (^{60}CO) NA
MICROBIOTA FÚNGICA E NA AFLATOXINA B₁ EM
AMENDOIM (*Arachis hypogaea* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Curso de Doutorado em
Ciência dos Alimentos, área de concentração em
Microbiologia, para obtenção do título de Doutor.

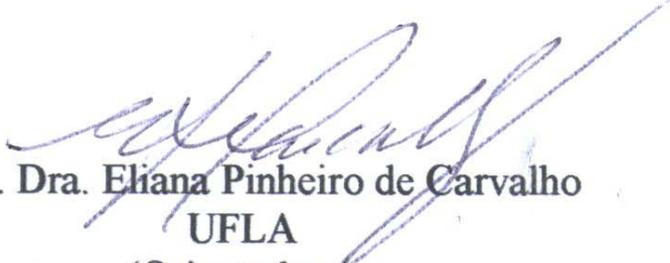
APROVADA em 18 de março de 2005

Prof. Dr. Célio Mauro Viana
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Luiz Carlos de Oliveira Lima
Universidade Federal de Lavras

Profa. Dra. Myrna Sabino
Instituto Adolfo Lutz

Profa. Dra. Roberta Hisldorf Piccoli
Universidade Federal de Lavras



Prof. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

Dedico este trabalho

A minha mulher e amiga, Dôra

Aos meus filhos, Renata, Lívia, Paula, Laura, Fábio e Andréia

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por colocar inúmeras pessoas em meu caminho que possibilitaram a concretização de um sonho.

À Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho, da Universidade Federal de Lavras, MG, pelo estímulo e incentivo desde o início do Doutorado e pela orientação e amizade, refletidos em uma total disponibilidade nesses 4 anos de trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Ribeiro Diniz (*in memorium*) pela transformação científica que realizou na FUNED e em particular em mim.

À Dra. Myrna Sabino, do Instituto Adolfo Lutz (SP), que me iniciou na área de micotoxinas, pela amizade e constante apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Luis Carlos de Oliveira Lima da Universidade Federal de Lavras, MG, pelo apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Célio Mauro Viana, da Universidade Federal Fluminense, pela amizade e conhecimentos na área de irradiação.

Ao Prof. Dr. Ivan Barbosa Machado Sampaio da Escola de Veterinária (UFMG) e a Marcelo Cirillo, da Universidade Federal de Lavras, pelas sugestões nas análises estatísticas.

À Universidade Federal de Lavras (MG), em especial ao Departamento de Ciência dos Alimentos, e à Fundação Ezequiel Dias, MG, pelo apoio e infraestrutura para a realização desta pesquisa.

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, que me receberam com carinho e amizade.

À FAPEMIG, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pelo apoio financeiro.

À Indústria de Alimentos Santa Helena (Ribeirão Preto – São Paulo) na pessoa da Dra. Tânia Dias da Costa, pelo envio das amostras de amendoim para a realização da pesquisa.

Ao Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN), Belo Horizonte/MG, na pessoa do Dr. Ricardo Ferracini Correa, e à Empresa Brasileira de Radiações Ltda – EMBRARAD (São Paulo), pela irradiação das amostras.

Aos amigos Luis Roberto Batista e Maria Marlúcia Gomes Pereira, colegas do doutorado da UFLA, pela amizade e apoio.

Às amigas do Laboratório de Micotoxinas da Fundação Ezequiel Dias, Jovita, Marize e Vanessa, pelo carinho, amizade, por viverem intensamente comigo estes anos de doutorado e pelo apoio total nas atividades de pesquisa.

À amiga Elizabeth Catalan Pereira pela presença e carinho no tempo que estive na Divisão de Bromatologia da Fundação Ezequiel Dias.

Ao André, meu genro, pelas ilustrações e gráficos da tese.

A Adriana pelas sugestões na formatação final da tese.

Aos amigos Tânia, Rita, Heloíza, Mariem, Gisélia, Kleber, Auxiliadora, Dora, Jane. Ritoca, Amália, Marina, Ester, Vânia, Berenice, Ricardo, Crisolita, Virgínia e Suzane pelo incentivo.

Aos amigos do Núcleo de Micologia e Micotoxinas da Fundação Ezequiel Dias, Thaís, Adriana, Ana Cristina, Luciana, Dida, Rúbia, Ana Carla, Ju, Mabel, Eliana, Márcia, Leandro, Ana Paula, Isabela e Juliana, pelo apoio e pela convivência harmoniosa e alegre do nosso laboratório.

A Grasiela e Kátia, da Fundação Ezequiel Dias, pelo carinho e amizade com que resolveram os meus problemas administrativos na FAPEMIG e na Fundação Ezequiel Dias durante o doutorado.

A todos os colegas e amigos da Fundação Ezequiel Dias pelo apoio e incentivo.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL.....	i
GENERAL ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1 INTRODUÇÃO	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Amendoim.....	4
2.1.1 Aspectos Gerais.....	4
2.1.2 Aspectos econômicos.....	5
2.2 Microbiota fúngica de amendoim.....	7
2.3 Crescimento fúngico e produção de micotoxinas.....	10
2.4 Fungos produtores de aflatoxinas.....	12
2.4.1 Biossíntese de aflatoxinas.....	14
2.4.2 <i>Aspergillus</i> e aflatoxinas.....	14
2.4.3 Fatores que afetam a sobrevivência, crescimento e produção de aflatoxinas por <i>Aspergillus</i>	16
2.4.4 Características físicas e químicas das aflatoxinas.....	20
2.4.5 Metabolismo e aspectos toxicológicos das aflatoxinas.....	20
2.4.6 Ocorrência de aflatoxinas.....	24
2.4.7 Prevenção e controle das aflatoxinas em amendoim.....	28
2.4.7.1 Prevenção da contaminação da aflatoxina em amendoim.....	29
2.4.7.2 Remoção ou destruição física e química da aflatoxina.....	31
2.4.7.3 Degradação biológica de micotoxinas	35
2.5 Legislação.....	38
2.6 Irradiação de alimentos.....	39

2.6.1 Aspectos gerais.....	39
2.6.2 Processo de irradiação.....	41
2.6.3 Tipos de irradiação.....	41
2.6.4 Fontes de radiação ionizante.....	42
2.6.5 Mecanismo de irradiação.....	43
2.6.6 Fatores que influenciam o processo de irradiação.....	43
2.6.7 Alterações dos componentes dos alimentos.....	44
2.6.8 Aplicações.....	45
2.6.9 Legislação.....	49
2.6.10 Efeitos da radiação gama	49
2.6.10.1 Ensaio gerais.....	49
2.6.10.2 Em amendoim - em função de aflatoxina B ₁ e fungos.....	51
2.6.10.3 Em outros alimentos – em função de aflatoxina B ₁ e fungos.....	55
2.6.10.4 Em outras micotoxinas e fungos.....	58
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
CAPÍTULO 2: Influência da irradiação gama (⁶⁰ Co) na destruição da aflatoxina B ₁ em amendoim (<i>Arachis hypogaea</i> L.).....	87
RESUMO.....	88
ABSTRACT.....	89
1 INTRODUÇÃO.....	90
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	93
2.1 Amostras.....	93
2.2 Preparo das amostras.....	94
2.2.1 Validação do método de quantificação de aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	94

2.2.2 Verificação da eficiência da irradiação gama (^{60}Co) em destruir aflatoxina B1 em amostras artificialmente contaminadas.....	94
2.2.3 Verificação da eficiência da irradiação gama em destruir aflatoxina B1 em amostras naturalmente contaminadas.....	95
2.3 Soluções padrão de aflatoxinas.....	95
2.4 Metodologia de fortificação com soluções padrão de aflatoxinas.....	96
2.5 Metodologia de irradiação.....	96
2.5.1 Em amostras artificialmente contaminadas.....	96
2.5.2 Em amostras naturalmente contaminadas.....	97
2.6 Quantificação de aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	97
2.7 Delineamento experimental e análise estatística.....	98
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	99
3.1 Validação da metodologia.....	99
3.2 Destruição da aflatoxina B ₁ em amostras artificialmente contaminadas e irradiadas.....	103
3.3 Destruição da aflatoxina B ₁ em amostras naturalmente contaminadas e irradiadas.....	106
4 CONCLUSÕES.....	118
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
CAPÍTULO 3: Influência da irradiação gama (^{60}Co) na microbiota fúngica e produção de aflatoxina B ₁ pelo <i>Aspergillus flavus</i> IMI 190443 em amendoim (<i>Arachis hypogaea</i> L.).....	123
RESUMO.....	124
ABSTRACT.....	125
1 INTRODUÇÃO.....	126
2 MATERIAL E MÉTODOS	130
2.1 Amostras.....	130

2.2 Fungo aflatoxigênico.....	130
2.3 Preparação da suspensão de esporos do fungo aflatoxigênico.....	130
2.4 Processo de irradiação.....	131
2.5 Extração e quantificação de aflatoxina B ₁	131
2.6 Isolamento e determinação fúngica.....	132
2.6.1 Diluição em placa.....	132
2.6.2 Plaqueamento direto.....	133
2.7 Procedimento para verificação do efeito da irradiação gama (⁶⁰ Co) na microbiota fúngica.....	133
2.8 Procedimento de inoculação dos grãos de amendoim com suspensão de <i>A.flavus</i> IMI 190443.....	134
2.9 Procedimento para verificação da produção de aflatoxina B ₁ em amostras irradiadas e posteriormente inoculadas com <i>A.flavus</i> IMI 190443.....	134
2.10 Procedimento para verificação da produção de aflatoxina B ₁ e porcentagem de infecção fúngica em amendoim inoculado e posteriormente irradiado.....	134
2.10.1 Determinação da porcentagem fúngica.....	135
2.10.2 Determinação da aflatoxina B ₁	135
2.11 Delineamento experimental e análise estatística.....	136
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	137
3.1 Efeito da irradiação gama (⁶⁰ Co) na microbiota fúngica.....	137
3.2 Produção de aflatoxina B ₁ por <i>Aspergillus flavus</i> IMI 190443 após inoculação em amendoim.....	139
3.3 Produção de aflatoxina B ₁ em amostras irradiadas e posteriormente inoculadas com <i>A.flavus</i> IMI 190443.....	145
3.4 Produção de aflatoxina B ₁ em amostras inoculadas com <i>A.flavus</i> IMI 190443 e posteriormente irradiadas.....	147

4 CONCLUSÕES.....	154
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155
CAPÍTULO 4: Efeito da irradiação gama (^{60}Co) na frequência fúngica de amendoim <i>in natura</i> em função do tempo de prateleira.....	
RESUMO.....	161
ABSTRACT.....	162
1 INTRODUÇÃO.....	163
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	164
2.1 Amostras.....	167
2.2 Preparo das amostras para o processo de irradiação.....	167
2.3 Meio de cultivo.....	167
2.4 Isolamento e determinação fúngica.....	167
2.5 Procedimento de irradiação e acondicionamento posterior das amostras.....	168
2.6 Delineamento experimental e análise estatística.....	169
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	170
4 CONCLUSÕES.....	177
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	178
ANEXOS.....	181

RESUMO GERAL

PRADO, Guilherme. **Influência da irradiação gama (^{60}Co) na microbiota fúngica e na aflatoxina B₁ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.).** 2005. 186 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito da irradiação gama (^{60}Co) na microbiota fúngica natural e após inoculação de cepa aflatoxigênica de *Aspergillus flavus* IMI 190443, bem como avaliar a destruição de aflatoxina B₁ em amostras de amendoim, cultivar Tatu Vermelho, naturalmente e artificialmente contaminadas. Amostras cultivadas em São Paulo das safras de 2001/2002, 2002/2003 e segundo semestre de 2003, foram fornecidas pela Indústria de Alimentos Santa Helena (Ribeirão Preto - São Paulo). O grau de contaminação foi avaliado através da contagem total de fungos (UFC/g) e porcentagem de infecção fúngica, utilizando o meio dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC). A quantificação de aflatoxina B₁ foi feita por cromatografia em camada delgada pela técnica de comparação com padrões. Doses de irradiação gama de 1, 5 e 10 kGy reduziram em cerca de 20% os níveis de aflatoxina B₁ em amostras artificialmente contaminadas. Entretanto, em amostras naturalmente contaminadas, a aflatoxina B₁ foi destruída com doses de irradiação gama de 15, 20, 25 e 30 kGy, na faixa de 49 a 72%. A contaminação de amendoim previamente irradiado, com cepa aflatoxigênica, provocou níveis elevados de aflatoxina B₁. A microbiota fúngica natural foi destruída nas doses de 5 e 10 kGy. Entretanto, doses de 25 e 30 kGy foram necessárias para completa inativação de esporos de *Aspergillus flavus* IMI 190443. A irradiação gama na dose de 10 kGy ou superior foi capaz de reduzir totalmente a contaminação fúngica do amendoim *in natura*, acondicionado em embalagem comercial, durante 6 meses, à temperatura ambiente.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA

GENERAL ABSTRACT

PRADO, Guilherme. **Gamma irradiation influence on mycoflora and on aflatoxin B₁ in peanut (*Arachis hypogaea* L.)**. 2005. 186 p. Thesis (Doctorate in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

The aim of this study was to verify the effect of gamma radiation (⁶⁰Co) on natural mycoflora and after inoculation of aflatoxigenic isolate *Aspergillus flavus* IMI 190443, as well as evaluate the aflatoxin B₁ destruction in peanut samples, Tatu Vermelho variety, naturally and artificially contaminated. Samples cultivated in São Paulo state from 2001/2002, 2002/2003 and second semester of 2003 harvest, were sending by Santa Helena Food Industry (Ribeirão Preto - São Paulo). The contamination level was measured as colony forming units/g (UFC/g) and percentage of fungi infection, using mycological media dichloran rose bengal chloranphenicol agar (DRBC). Aflatoxin B₁ quantification was done by thin layer chromatography using a comparison with standards. Gamma-irradiation doses of 1, 5 and 10 kGy decreased around 20% of aflatoxin B₁ levels in artificially contaminated samples. However, in contaminated naturally samples, aflatoxin B₁ was only destroyed with gamma-irradiation doses of 15, 20, 25 and 30 kGy, range from 49 to 72%. Peanuts contamination previously irradiated, with aflatoxigenic isolate, showed high levels of aflatoxin B₁. Natural mycoflora was destroyed in 5 and 10 kGy doses. However, 25 e 30 kGy doses were necessary to complete inactivation of *Aspergillus flavus* IMI 190443 spores. Gamma irradiation in 10 kGy dose or higher was able to reduce completely the fungal contamination in natura peanuts, stored in commercial packs, during 6 months, in room temperature.

Adviser: Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O amendoim adapta-se a larga faixa climática dentro das regiões tropicais e subtropicais, com exceção das excessivamente úmidas. No Brasil, 88,6% da produção nacional de amendoim concentra-se na região Sudeste (83,2% em São Paulo). Atualmente, a produção situa-se em torno de 200 mil toneladas em noventa e cinco mil hectares, aproximadamente, e a produtividade é de 2,0 ton/ha. A importância do amendoim reside no fato de ser um alimento de alto valor calórico (cerca de 596 calorias/100 g de semente), possuir óleo de alta digestibilidade (98%), elevada taxa de vitamina E e quantidades consideráveis de vitamina B₁ e B₂.

A deterioração de alimentos por fungos tem resultado em perdas de 5 a 20% da produção em países desenvolvidos, podendo atingir 50% em países em desenvolvimento, principalmente em regiões de clima tropical. Além dos problemas das perdas econômicas, o desenvolvimento de fungos está associado à possível produção de micotoxinas, como as aflatoxinas, sendo a aflatoxina B₁ a mais importante, tendo sido classificada pela International Agency for Research on Cancer – IARC, no Grupo 1: carcinogênica para seres humanos.

Pesquisas que relatam a incidência de aflatoxinas em alimentos, e principalmente em amendoim, têm sido conduzidas em diferentes países. No Brasil, os níveis de contaminação, apesar de terem diminuído, são motivos de preocupação dos Ministérios da Saúde e da Agricultura. Os valores detectados de aflatoxinas nos alimentos estão muito acima dos limites recomendados pela legislação em vigor.

A irradiação de alimentos, com o objetivo de reduzir a microbiota natural ou patogênica e aumentar a vida de prateleira dos produtos, é uma das tecnologias que vêm crescendo em todo o mundo, mas ainda pouco difundida no

Brasil. Atualmente, especiarias, grãos, carnes, frutas e vegetais já são tratados por esse processo em cerca de 44 países, com diferentes propósitos: (1) retardamento do amadurecimento de frutos; (2) desinfecção, com eliminação de insetos adultos, larvas e ovos; e (3) prevenção do brotamento de vegetais. Devido ao aumento do comércio internacional de alimentos e das crescentes exigências dos regulamentos dos países consumidores, pesquisas que avaliam a irradiação como processo capaz de melhorar a qualidade e aumentar a vida de prateleira dos alimentos é fundamental no domínio do conhecimento científico.

Muitos resultados obtidos com a aplicação da irradiação gama (^{60}Co) para verificar o efeito na microbiota fúngica e posterior produção de aflatoxinas em grãos são contraditórios. Verificar a capacidade da irradiação gama (^{60}Co) em destruir fungos e aflatoxina B₁ em amendoim cultivado no Brasil e avaliar a produção de aflatoxina B₁ em amendoim antes e após irradiação são objetivos desta pesquisa, que poderá contribuir para melhor compreensão do tema.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Amendoim

2.1.1 Aspectos gerais

O amendoim, cientificamente designado *Arachis hypogaea* L., é uma leguminosa com processo especial de frutificação, em que flor aérea após ser fecundada, produz fruto sob o solo. É planta de riquíssimo valor alimentar. Seus grãos contêm cerca de 50% de gordura e 22-30% de proteína. O amendoim tem a vantagem de poder ser consumido cru ou torrado, tornando-se um alimento disponível e adequado para qualquer situação tecnológica. No Brasil destacam-se como regiões produtoras Ribeirão Preto e Marília, em São Paulo, onde o plantio de cultivares precoces permite duas épocas de cultivo: (1) amendoim das águas (1ª safra): semeadura realizada de setembro a outubro e colheita nos meses chuvosos (fevereiro – março); e (2) amendoim da seca (2ª safra): semeadura realizada no final de março e colheita nos meses secos (julho – agosto). É uma cultura de ciclo curto, cerca de 90-110 dias, podendo ocupar áreas de reforma de canaviais que necessitam de rotatividade a cada cinco ou seis anos, ou em áreas de substituição ao algodoeiro, abandonadas pelo elevado custo de produção (Azeredo et al., 2003; Crusciol et al., 2000; Fagundes, 2002; Moraes, 1964; Nakagawa et al., 1986).

As pesquisas desenvolvidas com o amendoim levam em conta o segmento de mercado. Se o material é destinado para mesa, as sementes são de tamanho médio, película vermelha e com baixo teor de óleo. Algumas indústrias de alimento, no entanto, preferem o amendoim de película bege devido a ser desnecessária a retirada da mesma no processamento. As indústrias de extração, por sua vez, geralmente não são exigentes quanto ao tamanho e cor da semente

e, sim, quanto à qualidade e ao teor de óleo, que deve ser superior a 49% (Freire et al., 1996).

Atualmente, as principais cultivares plantadas no estado de São Paulo, são: IAC Caiapó, com hábito de crescimento rasteiro, IAC Tatu – ST e IAC Tatu Vermelho, com hábito de crescimento ereto, sendo esta última com cerca de 53% de participação no mercado de sementes fiscalizadas e certificadas, em São Paulo. Apresentam um ciclo de 110 a 135 dias e produtividade de 1600 a 3000 kg/ha. As vagens são alongadas, com 3 a 4 grãos de pele vermelha e sabor ligeiramente adocicado, atendendo à preferência do consumidor brasileiro (Fagundes, 2002; Godoy et al., 1999; IAC, 2001). Com relação à aceitação pelo mercado consumidor, observa-se que os tipos *runner* (crescimento rasteiro) são os mais difundidos entre os países do primeiro mundo, principalmente para o consumo *in natura* e na forma de pastas. Cultivares rasteiros são vegetativamente mais adequados para a colheita totalmente mecanizada, como é na Argentina, enquanto em cultivos de pequena escala, em que a colheita é feita com a mão, os tipos eretos são os mais indicados. No Brasil predomina este tipo de cultivo, em que é utilizada uma quantidade apreciável de mão-de-obra, principalmente na colheita (fase de arranquio), sendo, portanto, geradora de empregos (Freitas et al., 1995; Godoy et al., 1999).

2.1.2 Aspectos econômicos

Dentre as principais oleaginosas cultivadas no Brasil e no mundo, destaca-se o amendoim com uma área plantada de aproximadamente 20 milhões de hectares. Na safra 2001/2002, a cultura do amendoim ficou em quarto lugar em produção, atrás da soja (56,8% do total da safra mundial); do algodão (11,3% do total) e da colza (11,1% do total). Nessa safra, o amendoim participou com 10,23% do total da safra mundial de oleaginosas, que foi de 33,11 milhões de toneladas. Cerca de 60% são destinados ao esmagamento para extração de óleo

comestível, responsável por 10% da produção mundial, sendo este o quinto óleo mais consumido com uma produção de 3,86 milhões de toneladas. Os principais produtores mundiais de amendoim em grão são China (em 2002 liderou a produção com 14,42 milhões de toneladas), Índia, Estados Unidos, Nigéria, Indonésia e Senegal. O Brasil, na safra de 2002/2003 ficou com uma produção de 174,9 mil toneladas, com uma estimativa para 2003/2004 de 207,0 mil toneladas, representando menos de 1% da produção mundial (Amendoim, 1998; Azeredo et al., 2003; Conab, 2004; Fagundes, 2002; Santos, 1999).

O Brasil já se situou entre os sete primeiros países produtores de amendoim no contexto mundial, cujo principal produto comercializado era o óleo. No início dos anos 70, produzia-se tanto amendoim quanto soja, mas por ter colheita intensiva em mão-de-obra e ter apresentado sucessivos problemas de incidência de aflatoxinas, acabou sendo deslocado do mercado, enquanto a soja crescia e se tornava a principal fonte do óleo vegetal comestível consumido no país. A área colhida chegou a alcançar 758.585 há, com uma produção de 956.228 toneladas na safra de 1971/1972. A partir de meados de 1974, devido à queda da qualidade do produto no mercado internacional, decorrente dos sucessivos problemas de contaminação com aflatoxina, a área plantada reduziu drasticamente e, conseqüentemente, a produção. O destino do produto no mercado nacional também mudou: atualmente cerca de 80% da produção destina-se ao mercado de consumo *in natura*. As indústrias brasileiras de doces e confeitos vêm apresentando, nos últimos 10 anos, um crescimento em qualidade e diversificação, donde o amendoim vem tendo uma utilização crescente. Por esse aspecto e pelo fato de que tem havido escassez do produto no mercado interno, provocando eventuais importações, principalmente da Argentina, pode-se afirmar que há condições para se estimular a produção agrícola do amendoim no país. Deve-se ressaltar que embora a área cultivada tenha diminuído, a produtividade cresceu 44% nos últimos dez anos, resultado alcançado, em

grande parte, por meio de várias tecnologias inovadoras: cultivares novos e sistemas de cultivo melhorados (Almeida, 1996; Fundag, 2004; Santos, 1999).

2.2 Microbiota fúngica de amendoim

Os fungos estão amplamente distribuídos no solo, plantas, matéria orgânica em decomposição, água, ar e poeira. Conseqüentemente, produtos não processados de origem animal e vegetal podem tornar-se contaminados com uma ampla variedade de espécies fúngicas dessas fontes. Sob condições favoráveis, os fungos podem crescer em diferentes tipos de alimentos (cereais, carne, leite, frutas, vegetais, grãos) e causar deterioração (Beuchat, 1992; Filtenborg et al., 1996; Taniwaki, 1996).

Os grãos devem ser armazenados com um conteúdo de umidade inferior a 0,70 de atividade de água. Dessa forma, a deterioração fúngica torna-se de difícil ocorrência (Magan et al., 2003).

O crescimento fúngico em grãos armazenados pode provocar: (1) diminuição do poder de germinação; (2) redução na quantidade de carboidratos, proteínas e gordura e aumento no teor de umidade e de ácidos graxos livres; (3) alteração da coloração, sabor e aroma, modificando a qualidade organoléptica dos alimentos; (4) produção de micotoxinas, metabólitos secundários que são prejudiciais à saúde do homem e de outros animais; (5) doenças ocupacionais (Bhattacharya & Raha, 2002; Bueno et al., 2004; Paster & Bullerman, 1988; Reddy & Shetty, 1992; Taniwaki et al., 1992).

A invasão fúngica em sementes e grãos pode ocorrer antes, durante ou após colheita. Dessa forma, pode ser dividida em dois grupos, de acordo com o momento da contaminação: fungos do campo, que infectam o produto ainda no campo; e fungos de armazenamento, que invadem a semente antes e durante o armazenamento. Os fungos de campo requerem um teor de umidade em equilíbrio com uma umidade relativa de 90-100% para crescerem. Os principais

gêneros são *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Nigrospora*, *Helminthosporium*, *Alternaria* e *Cladosporium*, que invadem grãos e sementes durante o amadurecimento. O dano é causado antes da colheita. Os fungos de armazenamento (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor*) são encontrados em armazéns, depósitos e silos e necessitam de teores de umidade ao redor de 16% (Bittar & Lázari, 1998; Ismail, 2000; Miller, 1995; Sinha & Sinha, 1991). Segundo Bueno et al. (2004), pode ser identificado um terceiro grupo durante o armazenamento de cereais, os fungos de deterioração avançada (*Papulospora*, *Sordaria*, *Fusarium graminearum* e membros da ordem *Mucorales*), que podem estar misturados com os outros gêneros citados anteriormente. Contudo, a fonte original dos fungos nas circunstâncias descritas é o campo (Miller, 1995).

Diferentemente do milho, em que fungos do gênero *Fusarium* predominam nas amostras pós-colheita e armazenadas, com níveis de infestação de 84 a 100% (Nicácio et al., 1995; Pozzi et al., 1995), na flora fúngica das sementes de amendoim, quase sempre o gênero *Aspergillus* é o mais freqüente.

No Brasil, em amostras de amendoim da região de Araraquara (São Paulo), espécies de *Aspergillus*, principalmente *Aspergillus flavus*, foram as mais isoladas. De 107 culturas isoladas, 102 foram identificadas como *A.flavus* (Fonseca et al., 1974).

Na Nigéria, em 4 variedades de amendoim, foi observado um grau de infestação na faixa de 68% a 86%, com predominância também de fungos do gênero *Aspergillus*, com destaque para o *A.flavus* (22,5%) e *A.niger* (16%). Espécies dos gêneros *Penicillium*, *Scopulariopsis* e *Trichoderma* foram também isolados (Collison et al., 1992).

Na Tailândia, Pitt et al. (1993) analisaram 109 amostras de amendoim. A contaminação fúngica média atingiu 44%, sendo o *Aspergillus flavus* (95% das amostras), *Aspergillus niger* (86%) e *Rhizopus Oryzae* (60%) os fungos que apresentaram a maior freqüência.

Aziz et al. (1994) analisando amostras de grãos de amendoim comercializadas no Cairo (Egito), verificaram que fungos do gênero *Aspergillus spp* foram os mais encontrados, com destaque para *A.flavus*, *A.parasiticus*, *A. niger* e *A.fumigatus*. Em proporções menores, fungos dos gêneros *Alternaria sp*, *Curvularia sp*, *Mucor sp* e *Rhizopus* também foram isolados. Novamente no Cairo (Egito), após análise de 25 amostras de amendoim em grão comercializados em diferentes pontos da cidade, *Aspergillus flavus* (96%) e *Aspergillus niger* (84%) foram os fungos mais isolados (Shahin & Aziz, 1997).

Em Havana (Cuba), o grau de contaminação de grãos de amendoim com fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* atingiu 87,83% (Jorge & Garzón, 1995).

Em Ghana, em amostras de amendoim de 10 regiões, foram observados altos níveis de infestação com *Aspergillus flavus*. A porcentagem atingiu 31,7% e 12,8% em sementes danificadas e não danificadas, respectivamente. Somente 0,2% do total das sementes analisadas apresentavam *A.parasiticus*. Outros fungos isolados foram *A.niger* (34,0%), *A.tamaritii* (3,9%), *Penicillium spp.* (5,2%), *Mucor sp* (2,3%), *Rhizopus stolonifer* (12,0%) (Awuah & Kpodo, 1996).

Resultados semelhantes foram registrados na Indonésia, onde em 256 amostras de amendoim analisadas, 251 (98,0%) apresentavam o *A.flavus*, e em 205 (80,0%), o *A. niger* (Pitt et al., 1998).

Em amostras de amendoim, coletadas em diferentes supermercados de dois países tropicais da África (Uganda, cidade de Kampala; Kênia, cidades de Nairobi e Nakuru), foram observados 69% e 74%, respectivamente, de infestação com fungos. *Aspergillus spp* (38,97%) foi o mais isolado (Ismail, 2000).

Aziz & Youssef (2002) avaliaram um total de 90 amostras de sementes, incluindo amendoim, de diferentes províncias do Egito, e verificaram que

Aspergillus flavus, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus niger* ocorreram em 62,2-95,6%.

Na Índia, Bhattacharya & Raha (2002) observaram durante um ano a microbiota fúngica de amendoim em grão. O grau inicial de infestação fúngica foi de 70%, atingindo 100% no final do experimento. Fungos de campo, com destaque para *Alternaria sp.* e *Curvularia sp.*, apresentaram 48% da contaminação, mas desapareceram após 6 meses. *A. niger* (55%), *A. ruber* (45%) e *A. flavus* (40%) foram inicialmente os mais abundantes. A incidência de *A. flavus* aumentou para 78%, mas *A. niger* declinou gradualmente para 40% e *A. ruber* desapareceu após o décimo mês. *A. chevalieri* aumentou de 15% para 40%, e então declinou até desaparecer após o oitavo mês. Ao contrário, o *A. candidus* apareceu apenas no sexto mês (10%) e aumentou para 43% no último mês.

Vaamonde et al. (2003) isolaram em 30 amostras de amendoim, cultivadas na província de Córdoba, área típica de produção da Argentina, 37 espécies de *A. flavus* e 30 de *A. parasiticus*.

Em Botswana (África) em amostras de amendoim cru, *Absidia sp* e *Rhizopus sp* foram os fungos mais comumente encontrados, seguidos de *Aspergillus sp* (35%), com *A. niger* sendo o mais prevalente (20,4%), *A. flavus* e *A. parasiticus*, com 8,5% de todos os isolados (Mphande et al., 2004).

2.3 Crescimento fúngico e produção de micotoxinas

A hifa, estrutura básica dos fungos filamentosos, está capacitada a utilizar substratos sólidos através do crescimento superficial e penetração em seu interior. Os fungos são capazes de secretar enzimas, quebrar compostos macromoleculares complexos e utilizar os produtos dessas reações para o seu crescimento e metabolismo. Podem ainda absorver nutrientes de baixo peso

molecular, os quais, obviamente, não estarão associados ao processo de metabolismo primário (Moss, 1996).

Somente nos últimos 30 anos tornou-se claro que o crescimento de fungos em alimentos e rações pode produzir toxinas, conhecidas como micotoxinas. São definidas como metabólitos secundários, ou seja, não apresentam nenhuma função no metabolismo normal que envolve o desenvolvimento dos fungos. São compostos de baixo peso molecular, produzidos no final da fase log de crescimento, e que provocam uma resposta tóxica em vertebrados e outros animais quando ingeridos em baixa concentração (Pitt, 2000).

A exposição de micotoxinas aos seres humanos pode ocorrer de uma forma direta, através da ingestão de alimentos vegetais, e indiretamente através de alimentos de origem animal, quando os animais consomem rações contaminadas. Algumas micotoxinas podem provocar uma degeneração da capacidade funcional de rins e fígado, enquanto outras são neurotóxicas ou afetam a síntese protéica, levando a uma variedade de efeitos que vão desde a sensibilidade ou necrose da pele até a uma extrema imunodeficiência (Sweeney & Dobson, 1998).

Está bem definido que micotoxinas não podem ser produzidas a menos que ocorra previamente o crescimento de fungos. Entretanto, a presença de fungos micotoxigênicos em um alimento, não significa automaticamente a presença de micotoxinas, mas simplesmente que existe um potencial para a sua produção. Por outro lado, a ausência de fungos toxigênicos não garante que o alimento esteja livre de micotoxinas, pois as mesmas podem persistir por longo tempo após a perda da viabilidade dos fungos (CAST, 2003).

Muitos dos fungos capazes de produzir micotoxinas são também freqüentes contaminantes de alimentos e produtos agrícolas. Os fungos micotoxigênicos associados com a cadeia alimentar abrangem basicamente três

gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Pitt et al., 2000). Os fungos pertencentes aos dois primeiros gêneros são comumente encontrados como contaminantes de alimentos durante a secagem e armazenamento enquanto o último é descrito como patógeno de plantas que produzem micotoxinas antes, ou imediatamente após a colheita (Sweeney & Dobson, 1999).

Três critérios devem ser preenchidos para caracterizar uma estreita relação entre toxicidade da micotoxina e importância para a saúde humana e animal: (1) o fungo produtor necessita ser de ampla ocorrência; (2) o fungo precisa crescer em alimentos e rações; (3) a produção de micotoxinas deve ocorrer em condições naturais, ou seja, onde o fungo é normalmente isolado, e não somente em ensaios laboratoriais, onde condições ideais como atividade de água e temperatura são oferecidas (Pitt, 2000).

Nesse contexto, é importante compreender que entre muitas micotoxinas conhecidas, 400 apresentam toxicidade. Cerca de vinte têm sido particularmente investigadas e somente 5 ou 6 são importantes do ponto de vista agrícola: as aflatoxinas (amendoim, milho), ocratoxina A (café), patulina (suco de maçã), fumonisinas (milho), desoxinivalenol (trigo) e zearalenona (milho). Esta lista, embora curta, implica em um vasto conhecimento científico, por envolver inúmeros fungos produtores e alimentos de grande poder nutricional e econômico (Pittet, 2001).

2.4 Fungos produtores de aflatoxinas

As aflatoxinas foram descobertas a cerca de 44 anos, quando em 1960 foi relatada, na Inglaterra, uma intoxicação em aves após consumo de rações que apresentavam farelo de amendoim proveniente do Brasil e da África. Ficou conhecida como "Doença X" dos perus, que provocou a morte de 100.000 perus e outros animais de fazenda. A causa da doença foi atribuída à contaminação da ração por fungo, denominado *Aspergillus flavus*. Análises posteriores revelaram

que compostos fluorescentes, denominados posteriormente como aflatoxinas, foram os responsáveis pela morte dos animais (Rustom, 1997; Sargeant et al., 1961; Zaika & Buchanan, 1987).

As aflatoxinas representam a principal classe de micotoxinas e são produzidas por quatro espécies de fungos do gênero *Aspergillus*. Essas espécies são *A.flavus*, *A.parasiticus*, *A.nomius* e *A.pseudotamarii*. Dessas quatro espécies, apenas *A.flavus* e *A.parasiticus* são economicamente importantes. Estes fungos têm a habilidade de se desenvolver em áreas de temperaturas elevadas e baixas umidades e contaminar um grande número de alimentos (CAST, 2003; Kurtzman et al., 1987; Ito et al., 2001).

A.flavus e *A.parasiticus* apresentam uma particular afinidade por grãos e sementes oleaginosas. Amendoim, milho e algodão são as três mais importantes afetadas. Trabalhos mais antigos relatam que a produção de aflatoxinas está associada a condições inadequadas de secagem e armazenamento. Realmente estes fatores são certamente importantes na ocorrência das aflatoxinas em áreas úmidas e tropicais. Entretanto, em zonas temperadas, estudos mais recentes mostram que o estresse pela secura, o ataque de insetos e a umidade do solo estão associados à invasão fúngica e à produção de aflatoxinas antes da colheita. A competição microbiana também é um fator que influencia a produção de aflatoxinas. (CAST, 2003; ICMSF, 1996; Pitt, 2000; Pittet, 2001).

As aflatoxinas são um grupo de pelo menos 16 derivados bisfuranoisocumarínicos, sendo as 4 principais naturalmente produzidas, as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. A aflatoxina B₁, entre todas as aflatoxinas, é usualmente a toxina de maior ocorrência e concentração presente nos alimentos. A nomenclatura B e G é função das fluorescências de cor azul e verde, respectivamente, que são produzidas, quando essas toxinas, adsorvidas em placas de sílica gel 60G, são expostas à lâmpada de ultravioleta de comprimento de onda 366 nm (Sweeney & Dobson, 1999).

2.4.1 Biossíntese de aflatoxinas

O caminho biossintético das aflatoxinas está praticamente entendido e tem sido descrito em uma série de artigos e revisões (Bhatnagar et al., 2003; Sweeney & Dubson, 1998; Sweeney & Dubson, 1999; Yu et al., 2002). Inicialmente, acetato e malonil CoA são convertidos em uma unidade de hexanoil CoA por um ácido graxo sintetase, a qual é transformada por uma policetídeo sintetase a ácido norsolorínico, que é o primeiro precursor estável na biossíntese das aflatoxinas. O policetídeo sofre então aproximadamente 12-17 conversões enzimáticas, levando a formação de Versicolorina B. Segue-se então uma rota com a formação de Versicolorina A, dimetilesterigmatocistina, esterigmatocistina, O-metilesterigmatocistina, aflatoxina B₁ e aflatoxina G₁. O outro caminho envolve a conversão de Versicolorina B, dihidrodimetilesterigmatocistina, dihidroesterigmatocistina, dihidro-O-metilesterigmatocistina, aflatoxina B₂ e aflatoxina G₂.

2.4.2 *Aspergillus* e aflatoxinas

De acordo com Pitt (1993), *A.flavus* produz aflatoxinas tipo B (B₁ e B₂), ácido ciclopiazônico, ambos ou nenhuma. Geralmente, aflatoxinas tipo G (G₁ e G₂) não são produzidas por estas espécies, embora em alguns relatos ter sido mencionado produção de aflatoxinas G por isolados identificados como *A.flavus* (Vaamonde et al., 1995; Mphande et al., 2004; Takahashi et al., 2004).

As espécies de *A.flavus* podem ser divididas em dois grupos: as cepas S que produzem numerosos esclerócios pequenos (< 400 µm de diâmetro) e grandes quantidades de aflatoxinas, e as cepas L, que produzem menos esclerócios, mas são maiores (> 400 µm de diâmetro) e com menos aflatoxinas. Isolados típicos (cepas L) podem produzir somente aflatoxinas B ou nenhuma aflatoxina (Egel & Cotty, 1994), enquanto todas as cepas S produzem grandes quantidades de aflatoxinas, algumas produzindo somente B e outras produzindo

B e G (Egel et al., 1994; Cotty & Cardwell, 1999; Horn & Dörner, 1999). Os esclerócios são aglomerados de hifas, pigmentados, que resistem a condições ambientais desfavoráveis e capazes de permanecerem dormentes por um longo período de tempo. Nem todos os isolados de *A.flavus* e *A.parasiticus* que produzem aflatoxinas apresentam esclerócios (Bennett et al., 1979). Resultados obtidos por Geiser et al. (2000) através de análise filogenética confirmam os grupos I e II dentro do *A.flavus*. Quase todas as espécies do Grupo I produziram aflatoxinas B e nenhuma aflatoxina G. Quatro das seis espécies do Grupo II produziram aflatoxinas B e G. Todos os isolados do Grupo II apresentavam o fenótipo de esclerócio S, enquanto espécies do Grupo I consistiam na forma S e L.

Os isolados de *Aspergillus parasiticus* consistentemente produzem as aflatoxinas B e G, mas não produzem ácido ciclopiazônico (Moss, 1996; Pitt, 1993). *A.nomius* é morfológicamente muito parecido com o *A.flavus*, mas produz as aflatoxinas B e G como o *A.parasiticus*. Isolados de *A.nomius* não foram caracterizados como produtores de ácido ciclopiazônico por Vaamonde et al. (2003).

Vaamonde et. al (2003) avaliaram espécies de *A.flavus* e *A.parasiticus* isolados de 30 amostras de amendoim cultivados em Córdoba, Argentina. Foram caracterizadas 67 espécies, sendo 37 de *A.flavus* e 30 de *A.parasiticus*. As espécies de *A.parasiticus* foram caracterizadas como tipicamente aflatoxigênicas, produzindo ambas as aflatoxinas B e G, mas não ácido ciclopiazônico. Nesse estudo, somente dois isolados de *A.parasiticus* foram não aflatoxigênicos. Em relação ao *A.flavus*, considerável variabilidade foi encontrada em sua potencialidade de produzir micotoxinas. Dos 37 isolados de *A.flavus*, 20 (54%) produziram somente aflatoxinas B e ácido ciclopiazônico e 5 (13%), aflatoxinas B e G e ácido ciclopiazônico. Essas espécies produziram também esclerócios tipo S de *A.flavus*. Em um levantamento conduzido por

Cotty & Cardwell (1999), foi encontrado que mais de 40% dos isolados S da África Ocidental produziram ambas as aflatoxinas B e G, enquanto as espécies S do norte da América produziram somente aflatoxinas B.

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

O crescimento fúngico e a produção de aflatoxinas são uma consequência da interação entre fungo, hospedeiro e ambiente. A combinação apropriada desses fatores determina o grau de colonização do substrato, o tipo e a quantidade de micotoxina que será produzida (Gourama & Bullerman, 1995; Pitt et al., 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. Evitar o acúmulo de toxinas em grãos armazenados e sementes oleaginosas depende primariamente do controle da umidade. Se o produto está muito seco para permitir qualquer crescimento fúngico, e permanece armazenado nessa condição, possivelmente nenhuma deterioração ocorrerá. Contudo, a presença de insetos e roedores pode levar a um aumento da umidade, com a conseqüente formação de micotoxina (CAST, 2003).

A contaminação com aflatoxinas no campo é muito difícil de controlar porque é influenciada primariamente por condições climáticas tais como umidade relativa e temperatura. Umidade do solo, estresse pela secura, dano por inseto e deficiência na nutrição mineral são também fatores que podem gerar produtos contaminados, principalmente em áreas de clima temperado (Moss, 1991; Northolt & Bullerman, 1982; Pitt, 2000).

Contudo, percebe-se que os altos níveis de contaminação com aflatoxinas estão associados com o crescimento pós-colheita de fungos

(*Aspergillus*) e o armazenamento em condições inadequadas. Isso parece ser extremamente comum em países tropicais e subtropicais, com clima quente e úmido (Bhat, 1988).

A atividade de água e a temperatura são os mais importantes fatores que controlam o crescimento fúngico e a produção de aflatoxinas pelo *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* em alimentos (Northolt et al., 1977; CAST, 2003; Chiou et al., 1984; Uboldi Eiroa, 1979).

Hill et al., citados por Moss (1996), avaliando dados publicados de vários isolados de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, compararam a atividade de água (A_w) e temperatura necessária para o crescimento e a produção de aflatoxina. Foi demonstrado que os valores ótimos para crescimento (36°C e A_w 0,95) e produção de aflatoxina (33°C e A_a 0,99) não são os mesmos, revelando que os diferentes tipos de linhagens explicam essas variações.

O *Aspergillus flavus*, fungo comum do solo, não é muito resistente ao calor, apresentando um valor D_{10} de 40 minutos a 52°C e < 1 minuto a 60°C . De uma forma geral, o crescimento inicia a uma temperatura próxima de 10°C ou um pouco acima e continua até cerca de 43°C . O ótimo de crescimento ocorre a uma temperatura em torno de 33°C . A aflatoxina é produzida em uma faixa de temperatura de $15-37^\circ\text{C}$, mas nenhum ótimo de temperatura pode ser especificado. Quanto a A_w , valores de 0,80 e 0,82 são necessários para o crescimento e produção de aflatoxinas, respectivamente. Esses valores correspondem aproximadamente, a um teor de umidade do grão de amendoim de 10-10,5%. Em atividade de água de 0,99, crescimento e produção de aflatoxinas atingem normalmente o máximo. A influência dos principais fatores ambientais no crescimento e produção de aflatoxinas pelo *Aspergillus parasiticus* são similares aos descritos anteriormente para o *Aspergillus flavus*. A temperatura ótima para crescimento é de cerca de 30°C , e para produção de aflatoxina, de $14-35^\circ\text{C}$. Os valores de atividade de água para crescimento e produção de aflatoxina

pelo *A.parasiticus* estão na faixa de 0,80-0,83 e 0,86-0,87, respectivamente, mostrando que o *A.flavus* suporta condições mais adversas que o *A.parasiticus* (ICMSF, 1996).

O crescimento fúngico e a produção de aflatoxinas B₁ e G₁, a partir de dois isolados de *A.flavus* em meio de Wort, foram avaliados a 2, 7, 13, 18, 24, 29, 35, 41, 46 e 52°C. O máximo de produção ocorreu a 24°C e o máximo de crescimento, de 29 a 35°C. Observou-se também que o máximo de crescimento não estava correlacionado com o máximo de produção de aflatoxinas e, em certas temperaturas boas para crescimento, não foi verificada qualquer produção de aflatoxinas. A 41°C um crescimento intenso foi observado sem qualquer produção de aflatoxina. Não foi registrada produção de aflatoxinas nas temperaturas de 2, 7, 41, 46 e 52°C (Schindler et al., 1967).

Diener & Davis (1967) observaram, após inoculação com *Aspergillus flavus* em grãos de amendoim e incubação a 97-99% de umidade relativa, por 21 dias, nas temperaturas de 5, 10, 12, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 43, 46, 49, 52 e 55°C, que não havia produção de aflatoxinas a uma temperatura de 12°C ou menor e a 43°C ou superior. Os maiores níveis de aflatoxinas foram registrados na faixa de temperatura de 20 a 35°C.

Amendoim em grão foi inoculado separadamente com 4 isolados de *Aspergillus flavus* aflatoxigênicos e incubado em uma faixa de temperatura de 10 a 40°C com intervalos de 5°C. A cada 24 horas efetuou-se a quantificação de aflatoxinas em cada um dos tratamentos, em um intervalo de 10 dias. A concentração máxima foi alcançada, conforme a espécie, entre o sexto e o décimo dia de incubação e nas temperaturas de 20°C e 25°C. Somente pequena quantidade de aflatoxina foi produzida a 10°C e 40°C (Schroeder & Hein, 1967).

Mislivec et al. (1975) verificaram o efeito da temperatura (4, 8, 12, 16, 26, 30 e 37°C) e umidade relativa (79, 81, 83, 86, 90, 95 e 100%) na germinação de esporos de diferentes espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*. Os resultados

indicaram que a uma temperatura de 8°C e umidade relativa de 86%, não havia germinação em qualquer das espécies estudadas, inclusive o *Aspergillus flavus*.

Estudos conduzidos por Northolt et al. (1977) com cepas toxigênicas e não toxigênicas de *A.flavus*, em meios de ágar extrato de malte suplementado com sacarose ou glicerina, em temperaturas de 10, 13, 16, 24, 31 e 37°C e atividade de água de 0,83, 0,87, 0,92, 0,95 e 0,99, revelaram inicialmente que não havia diferença significativa entre o crescimento das espécies toxigênicas e não toxigênicas. Os maiores níveis de aflatoxinas foram alcançados na faixa de temperatura de 13-16°C, 16-24°C e 31°C, dependendo da espécie fúngica.

Park & Bullerman (1983) verificaram o efeito da temperatura (5, 15 e 25°C) na produção de aflatoxinas pelo *A.flavus* e *A.parasiticus* após 10 e 21 dias de incubação, em diferentes substratos (soja, arroz, queijo Cheddar, requeijão, iogurte). Este estudo revelou que alimentos com alto teor de proteína e baixo nível de carboidrato não apresentavam níveis elevados de aflatoxinas pelo *A.parasiticus*, embora fossem observados crescimento e esporulação. Entretanto, mesmo em pequenos teores de carboidratos, o *A.flavus* foi capaz de produzir aflatoxinas em níveis elevados a 15 e 25°C. Não foram observados crescimento fúngico e produção de aflatoxinas a 5°C.

A inoculação de *A.flavus* e *A.parasiticus* em amendoim moído, previamente esterilizado a 121°C/15 minutos e incubado em temperaturas de 10, 20, 30 e 35°C, por 14 dias, proporcionou, a 30°C, a maior produção de aflatoxina. A 10°C verificou-se uma produção muito discreta de aflatoxinas (Ogundero, 1987).

Prado et al. (1991) avaliaram a produção de aflatoxinas em amendoim *in natura*, genótipo Tatu Vermelho, o mais cultivado no Brasil, em diferentes valores de atividade de água (0,75, 0,83, 0,86, 0,93 e 0,97), a temperatura ambiente por 120 dias. Não houve produção de aflatoxinas em atividade de água inferior a 0,86.

2.4.4 Características físicas e químicas das aflatoxinas

As aflatoxinas são um grupo de metabólitos secundários que apresentam uma estrutura bisfuranocumarina (Schmidt & Esser, 1985), conforme mostrado em Anexos, Figura 1, página 182.

As aflatoxinas são relativamente estáveis ao calor, sendo inativadas apenas em temperaturas superiores a 250°C (Ellis et al., 1991).

As aflatoxinas são ligeiramente solúveis em água, insolúveis em solventes não polares e bastante solúveis em solventes moderadamente polares como clorofórmio, metanol e dimetilsulfóxido. São relativamente instáveis, como substâncias puras, à luz e ao ar. Pouca ou nenhuma destruição de aflatoxinas ocorre em condições normais de cozimento, mas são destruídas por tratamento com amônia e hipoclorito (WHO, 1979).

2.4.5 Metabolismo e aspectos toxicológicos das aflatoxinas

Aflatoxinas têm sido descritas como tendo atividade imunossupressora, mutagênica, teratogênica e hepatocarcinogênica (Atroshi et al., 2002; Yu et al., 2002).

Micotoxicose é a doença resultante da exposição à micotoxina pela ingestão de rações e alimentos contaminados. Entretanto, outras fontes, tais como inalação, contato pela pele, devem ser consideradas. Recentemente, na Croácia, foram isoladas, de pacientes com aspergiloma pulmonar (7 homens e 4 mulheres), 3 espécies de *Aspergillus fumigatus* e duas de *Aspergillus versicolor*. Aflatoxina B₁ foi encontrada nos extratos de cultura de todas as espécies. Aflatoxina G₁ foi produzida por duas das espécies de *A.fumigatus* e esterigmatocistina (precursor final da aflatoxina) nos dois extratos de *A. versicolor*. Sabe-se que a produção das toxinas não reflete necessariamente o que estes fungos podem produzir *in vivo*. Entretanto, os efeitos imunitóxicos, os quais favorecem infecções, não podem ser excluídos (Pepeljnjak et al., 2004).

A intoxicação por aflatoxinas pode ser aguda ou crônica. Na aflatoxicose aguda, os sintomas incluem febre baixa, depressão, anorexia e diarreia, com degeneração gordurosa no fígado e necrose. A atividade das enzimas hepáticas pode ser interrompida, resultando em alterações do metabolismo de carboidratos, lípidos e síntese de proteínas. A aflatoxicose crônica, como resultado da exposição de pequenas doses de aflatoxinas por um período longo de tempo, está associada, em seres humanos, ao carcinoma hepatocelular (Bingham et al., 2003; CAST, 2003).

A aflatoxina B₁ foi classificada como carcinógeno tipo 1, sendo considerada um dos principais fatores de risco para carcinoma hepatocelular (HCC). O HCC é o quinto mais comum câncer no mundo, com uma estimativa de 473.000 novos casos anualmente. Muitos pacientes sobrevivem menos de 1 ano após o diagnóstico. Na China, 235.000 novos casos dessa doença ocorrem anualmente, representando cerca de 50% do total mundial (IARC, 1993; Wild & Hall, 2000; Setlow, 2001; Wang et al., 2001).

A aflatoxina, após ingestão, é absorvida no intestino e transportada ao fígado, onde é metabolizada. A excreção da aflatoxina B₁ ocorre primariamente através das vias biliares e, em menor extensão, no trato urinário e no leite de animais em lactação, na forma de aflatoxinas M₁, P₁ e Q₁ (Wild & Turner, 2002).

A transformação da aflatoxina B₁ envolve ativação e detoxificação e ocorre em duas fases: (1) transformação da toxina em metabólitos e (2) conversão de metabólitos para um conjugado solúvel em água ou ligado a macromoléculas. A ativação da aflatoxina B₁ é feita pelo sistema citocromo P450 com a formação da aflatoxina B₁-8,9-epóxido ou aflatoxina B₁-8,9-dihidrodiol. A carcinogenicidade da aflatoxina B₁ surge da interação da aflatoxina B₁-8,9-epóxido com a guanina do DNA, formando a ligação aflatoxina-N7-guanina. A toxicidade aguda da aflatoxina B₁ parece ser função da interação da aflatoxina B₁-8,9-dihidrodiol com grupos amino de proteínas. A

aflatoxina B₁-8,9-epóxido é também capaz de se ligar a resíduos de lisina da albumina do soro (AFB-albumina). Já a detoxificação da aflatoxina B₁ ocorre pela conversão em metabólitos menos ativos, tais como aflatoxina M₁, Q₁ e P₁, e através da conjugação da aflatoxina B₁-8,9-epóxido com glutatona, com formação de aflatoxina B₁-ácido mercaptúrico, altamente solúvel em água, em uma reação catalisada pela glutatona S-transferase. Dessa forma, os biomarcadores de exposição à aflatoxina incluem metabólitos urinários como AFB₁-N⁷-gua, AFM₁, AFB₁-ácido mercaptúrico e, no soro, AFB-albumina. Em virtude da maior vida média circulante da albumina, a ligação AFB₁-albumina tem sido utilizada como um biomarcador de exposição crônica à aflatoxina em estudos epidemiológicos. Na África Ocidental (Benin e Togo) foi observada, em crianças, uma correlação entre consumo de milho na semana que precedeu o ensaio e o biomarcador AFB₁-albumina. Essa ligação foi detectada em 475/479 das crianças entre menos de 1 ano a 5 anos (Moss, 1996; Wild & Turner, 2002; Gong et al., 2003; Sudakin, 2003).

Clorofilina (CHL), uma forma hidrosolúvel da clorofila, tem sido avaliada ultimamente em populações de alto risco para exposição à aflatoxina. Imagina-se que a CHL forma complexo molecular com as aflatoxinas, alterando a sua biodisponibilidade. No tratamento clínico, a administração de CHL três vezes ao dia reduz em 50% o nível médio da excreção urinária da aflatoxina-N⁷-guanina, comparado ao placebo (Egner et al., 2003).

Na cidade de Florianópolis (Santa Catarina), no período de 1980 a 1999, o HCC correspondeu a 122 casos (Haas & Scussel, 2000). Em São Paulo, no período de festas juninas, em junho de 1999, amostras de sangue colhidas em um Hospital de Referência Oncológica (total: 50, sendo 29 de homens e 21 de mulheres), mais de 62% apresentaram o aduto AFB-albumina (31/50). Os níveis oscilaram de 3 a 57,3 pg mg⁻¹, com um teor médio de 14,9 pg mg⁻¹. Por outro lado, em 16,1% das amostras foram encontrados níveis intermediários,

considerados ainda altos, entre 22,7 e 31,0 pg mg⁻¹ de AFB-albumina (Haas & Scussel, 2004).

Estudos de epidemiologia molecular têm mostrado uma ligação direta entre câncer e exposição ao carcinógeno. O gen p53 está localizado no cromossomo 17 e codifica para uma proteína supressora de tumor com 393 aminoácidos. Em cânceres humanos, o gen p53 está frequentemente alterado, revelando uma evidência de causa efeito para radiação ultravioleta em câncer de pele, tabaco em câncer de pulmão e aflatoxina B₁ em hepatocarcinoma. Estudos têm demonstrado que há uma correlação entre aqueles tumores e mutação (AGG-AGT) no códon 249 do gen p53. Essa alteração também está presente em culturas de hepatócitos humanos expostos à aflatoxina B₁. Em regiões da China, onde exposição com aflatoxina é alta, a mutação no códon 249 foi observada em mais de 50% dos hepatocarcinomas, comparados com menos de 10% em regiões de baixa exposição. Nas áreas geográficas de baixa exposição a aflatoxinas (Japão, Coréia, Europa e América do Norte), a prevalência dessa mutação é inferior a 1% (CAST, 2003; Goldman & Shields, 2003; Pitt et al., 2000; Sudakin, 2003; Wild & Turner, 2002).

Em animais, a grande maioria das micotoxicoses apresenta características subclínicas, cujas alterações dificilmente são percebidas na inspeção animal. Os sintomas da aflatoxicose aguda poderão iniciar 6 horas após a ingestão, traduzindo-se por severa depressão, inapetência, presença de sangue nas fezes, tremores musculares e hipertemia (até 41°C), podendo ocorrer morte em 12 a 24 horas. A intoxicação crônica manifesta-se pela diminuição no ganho de peso e redução da conversão alimentar. Em frangos e poedeiras ocorre extrema palidez das mucosas e pernas ("síndrome da ave pálida"), como resultado da menor absorção, diminuição no transporte e deposição tecidual dos carotenóides. Ocorre redução da produção e do tamanho dos ovos (Dilkin & Mallmann, 2004).

2.4.6 Ocorrência de aflatoxinas

A literatura publicada sobre a incidência de aflatoxinas em alimentos naturais e processados está repleta de informações, principalmente em amendoim, milho, algodão, nozes, pistache, para os quais os níveis atingem freqüentemente de 1 a 10 ng g⁻¹, mas podem ocasionalmente ser detectados níveis de 10 a 100 ng g⁻¹ ou superiores. Outros produtos que são descritos como de baixo risco de contaminação com aflatoxinas incluem: figos, condimentos, mandioca, arroz, feijão soja, sorgo, trigo, cevada e centeio. Entretanto, aflatoxinas podem ocorrer em qualquer desses alimentos, desde que condições ótimas de umidade e temperatura e infestação de insetos e roedores estejam presentes nos locais de armazenamento (CAST, 2003; Pittet, 2000).

No Brasil, a incidência de aflatoxinas em alimentos e rações é tema de inúmeros trabalhos científicos e continua sendo a toxina mais pesquisada.

Tango et al. (1965) verificaram os níveis de aflatoxinas em 37 amostras de amendoim provenientes da estação das águas (janeiro/fevereiro) e 35 da época da seca (junho/julho). Valores superiores a 2000 µg kg⁻¹ foram observados em 24,3% e 14,3% das amostras da safra das águas e seca, respectivamente. Foi verificada também uma correlação positiva entre teor de aflatoxina e índice de ácidos graxos livres.

Em 1968, aflatoxinas B₁ e G₁ foram quantificadas em 264 amostras de torta e farinha de amendoim, provenientes de 40 indústrias de extração de óleo do Estado de São Paulo. Todas as amostras apresentavam aflatoxinas, sendo que em duas o valor alcançou 2000 µg kg⁻¹. Níveis acima de 1000 µg kg⁻¹ foram detectadas em 89,8% das amostras analisadas (Fonseca, 1968).

Pregnoletto & Sabino (1969/70) analisaram 32 amostras de alimentos (pé de moleque, paçoca, amendoim cru e torrado e amendoim japonês) e 20 apresentaram aflatoxinas. Os autores verificaram, também, que entre 130

amostras de rações, 104 estavam contaminadas. Os níveis, entretanto, não foram registrados.

Dando seqüência ao estudo da incidência de aflatoxinas em alimentos (amendoim e derivados, farinha de soja, de mandioca, arroz, aveia, milho e trigo) e rações no Estado de São Paulo, Sabino (1980) detectou níveis que variaram de não detectado a $7800 \mu\text{g kg}^{-1}$. De 1971-1975, de 1976-1977, em 1978 e em 1979, de 300, 161, 61 e 50 amostras analisadas, 37, 13,6, 13,0 e 10,0% apresentaram contaminação com aflatoxina B₁. Em outro estudo, o mesmo grupo avaliou a incidência de aflatoxinas em 50 amostras de pasta de amendoim e 106 de paçoca (54 industrializadas e 52 de origem caseira), provenientes de diferentes municípios do Estado de São Paulo. Vinte amostras de pasta de amendoim estavam contaminadas com aflatoxina B₁ na faixa de 8 a $278 \mu\text{g kg}^{-1}$. Vinte e sete amostras de paçoca industrializada estavam contaminadas com aflatoxina B₁ na faixa de 8 a $220 \mu\text{g kg}^{-1}$, e das 52 de origem caseira, 42 apresentavam valores de aflatoxina B₁ entre 8 e $260 \mu\text{g kg}^{-1}$. A porcentagem de contaminação para pasta de amendoim, paçoca industrializada e caseira, que ultrapassou o limite de tolerância máxima de $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ (B₁ + G₁), de acordo com a legislação na época em vigor (Brasil, 1977), foi de 18, 23 e 26%, respectivamente (Sabino et al., 1982).

Em Belo Horizonte, em 1982, foram analisadas 107 amostras de amendoim e derivados. Em 66 (62%) foi detectada aflatoxina B₁, sendo que em 47 (44%) o valor encontrado foi superior ao limite máximo de $30 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os valores variaram de 6 a $633 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Prado, 1983).

Em Campinas, no período de 1980-1982, foram analisadas por Scussel & Rodriguez-Amaya (1985) amostras de amendoim e seus produtos. Das 241 amostras, 128 apresentaram resultados positivos, dos quais 92 excediam o máximo de aflatoxina de $30 \mu\text{g kg}^{-1}$.

No período de 1980-1987, foram analisadas 1374 amostras de amendoim e derivados comercializados na cidade de São Paulo. O nível de incidência, bem como os valores de aflatoxinas, variaram de ano para ano. A maior incidência ocorreu em 1981, quando 71% das 132 amostras analisadas foram positivas para aflatoxinas, em uma faixa de 8-2500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e média de 74 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A mais alta média (333 $\mu\text{g kg}^{-1}$) foi observada em 1983, quando 49% das 198 amostras analisadas foram positivas, em uma faixa de 8 a 864 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Sabino et al., 1989).

Prado et al. (1989) quantificaram aflatoxinas em 400 amostras de amendoim *in natura*, comercializadas em Belo Horizonte (MG), no período de 1983-1988. A maior incidência foi observada em 1986, quando 75% das amostras analisadas (44/33) apresentaram aflatoxinas B₁ e G₁. Os maiores níveis de contaminação para aflatoxina B₁ e G₁ foram em 1988, com média de 369 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 175 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Observou-se também, em 1988, a maior porcentagem (71%) de amostras analisadas, com valores superiores ao limite máximo de 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Dando seqüência à avaliação da presença de aflatoxina em amendoim e derivados, em São Paulo, 137 amostras foram analisadas no período de 1995/1997. Sessenta e duas amostras (45,3%) foram positivas para aflatoxinas e 37 (27%) apresentaram valores acima do limite máximo da legislação brasileira de 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para aflatoxina B₁ e G₁. Para amendoim cru a faixa de aflatoxina foi 5 a 382 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Sabino et al., 1999).

No Rio Grande do Sul, Braga et al. (2000) avaliaram, no período de 1998/1999, 210 amostras de amendoim e derivados, sendo 114 fabricadas no estado e 96 de outros locais do Brasil. Os resultados obtidos mostraram que 35% do total das amostras estavam com valores de aflatoxinas superiores ao limite de tolerância máxima de 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e que as amostras locais apresentavam uma maior contaminação.

Santos et al. (2001) avaliaram o grau de contaminação por aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José do Rio Preto/SP, no período de agosto de 1990 a dezembro de 2000. Das 178 amostras analisadas, 70 (39,3%) apresentaram contaminação por aflatoxinas e 59 (33,2%) apresentaram valores superiores a $30 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os resultados mostraram que 22 (12,4%) das amostras contaminadas continham teores entre 31 a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, 28 (15,8%) teores entre 101 a $300 \mu\text{g kg}^{-1}$ e 10 (5,6%) entre 301 a $1255 \mu\text{g kg}^{-1}$.

No período de julho de 1998 a dezembro de 2001 foram analisadas, no Distrito Federal, 104 amostras de amendoim e derivados. Em 51 (49%) foram detectadas aflatoxinas. Os níveis médios mais altos foram para amendoim cru e paçoca, com valores de 107 e $84 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. A faixa de contaminação variou entre 13 e $1710 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Caldas et al., 2002).

Nos anos de 1998 a 2000, 120 amostras de amendoim e derivados foram coletadas em diferentes municípios de Minas Gerais para verificar a ocorrência de aflatoxinas. Foram detectadas em 66 amostras (55%), sendo as médias encontradas para aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ de 334, 82, 64 e $21 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. A faixa de contaminação para aflatoxina total foi de 3 a $2714 \mu\text{g kg}^{-1}$ e a média, $960 \mu\text{g kg}^{-1}$. A aflatoxina B₁ foi encontrada em todas as amostras positivas (Oliveira et al., 2002). Dando seqüência ao monitoramento sistemático de aflatoxinas em alimentos em Minas Gerais, este mesmo grupo avaliou novamente os níveis de aflatoxinas em amendoim e derivados, no período de 2001 a 2004. Foi observada uma redução da porcentagem de amostras contaminadas, atingindo 20% e 17% das 45 e 79 analisadas em 2003 e 2004, respectivamente. Entretanto, a média de aflatoxina total (B₁, B₂, G₁ e G₂) de $187,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ e a faixa de 10,5 a $425,5 \mu\text{g kg}^{-1}$, em 2003, e a média de $186,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ e a faixa de 11,3 a $677,2 \mu\text{g kg}^{-1}$, em 2004, continuam com níveis elevados de contaminação (Dados não publicados).

Aflatoxinas em amendoim e derivados continuam a ser um problema sério no Brasil, embora a extensão e os níveis atuais estejam inferiores aos relatados nas últimas décadas (Sabino & Rodriguez-Amaya, 1993; Rodriguez-Amaya & Sabino, 2002).

2.4.7 Prevenção e controle das aflatoxinas em amendoim

O controle das micotoxinas é uma etapa muito complexa, desde que envolve uma grande variedade de estruturas químicas, em diferentes substratos e operações de processamento. Não há um único método que garanta a remoção completa dos contaminantes.

É difícil estabelecer regras e estratégias para o controle das aflatoxinas porque estas são produzidas antes e após colheita por diferentes tipos de fungos e em diferentes substratos. Atualmente, nenhum controle absoluto está disponível para eliminar a contaminação por aflatoxinas. Embora, práticas agrícolas como rotação de culturas e controle de doenças e pragas sejam recomendadas para evitar a produção de toxinas durante o crescimento da planta, colheita, armazenamento e distribuição, o potencial para uma possível contaminação ainda persiste. Então, a maneira mais efetiva para evitar estas toxinas envolveria a remoção e/ou a destruição da fonte contaminadora e o contaminante, se estiver presente. Dessa forma, desenvolvimento e implementação eficiente de métodos de descontaminação tornam-se da maior importância (CAST, 2003; Samarajeewa et al., 1990).

Pode-se afirmar que existem três estratégias fundamentais para evitar as conseqüências da presença de aflatoxinas em alimentos: (a) prevenção da contaminação da aflatoxina em amendoim; (b) a remoção ou destruição física ou química da aflatoxina; e (c) a degradação biológica de micotoxinas (Bata & Lasztity, 1999).

2.4.7.1 Prevenção da contaminação da aflatoxina em amendoim

Qualquer prática agrícola que aumente o desenvolvimento e qualidade da planta e diminua a infestação fúngica, contribuirá efetivamente para o decréscimo da contaminação por aflatoxinas em amendoim. Isso envolve:

(1) utilização de cultivares resistentes. Apesar de diversos trabalhos relatarem que alguns genótipos apresentam uma maior resistência à produção de aflatoxinas, não há disponibilidade deles comercialmente (Mehan et al., 1986; Mixon, 1986; Prado et al., 1996a,b; Prado et al., 1998; Prado et al., 1999). Entretanto, cultivares de ciclo mais longo (entre 125 e 140 dias) permitem que a época da colheita coincida com um período menos chuvoso, facilitando as operações de colheita e secagem. Do mesmo modo, cultivares de porte rasteiro permitem que a operação de arranquio e inversão (enleiramento das plantas) seja totalmente mecanizada, com um menor risco de danos às vagens (Godoy et al., 2001);

(2) prevenção do estresse hídrico. A cultura deve ser conduzida em condições que evitem os períodos de estiagem prolongada porque estes provocam danos aos tecidos da casca e da película dos grãos, criando "portas de entrada" para os fungos do solo. Quando o teor de umidade é adequado, o grão de amendoim apresentará uma alta atividade de água ($> 0,95$), o que possibilitará a formação pela planta de fitoalexinas, que inibem o crescimento fúngico e a produção de aflatoxina. Entretanto, quando amendoim é submetido a um estresse hídrico, a atividade de água diminui ($< 0,95$) e ocorre uma redução no teor de fitoalexinas, o que favorece a infestação e a produção de aflatoxina. Paralelamente, nessas condições, a temperatura do solo aumenta e acelera a perda de umidade do grão, o que favorece o crescimento do *A.flavus* e a produção de aflatoxinas (Dorner et al., 1989; Godoy et al., 2001);

(3) execução da colheita no ponto ótimo de maturação, evitando danos mecânicos por onde os fungos podem penetrar. A colheita prematura aumenta a

proporção de vagens e sementes imaturas e mal desenvolvidas, o que dificulta a secagem e favorece os fungos. Nem elevada temperatura sozinha nem o estresse hídrico sozinhos causam contaminação por aflatoxina em grãos sãos e maduros (Godoy et al., 2001; Hill et al., 1983);

(4) outros procedimentos como limpeza, controle de insetos e uso adequado de fungicidas são importantes para diminuir ou manter a aflatoxina em níveis mínimos de contaminação. O próprio controle bem feito das doenças das folhas promove o vigor das plantas nos esporões e nas vagens, previne a germinação precoce (porta de entrada para fungos) e reduz o acúmulo de folhas no solo (CAST, 2003; Godoy et al., 2001);

(5) suplementação do solo com cálcio, na forma de sulfato de cálcio. A espessura da casca da semente do amendoim aumenta, ocasionando uma menor porcentagem de grãos infectados com *Aspergillus spp*, *Penicillium spp* e *Rhizopus spp* quando os grãos são secos no campo. Em lotes de sementes contaminadas com aflatoxinas, as maiores concentrações são encontradas entre as sementes enrugadas e mal desenvolvidas (Godoy et al., 2001; Fernandez et al., 1997);

(6) aplicação no solo de espécies de *A.flavus* e *A.parasiticus* não aflatoxigênicas é capaz de reduzir a contaminação com aflatoxina em amendoim antes da colheita (Dorner et al., 1992; Dorner et al., 2003). Entretanto, este tipo de pesquisa não está bem dominado;

(7) secagem do amendoim no campo ou utilizando secadores artificiais. São utilizados equipamentos com fluxo de ar quente (temperatura em torno de 35°C) e em posição estática. Movimentos de rotação podem romper as células dos grãos e provocar a oxidação do óleo, depreciando o produto. A secagem deve reduzir a umidade de 40-50% a 8%. Nessa condição a produção de aflatoxina não ocorre (Godoy et al., 2001).

2.4.7.2 Remoção ou destruição física e química da aflatoxina

Os procedimentos que são utilizados no controle da redução ou inativação das aflatoxinas em amendoim são:

(1) métodos físicos de separação

A separação mecânica dos grãos de amendoim considerados de alta possibilidade de apresentar níveis elevados de aflatoxinas, como grãos chochos, danificados, brotados e de coloração diferente, permite uma redução parcial dos teores de aflatoxinas, mas apresenta o inconveniente de consumir tempo e às vezes é difícil de realizar (Bata & Lasztity, 1999; CAST, 2003; Schmidt & Esser, 1985; Vasanthi & Bhat, 1998). Essa segregação pode ser física, ou seja, manual, em mesas gravitacionais ou por meio de equipamentos eletrônicos (Godoy et al., 2001).

A separação baseada na diferença de densidade (grãos danificados são normalmente mais leves), utilizando correntes de ar, apresenta resultados variáveis e uma perda de grãos muito alta. A aparência e o peso do grão nem sempre indicam presença ou ausência de aflatoxina. Dessa forma, completa descontaminação é raramente possível (Beaver, 1991). Recentemente, Galvez et al. (2003) observaram, em amendoim, que um pré-aquecimento a 140°C facilita a remoção física de grãos contaminados após a retirada da casca, reduzindo significativamente os níveis de aflatoxinas.

(2) métodos físicos e químicos de detoxificação

(a) Calor

Em virtude da estabilidade das aflatoxinas ao calor (decomposição varia de 237°C-306°C), não há completa destruição pelo tratamento térmico. A extensão da destruição é muito dependente do nível inicial de contaminação, temperatura de aquecimento e tempo. Além disso, o tipo e o teor de umidade do alimento, o pH e a força iônica influenciam o grau de inativação. O conteúdo de umidade é o fator crítico. Alimentos contaminados, que apresentam um maior

teor de umidade, são mais facilmente inativados pelo calor. Supõe-se que a presença da água contribua para a abertura do anel lactona da aflatoxina B₁ (pela adição de uma molécula de água ao anel) para formar um ácido carboxílico terminal (Rustom, 1997).

Lee et al. (1968) revelaram que a torração por 30 minutos a 150°C produziu redução de 80% da aflatoxina B₁ e de 60% da aflatoxina B₂. Da mesma forma, para torração a seco e em óleo, variando o tempo de 3 a 30 minutos e a temperatura, de 121°C a 204°C em óleo e de 162°C a 174°C a seco, a redução de aflatoxina B₁ e G₁ variou de 45 a 83%, respectivamente (Lee et al., 1969).

A torração de amendoim (calor seco) a 60°C, 80°C e 105°C, durante 1, 2 e 3 horas, provocou uma redução máxima de 760 µg kg⁻¹ de aflatoxina B₁ para 220 µg kg⁻¹, após 3 horas a 105°C. Autoclavagem a 1,5 atm. por 30, 60, 90 minutos destruiu toda a aflatoxina (El-kady & Farghaly, 1981).

Sylos & Amaya-Farfan (1992) verificaram, em amendoim naturalmente contaminado, que a torração a 190-200°C em estufa, por 20 minutos, e fritura em óleo a 190°C provocavam uma redução de 95% nos níveis de aflatoxina B₁.

Pluyer et al. (1987) observaram uma redução de 48 a 61% nos níveis iniciais de aflatoxina B₁ (228, 370 e 557 µg kg⁻¹) em amendoim naturalmente contaminado, após aquecimento em forno de microondas por 8,5 minutos, em uma potência de 0,7 kW.

A utilização de forno de microondas por 3 a 6 minutos, em potência de 0,8kW, reduziu os níveis iniciais de aflatoxina B₁ e G₁ (88 a 647 µg/kg), em amendoim artificialmente contaminado, de 9,9% a 69,7% e 5,8% a 69,5%, respectivamente (Prado & Oliveira, 1996).

Taha (2000) verificou que torração em forno de microondas, com potência de 0,7 kw, por 7, 8, e 9 minutos, produziu uma redução nos níveis de aflatoxinas totais (B₁, B₂, G₁ e G₂) de 68,4% a 88,5%.

(b) Extração por solventes

As aflatoxinas podem ser extraídas eficientemente com este processo, utilizando sistemas binários ou terciários, como etanol 95%, solução aquosa de acetona a 90%, isopropanol 80% e hexano:etanol:água, em proporções iguais. Este é um método eficiente e tem um efeito mínimo no conteúdo protéico e nutricional. Entretanto, o custo do processo, o descarte de grande volume de solventes e a possibilidade de introduzir odores desagradáveis ao alimento tornam o tratamento proibitivo e impraticável (CAST, 2003; Ellis et al.; Gourama & Bullerman, 1995; Rustom, 1997).

(c) Adsorção

Alguns adsorventes em soluções aquosas podem se ligar às aflatoxinas, tornando-as não disponíveis durante a digestão (Beaver, 1991). Substâncias como alúminossilicato de sódio e cálcio hidratado, bentonita sódica natural, carvão ativado com partículas reduzidas, quando adicionadas aos alimentos e rações, têm a capacidade de sequestrar a toxina. Isso ocorre normalmente no intestino dos animais. Santúrio (2000) constatou que a bentonita sódica natural (BSN) é um bom adsorvente para aflatoxina. Aves alimentadas com dietas suplementadas com BSN apresentaram um ganho de peso, um consumo de ração cerca de 15 a 20% superior e uma taxa de mortalidade 30% inferior às aves alimentadas com dietas sem BSN. Aves tratadas com 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxina B₁ e com a adição de 0,5% BSN foram totalmente protegidas até aos 40 dias de idade.

A possibilidade de adsorção de micronutrientes é uma desvantagem em potencial. Experimentos para cada situação devem ser conduzidos para verificar a perda da qualidade nutricional do produto (Bata & Lasztity, 1999).

(d) Luz ultravioleta

Aflatoxina B₁ absorve radiação ultravioleta a 222, 265 e 362 nm, com a maior absorção ocorrendo a 362 nm. Essa irradiação ativa a aflatoxina B₁ e aumenta a susceptibilidade para degradação. Contudo, experimentos

laboratoriais indicaram limitações ao uso da radiação ultravioleta para degradar aflatoxinas em alimentos, como: (1) o processo patenteado não tem aceitação industrial; (2) baixo poder de penetração da faixa de comprimento de onda utilizada; (3) os produtos de degradação primária da aflatoxina B₁ parecem manter uma toxicidade residual (Rustom, 1997; Samarajeewa et al., 1990).

(e) Ozônio (O₃)

É um gás estável, mas em ambiente aquoso apresenta uma meia vida de 20 minutos. Decompõe-se para formar oxigênio e pode ser classificado como agente químico não persistente (CAST, 2003).

É um poderoso agente oxidante, que reage com a dupla ligação C₈=C₉ do anel furano, através de um ataque eletrofílico. Em poucos minutos, e à temperatura ambiente, ozona degrada efetivamente a aflatoxina B₁ e aflatoxina G₁, quando em dimetilsulfóxido, a 4%. Os produtos tratados não são tóxicos para ratos e embriões de pintos (Beaver, 1991).

Samarajeewa et al. (1990), revisando alguns autores, constataram, em farinha de amendoim com 30% de umidade, uma redução de 78% da aflatoxina B₁, após exposição a ozona por 1 hora. A necessidade de um tempo longo de exposição e a diminuição da disponibilidade de lisina tornam um método insatisfatório.

Mckenzie et al. (1997), utilizando um novo sistema (eletroquímico) contínuo de fonte de ozona a 2, 10 e 20% em peso com O₃, durante 5 minutos, provocaram uma destruição rápida e total das aflatoxinas B₁ e G₁ em acetonitrila (O₃ 2%). As aflatoxinas B₂ e G₂ foram mais resistentes à oxidação, sendo necessário O₃ 20% para inativação.

(f) Amoniação

É considerado o processo de destruição de produtos contaminados com aflatoxinas mais prático e promissor. O tratamento envolve uso de gás amônia ou hidróxido de amônia (em alta pressão/alta temperatura) e provoca abertura do

anel lactona da estrutura química da aflatoxina, particularmente quando o pH do meio é superior a 9,5. O processo de amoniação resulta na conversão da aflatoxina B₁ em produtos menos tóxicos, como a aflatoxina D₁ e dihidro-4-hidroxy-6-metoxifuro {2,3-b} benzofurano. Este processo é utilizado atualmente nos Estados Unidos, África do Sul, Brasil e México. Entretanto, em função das condições drásticas de temperatura e pressão, com perda da qualidade do alimento, sua aplicação está restrita a produtos para consumo animal (CAST, 2003). Alguns autores citados por Samarajeewa et al. (1990) relataram perda de lisina e metionina e uma redução irreversível no grau de insaturação de lípides.

(g) Bisulfito

É utilizado normalmente como conservante de alimentos, como bebidas, frutas e vegetais. Inibe escurecimento enzimático e não-enzimático e o crescimento de microorganismos (Doyle et al., 1982). Bisulfito de sódio pode reagir em dois sítios ativos da aflatoxina B₁, provocando quebra do anel lactona ou adição no anel furano terminal, ou ambos (Samarajeewa, 1990). O tratamento com bisulfito de sódio é considerado uma estratégia química altamente promissora, pois pode reagir com aflatoxinas B₁, G₁, M₁ e aflatoxicol, formando derivados hidrosolúveis (CAST, 2003).

2.4.7.3 Degradação biológica de micotoxinas

Embora alguns métodos citados apresentem uma relativa eficiência no processo de descontaminação de alimentos com aflatoxinas, as limitações em função da eficácia, custo, perda de nutrientes e alterações das características organolépticas impõem novas e melhores soluções para o problema das micotoxinas em alimentos (Bata & Lasztity, 1999).

Enquanto a literatura científica descreve diversos procedimentos físicos e químicos para tentar eliminar a contaminação dos alimentos com micotoxinas (Rustom, 1997; Samarajeewa et al., 1990; Schimdt & Esser, 1985), a

detoxificação biológica como estratégia de controle de micotoxinas tem sido estudada nos últimos anos (Druvefors, 2004; Sweeny & Dobson, 1998).

A bactéria *Flavobacterium aurantiacum* tem sido extensivamente estudada e mostra uma alta capacidade de metabolizar a aflatoxina B₁ em vários alimentos, como leite e pasta de amendoim. Entretanto, a brilhante pigmentação laranja associada a esta bactéria limita sua aplicação em alimentos e rações (Bata & Lasztity, 1999).

Alguns microrganismos são capazes de degradar micotoxinas. Quando *Aspergillus flavus* foi cultivado junto com *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* e *Bacillus stearothermophilus*, verificou-se uma redução de 70 a 87% na produção de aflatoxina B₁ (Faraj et al., 1993).

Entre os microrganismos que podem ser utilizados como agentes de controle biológico destacam-se as leveduras, em função de: (1) habilidade de colonizar superfícies secas por um longo período de tempo; (2) não formam esporos alergênicos e nem produzem toxinas; (3) produzem polisacárides extracelulares que garantem sua sobrevivência e restringem os sítios de colonização dos fungos; (4) usam nutrientes disponíveis para desenvolvimento, não sendo exigentes do ponto de vista nutricional; e (5) são minimamente afetados por pesticidas (Droby et al., 1999).

Três espécies de *Saccharomyces cerevisiae* foram capazes de degradar parcialmente, durante processo de fermentação alcoólica de mosto, ocratoxina A, toxina do *Aspergillus alutaceus* e *Penicillium expansum* e fumonisina B₁ e B₂, toxinas do *Fusarium verticillioides*, resultando em cerveja com menores níveis de toxinas (Scott et al., 1995).

A levedura *Pichia anomala* previne a deterioração pelo *Penicillium roqueforti* (fungo filamentosso produtor de diferentes toxinas) e prolonga a segurança no armazenamento de grãos de cereais úmidos contidos em sistema hermeticamente fechado. A espécie J121 não cresce acima de 37°C e é

considerada segura nível 1. A *P.anomala* é capaz de prevenir o crescimento de fungos durante 14 meses de armazenamento de trigo, através da habilidade de consumir rapidamente o oxigênio e de sintetizar o acetato de etila, agente antifúngico (Druvefors, 2004; Petersson & Schnürer, 1998).

Dentre as interações de leveduras que apresentam um potencial de utilização no controle biológico, a predação surge como destaque, principalmente pelo fato de não envolver substâncias antagonistas que podem gerar danos à saúde humana e animal. Lachance & Pang (1997) e Lachance et al. (2000) foram os primeiros a descrever e identificar este fenômeno como predação entre as leveduras. Esta capacidade de predação foi observada em todas as espécies do gênero *Saccharomycopsis*. e consiste na formação de pequenos apêndices (haustórios) que penetram e provocam a morte de outro fungo.

Em trabalho recente, observou-se que a levedura predadora *Saccharomycopsis javanensis* é capaz de reduzir em até 74% a produção de aflatoxina B₁ em amendoim, cultivar Tatu Vermelho, após inoculação com *Aspergillus flavus* IMI 190443, cepa altamente aflatoxigênica (Pimenta, 2004; Prado, 2004).

O processo de prevenção e controle das micotoxinas, e em especial das aflatoxinas, após mais de 40 anos da sua descoberta, ainda não apresentou um modelo seguro, eficaz e de solução definitiva. Novas tecnologias de destruição de fungos (agentes produtores) e/ou de toxinas (metabólitos secundários tóxicos) ou uma combinação de estratégias, como a utilização de levedura predadora conjugada a um agente antifúngico, podem levar a alimentos isentos de contaminação. Talvez no futuro as plantas possam apresentar não somente uma resistência ao ataque de insetos e/ou à infecção fúngica, mas elas mesmas poderão ser capazes de interromper o processo de biossíntese das toxinas (Cleveland et al., 2003).

2.5 Legislação

A legislação de alimentos tem a função de proteger a saúde dos consumidores e a capacidade econômica de produtores e comerciantes. A natureza nociva das aflatoxinas para humanos e animais tem provocado a necessidade de estabelecer limites de tolerância pelas autoridades nacionais e internacionais. A tendência é de que as nações industrializadas estabeleçam níveis mais baixos que os países em desenvolvimento (Tabela 1), onde a maior parte dos alimentos é produzida (Rustom, 1997).

Muitos são os fatores que influenciam o estabelecimento de limites de tolerância das micotoxinas, como: a) disponibilidade de dados toxicológicos; b) distribuição das micotoxinas no alimento; c) ocorrência de micotoxinas no alimento; d) disponibilidade de métodos analíticos; e) a proporção de consumo do alimento na dieta; e f) relações comerciais com outros países. Regulamentos desnecessariamente restritivos provocam dificuldades aos países importadores para obter os suprimentos alimentares para a sua população e aos países exportadores, que terão problemas em encontrar compradores para seus produtos (CAST, 2003).

No Brasil estão em vigor a Portaria nº 183, de 21 de março de 1996, do Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária (Brasil, 1996; Brasil, 2002) e a Resolução nº 274, de 15 de outubro de 2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que estabelece o limite de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a soma das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em milho e amendoim.

TABELA 1.- Níveis de tolerância máxima para aflatoxinas em amendoim

País	Aflatoxina Total ($\mu\text{g kg}^{-1}$) B₁ + B₂ + G₁ + G₂
Argentina, EUA, México	20
África do Sul, Egito, Espanha, Grécia, Itália	10
Bulgária, Finlândia, Hungria, Nova Zelândia	5
Alemanha, Dinamarca, Inglaterra	4
França, Suíça	1 (B ₁)

CAST - Council for Agricultural Science and Technology, 2003.

2.6 Irradiação de alimentos

2.6.1 Aspectos gerais

O desenvolvimento de processos de preservação de alimentos com a finalidade de aumentar a vida de prateleira e manter sua segurança continua a ser um fator estratégico e dominante na situação alimentar mundial. Para suprir de alimentos e reduzir a pobreza, em uma expectativa populacional para 2025 de 8,3 bilhões de pessoas, o mundo irá precisar aumentar substancialmente a produtividade agrícola e aperfeiçoar as práticas de pós-colheita, armazenamento e distribuição. O papel governamental nas ações da indústria alimentícia deve envolver: (1) estabilidade política e econômica (baixa inflação), de forma que os setores produtores de alimentos, comerciantes e processadores possam operar adequadamente; (2) estabelecimento de políticas que promovam competições efetivas entre pequenas, médias e grandes empresas; e (3) melhoria, em parceria com a iniciativa privada, das condições pós-colheita. O papel dos pesquisadores

e tecnólogos na área de alimentos deve compreender: (1) desenvolvimento de novas tecnologias que promovam o aumento de alimentos nutritivos e seguros e (2) transferência para o setor produtivo das novas tecnologias (Okezie, 1998).

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) estima que 25% da produção mundial de alimentos se perde pela ação de insetos, bactérias, fungos e roedores. No caso das raízes e tubérculos, a germinação prematura condena à lata de lixo toneladas de produtos (Martin Neto et al., 1996).

Anualmente, perdas durante o armazenamento têm sido estimadas em 10% para cereais, 40% para vegetais e frutas, 75% para ervilhas e feijões e muito mais para carnes e peixe (Lacroix & Ouattara, 2000).

O consumidor está cada vez mais preocupado com a qualidade de vida e a segurança alimentar e é constante a procura por alimentos frescos e saudáveis. Para tentar minimizar as perdas de alimentos, vários processos são utilizados, tais como desidratação, salga, defumação, liofilização, conservação em atmosfera controlada, esterilização, pasteurização e, ultimamente, a irradiação (Moraes, 2000; Worcman-Barninka & Landgraf, 2003).

Em 1981, a preservação de alimentos pelo tratamento com a irradiação foi aprovada pelo Comitê Misto da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO/WHO) e pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA). Em 1984, foi criado o Grupo Consultivo Internacional sobre Irradiação de alimentos (GCIIA) pela WHO, juntamente com a FAO e a IAEA, para acompanhar a evolução dessa tecnologia. O Brasil, junto com cerca de 44 países, faz parte desse grupo (Del Mastro, 1999; Giroux & Lacroix, 1998; Matsuda, 2002).

2.6.2 Processo de irradiação

A irradiação de alimentos é um processo físico que utiliza uma faixa particular de energia eletromagnética conhecida como radiações ionizantes. As radiações ionizantes são partículas ou fótons que possuem energia suficientemente alta para produzir partículas eletricamente carregadas (íons) nos materiais com que entram em contato. Como exemplo de partículas ionizantes têm-se partículas alfa (núcleos de hélio, ou seja, dois prótons e dois nêutrons); elétrons e prótons de alta energia. Na classe dos fótons ionizantes encontram-se os raios X e raios gama. A partícula alfa não é capaz de atravessar uma folha de papel, enquanto a partícula beta (basicamente elétron) é mais penetrante, mas não ultrapassa uma folha de alumínio. A radiação gama é altamente penetrante, podendo atravessar um bloco de chumbo de certa espessura. Os raios X são relativamente menos penetrantes que a radiação gama, tendo como inconveniente o baixo rendimento em sua produção, pois somente 3 a 5% da energia são efetivamente convertidos em raios X (Cena, 2003a; Hernandez et al., 2003).

2.6.3 Tipos de irradiação

No processo de irradiação, em nenhum momento o alimento entra em contato com a fonte de radiação. As instalações para irradiação de alimentos variam de acordo com o projeto e a disposição física a que se destinam. Basicamente existem dois tipos: radiação descontínua e a contínua. No primeiro tipo, irradia-se uma quantidade determinada de alimentos, por um período de tempo estabelecido. Em seguida, retira-se o alimento da câmara e coloca-se outra carga para irradiação. Nas instalações de irradiação contínua, o alimento atravessa a câmara a uma velocidade controlada e calculada para garantir que todo o alimento receba exatamente a dose prevista. É o tipo de radiação mais usado para tratamentos de grandes quantidades de produto (Matsuda, 2002).

A irradiação pode ser medida por meio de dosímetros que é capaz de detectar doses na faixa de 1 Gy a 100 kGy (Miyagusku et al., 2003).

2.6.4 Fontes de radiação ionizante

Três são as fontes utilizadas em plantas comerciais de radiação: (1) raios gama produzidos por fontes de ^{60}Co e ^{137}Cs ; (2) raios X gerados por máquinas operadas com energia máxima de 5 milhões de elétrons-volt (Mev); e (3) feixes de elétrons produzidos por aceleradores de elétrons com energia máxima de 10 Mev. A penetração no alimento é de cerca de 8 cm, sendo, pois, recomendado para especiarias e condimentos moídos (Diehl & Josephson, 1994).

As fontes gama utilizadas na irradiação de alimentos são:

a) ^{60}Co (cobalto 60)

O ^{60}Co tem meia-vida de 5,27 anos. Decai para ^{60}Ni (Níquel 60) que é estável, por meio de emissão de dois fótons gama (1,17 e 1,33 Mev) e de uma partícula beta (0,31 Mev). É produzido artificialmente por meio da irradiação de barras de ^{59}Co (Cobalto 59) em reatores nucleares. O ^{60}Co tem a grande vantagem de ser insolúvel em água. É duplamente encapsulado em tubos de aço inoxidável para impedir qualquer fuga durante a sua utilização em uma instalação de irradiação. Os irradiadores comerciais utilizam, em sua maioria, fontes de ^{60}Co .

b) ^{137}Cs (Césio 137)

O ^{137}Cs apresenta uma meia vida de 30,5 anos e decai para o ^{137}Ba (Bário 137), que é estável, por meio da emissão de duas partículas beta (0,51 e 1,18 Mev) e um fóton gama (0,66 Mev). É extraído e obtido na forma de CsCl (solúvel em água); por isso é triplamente encapsulado em aço inoxidável. Apresenta um menor poder de penetração quando comparado ao ^{60}Co (Hernandes et al., 2003).

2.6.5 Mecanismo de irradiação

Irradiar alimentos consiste em expô-los às radiações ionizantes. De acordo com Errera (1960), citado por Vieira (1995), a interação da radiação com átomos e moléculas presentes nos alimentos provoca o efeito primário da radiação, que é a formação de radicais livres, a ionização ou a excitação (moléculas ativadas):



A água constituinte da maioria dos alimentos absorve a energia das radiações e sofre o processo de radiólise, formando as seguintes espécies:



O efeito secundário consiste na reação de espécies reativas com os outros constituintes dos alimentos, formando os efeitos indiretos da irradiação, os quais são responsáveis por 80% dos efeitos provocados pela radiação. A ação direta das radiações é responsável por 20%. (Adão, 1998; Almeida, 2000; ; Landgraf, 2003; Rela, 2000). Na interação direta o DNA é o alvo principal do processo de irradiação, embora os efeitos sobre membrana plasmática também apresentam um papel adicional importante no dano celular causado pela irradiação (Worcman-Barninka & Landgraf, 2003).

2.6.6 Fatores que influenciam o processo de irradiação

Segundo Landgraf (2003) e Worcman-Barninka & Landgraf (2003), os principais fatores que intefereem na ação da irradiação são:

(1) tipo de microorganismo. Organismos mais simples são mais resistentes à irradiação. Em relação aos fungos, as leveduras são mais resistentes do que os

bolores, sendo os dois mais resistentes que as bactérias gram-negativas. Os vírus são mais resistentes que os esporos bacterianos;

(2) fase da curva de crescimento. A resistência à radiação é maior quando na fase lag, imediatamente antes da divisão celular;

(3) estado físico do alimento. Células desidratadas são mais resistentes à radiação provavelmente em consequência da radiólise da água que ocorre em menor proporção;

(4) temperatura. Quanto maior a temperatura, maior a velocidade das reações decorrentes do processo de irradiação. Maior também é a difusão das espécies químicas reativas (radicais livres);

(5) oxigênio. A presença de oxigênio contribui para a formação de radicais hidroperóxidos e superóxido, levando ao aumento de peróxido de hidrogênio, que apresenta atividade oxidante. Portanto, a ausência de oxigênio torna o microorganismo mais resistente à irradiação;

(6) composição do alimento. Em alimentos complexos (carboidratos, proteínas e lipídios) há uma competição entre radicais livres e moléculas ativas, protegendo, dessa forma, os microorganismos;

(7) tamanho da molécula. A sensibilidade à radiação é proporcional ao seu peso molecular. Uma molécula de DNA é mais sensível à irradiação que um aminoácido.

2.6.7 Alterações dos componentes dos alimentos

Estudos sobre os efeitos das radiações ionizantes em macronutrientes (carboidratos, lipídios e proteínas) demonstram que não há variações significativas em doses de até 10 kGy. Entre micronutrientes, os aminoácidos essenciais, ácidos graxos essenciais, minerais e a maior parte das vitaminas não são afetados nas condições normais de irradiação. Poucas vitaminas, em especial a vitamina B₁ entre as hidrosolúveis e a vitamina E, do grupo das solúveis em

gordura, são parcialmente decompostas. Para minimizar perdas dessas vitaminas, deve-se diminuir a concentração de oxigênio durante a irradiação e armazenamento, utilizando embalagem a vácuo ou atmosfera de nitrogênio (Diehl, 1992; Diehl & Josephson, 1994).

As mudanças que ocorrem nas propriedades sensoriais dos alimentos resultam principalmente de três tipos de reações químicas:

- (1) inicialmente a irradiação provoca um processo normal de autooxidação de gorduras, dando origem ao ranço;
- (2) posteriormente ocorre a irradiação de proteínas. Aminoácidos sulfurados proporcionam flavor desagradável. Isso acontece em especial em produtos de leite. Entretanto, não há alteração significativa do valor nutricional do alimento;
- (3) finalmente, a irradiação pode quebrar carboidratos de alto peso molecular (pectina) em unidades menores. Este processo é responsável pela alteração da consistência de frutas e vegetais. O amolecimento pode ser uma desvantagem, mas pode ser também vantajoso, pois há aumento no rendimento de suco e redução no tempo de cocção e secagem de produtos desidratados (Kilcast, 1994).

2.6.8 Aplicações

A irradiação pode ser executada em alimentos já embalados ou a granel. Tecnicamente, o interesse em irradiar alimentos está em:

- (a) aplicações com doses baixas (< 1,0 kGy - Radurização). Envolve inibição de brotamento de batatas, cebola e alho; retardamento do processo de maturação de frutas e vegetais e inativação de insetos em cereais;
- (b) aplicações com doses médias (1 a 10 kGy - Radicidação). Eliminação de bactérias patogênicas e de putrefação em carnes, frutas e frangos;

(c) aplicações com doses altas (> 10 kGy - Radapertização). Destruição total de microorganismos e possibilidade de estocagem longa em refrigeração (Cena, 2003b; Diehl, 1992; Embrarad, 2003).

Pode-se afirmar que o processo de irradiação está em franca expansão, o que pode ser verificado em alguns trabalhos apresentados abaixo:

(1) duas variedades de uvas, Baladi e Helwani (Síria), foram irradiadas com doses de 0, 0,5, 1,0 e 1,5 kGy, no primeiro ano. No segundo ano, duas doses adicionais foram usadas: 0,1 e 0,25 kGy para a variedade Helwani e 2,0 e 2,5 kGy para a Baladi. Seguiu-se acondicionamento a 1-2°C. Os resultados mostraram que a irradiação gama melhorou a estabilidade de ambas as variedades. Para a Helwani o ideal foi 0,5-1,0 kGy, e para a Baladi 1,5-2,0 kGy. Nessas condições, a porcentagem de podridão provocada pelo *Botrytis cinerea* atingiu 0% após 4-8 semanas de armazenamento (Al-Bachir, 1999);

(2) grãos de trigo, tratados com doses de 0, 10, 30, 50, 70, 100, 300 e 500 Gy, apresentam redução no processo de infestação por *Sitophilus granarius*. Doses de 30 e 50 Gy destroem ovos e larvas. Nenhum adulto emerge de larvas irradiadas com doses de 30-500 Gy e não foi verificado dano externo nos grãos de trigo. Baixas doses não causam morte imediata do inseto adulto, mas podem prevenir um aumento da população por efeitos letais nos estágios imaturos, esterilização de adultos e uma redução na longevidade do inseto adulto. Em doses de 300 e 500 Gy, em adultos de 4 semanas, após 2 dias, foi observado 0% de sobrevivência (Aldryhim & Adam, 1999);

(3) raios gama (2,7 e 3,0 kGy) à temperatura ambiente, em alface e morango, reduzem em mais de 90% a população do vírus da hepatite A (Bidawid et al., 2000);

(4) carne cozida a 75°C, para inativar enzimas, previamente congelada a -40°C/8 horas, embalada a vácuo e irradiada a 45 kGy, permanece com integridade total, mesmo em condições tropicais da África do Sul, durante 2

anos. Essa alimentação destina-se a operadores de safari e alpinistas (Bruyn, 2000);

(5) a gelatina comercial é feita de couro animal e osso através de técnicas de processamento como desengorduramento, pulverização, resfriamento e secagem e tem sido amplamente utilizada como aditivo alimentar e alimento, devido ao seu alto conteúdo protéico. A contaminação microbiana é inevitável devido ao seu alto poder nutritivo. Irradiação com 5 kGy e acondicionamento por 6 a 12 meses, à temperatura ambiente, foi observada uma redução de 95% da carga microbiana. Os valores de aminoácidos e microelementos não foram alterados (Fu et al., 2000);

(6) duas cultivares de feijão brasileiro, carioca - *Phaseolus vulgaris* L. e Macaçar - *Vigna unguiculata* L., foram irradiadas com doses de 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 e 10 kGy e acondicionadas à temperatura ambiente por 6 meses. Foi observada uma redução no tempo de cocção (com 2,5 kGy), sem alteração na qualidade sensorial, quando em dose inferior a 1,0 kGy. O teor de vitamina B₁ no feijão carioca diminuiu significativamente a 2,5 kGy (Villavicencio et al., 2000);

(7) cloração e irradiação a 0,55 kGy produzem uma redução de 5,4 ciclos log em *Escherichia coli* 0157:H7 em alface (Foley et al., 2002);

(8) sanduíche de presunto e queijo inoculado com *Staphylococcus aureus* 8095 (2×10^8 células/mL), acondicionado a 4°C por 1, 13, 27 e 39 dias e irradiado com 3,9 e 5,9 kGy apresentou destruição total do *S.aureus* a 5,9 kGy (Lamb et al., 2002);

(9) a irradiação gama com dose superior a 7 kGy é capaz de reduzir o poder alergênico de proteínas como ovoalbumina, beta-lactoglobulina e tropomiosina (camarão). A capacidade de ligação da IgE de pacientes alergênicos foi reduzida a 50% (Byun et al, 2002);

(10) sanduíche de presunto e queijo foi inoculado com *Listeria monocytogenes* e armazenado a 4°C por 1, 13, 26 e 39 dias, após irradiação com

3,9 kGy e 5,9 kGy. Nenhuma célula bacteriana foi recuperada a 5,9 kGy em qualquer tempo (Clardy et al., 2002);

(11) o uso da irradiação no tratamento de carne fresca pode estender a vida de prateleira e proteger contra bactérias patogênicas. Baixas doses de irradiação (< 10 kGy) podem destruir pelo menos 99,9% da *E.coli* O157:H7. Entretanto, há um significativo aumento de ácidos graxos trans (2,5 vezes) em carne moída irradiada. Há evidências epidemiológicas de que estes ácidos graxos trans se ligam mais fortemente no plasma, colesterol total e colesterol de baixa densidade, aumentando a incidência de doenças coronarianas (Brito et al., 2002). Níveis de 1,5 kGy são capazes de inibir crescimento de *A.flavus* e produção de aflatoxina B₁ em carne moída armazenada durante 15 dias a 5°C (Youssef et al., 1999);

(12) para irradiação gama em bolsas de plaquetas e hemácias (hemocomponentes), utilizada por pacientes que sofrem de leucemia ou transplantados de medula óssea, o ⁶⁰Co é capaz de destruir linfócitos (células de defesa) do doador, reduzindo os riscos de rejeição (Aranha, 2002);

(13) feixe de elétrons em doses de 1, 2 e 3 kGy, combinado com ácidos orgânicos (acético, cítrico e láctico a 2%), provocou um efeito bactericida (contagens nulas de coliformes) em lombo de porco armazenado durante 14 dias a 4°C (Kim et al., 2004);

(14) após inoculação de 5 espécies diferentes de *Listeria monocytogenes*, em diferentes tipos de carnes prontas para serem consumidas (presunto, bife assado, salsicha, etc), irradiação com ⁶⁰Co a 0,5 a 4,0 kGy e armazenamento a 4°C durante 5 semanas, não foram observadas bactérias sobreviventes na dose de 4,0 kGy (Foong et al., 2004).

2.6.9 Legislação

A utilização da irradiação não se aplica em situações para compensar a falta de higiene da matéria prima ou durante a produção e o armazenamento de um alimento.

No Brasil está em vigor a Resolução RDC N° 21, de 26 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (Brasil, 2001). Não há mais restrições em relação às doses a serem aplicadas. Qualquer alimento pode ser irradiado, desde que sejam observadas as seguintes condições:

- (1) a dose mínima absorvida deve ser suficiente para alcançar a finalidade desejada;
- (2) a dose máxima deve ser inferior àquela que comprometeria as propriedades funcionais do alimento.

2.6.10 Efeitos da radiação gama

2.6.10.1 Ensaios gerais

A possibilidade de a irradiação gama induzir ao aumento da produção de aflatoxina em alimentos ou ativar uma cepa não aflatoxigênica a produzir aflatoxinas, particularmente em grãos, foi mencionado como um argumento contra a introdução dessa tecnologia (Mitchell, 1988).

Jemmali & Guilbort (1969,1970) citados por Mitchell (1988) registraram que a exposição de sete espécies não aflatoxigênicas de *Aspergillus flavus* a uma dose de 1,0 kGy (⁶⁰Co), induziram essas espécies a produzirem quantidades crescentes de aflatoxinas B₁ e G₁.

Applegate & Chipley (1973a,b) verificaram que após exposição do *Aspergillus flavus* NRRL-12268 (espécie não toxigênica) e NRRL 3145 (aflatoxigênica) a doses de irradiação gama (⁶⁰Co) de 0,25, 0,50, 1,50, 2,00, 3,00, 4,00 e 6,00 kGy, não houve produção de aflatoxina B₁ e G₁ em trigo nas

amostras inoculadas com a cepa não aflatoxigênica. Contudo, a quantidade de aflatoxina B₁ e G₁ produzida pela espécie aflatoxigênica irradiada (NRRL 3145) foi superior, quando comparada ao controle toxigênico não irradiado.

Em estudos subseqüentes, Applegate & Chipley (1974a,b) verificaram que *Aspergillus flavus* NRRL 3145 (aflatoxigênico) produziu, em trigo, mais aflatoxina B₁ quando irradiado com 2,0 kGy, em relação ao controle não irradiado. Entretanto, a 3,0 kGy, os níveis de aflatoxina B₁ foram inferiores aos detectados na amostra não irradiada. Uma exposição a 4,0 kGy proporcionou uma completa inibição da germinação do esporo e, conseqüentemente, uma não produção de aflatoxina.

Bullerman & Hartung (1974) estudaram os efeitos da irradiação gama em *Aspergillus parasiticus*, espécies NRRL 2999 e NRRL 3000, quando irradiadas a 1,0 e 2,0 kGy, e observaram posterior crescimento em meio de extrato de levedura e sacarose (YES), durante 7 dias a 25°C. A irradiação dos esporos a 1,0 kGy resultou em maior produção de aflatoxina B₁ e G₁ pela espécie NRRL 2999, quando comparada ao controle não irradiado. Contudo, a espécie NRRL 3000 produziu menor quantidade de aflatoxina B₁ e G₁ após 1,0 kGy do que a controle não irradiado. Esporos de ambas as espécies, irradiadas a 2,0 kGy, produziram níveis inferiores de aflatoxinas em relação aos esporos não irradiados.

Schindler et al. (1980) irradiaram esporos de *Aspergillus flavus*, isolado M-141, com doses de 0,16, 0,90 e 4,75 kGy (⁶⁰Co), enquanto *Aspergillus parasiticus*, isolado M-1094, foi exposto a 0,90, 2,15 e 4,30 kGy. Posteriormente, foram inoculados em meio de arroz esterilizado e incubados a 27°C durante 7 dias. A produção de aflatoxina B₁ aumentou com o aumento da irradiação. Na dose mais elevada, houve uma produção 50 vezes maior quando comparada ao controle não irradiado. Em relação ao *Aspergillus parasiticus*, os níveis de aflatoxina B₁ foram superiores nas doses baixa e média de irradiação.

Na dose de 4,30 kGy, não foi detectada aflatoxina B₁ após o período de incubação. Colônias atípicas de esporos irradiados foram selecionadas para a produção de aflatoxina. Observou-se que a produção de aflatoxina B₁ aumentou, em relação ao controle não irradiado, na proporção de 67:1. Os autores concluíram, que este aumento pode ser em função de mutações. Esta hipótese foi sustentada na capacidade desta espécie em produzir grande quantidade de toxina e manter esta característica após decorridos 4 meses do processo de irradiação.

Tsai et al. (1984) irradiaram uma suspensão de esporos de *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 na dose de 0,5 kGy e inocularam em meio de extrato de levedura e sacarose (YES). Foram medidos o crescimento e a produção em vários intervalos, durante 21 dias, e concluiu-se que não havia diferença significativa no crescimento dos esporos ou no total de aflatoxina produzida, entre esporos irradiados e não irradiados.

Resultados diferentes dos descritos por Applegate & Chipley (1973a,b) foram encontrados por Sharma et al. (1990). Após exposição à irradiação gama de esporos de *Aspergillus parasiticus* NRRL, procedeu-se inoculação em arroz autoclavado e incubação durante 10 dias a 26-28°C. A maior quantidade de aflatoxina foi produzida pelo inóculo de colônias obtidas de suspensão de esporos não irradiados: 0,46 mg/25. Os níveis de aflatoxinas produzidos foram 0,20, 0,22 e 0,29 mg/25, nas doses de 0,2, 0,4 e 0,8 kGy, respectivamente. Os estudos revelaram que a irradiação não aumenta a capacidade produtora de aflatoxina pelo fungo.

2.6.10.2 Em amendoim - em função de aflatoxina B₁ e fungos

Primeiramente, deve-se registrar que as pesquisas aqui descritas avaliaram destruição de fungos e aflatoxinas em condições naturais e em situações simuladas de laboratório.

Gonzalez et al. (1972) observaram o efeito da irradiação gama (^{60}Co) em doses de 0,5, 1,0 e 1,5 kGy, em grãos de amendoim *in natura*, da melhor qualidade, colhidos na época adequada, secos até uma umidade de cerca de 4,5% e armazenados durante 10 meses, à temperatura ambiente. Os resultados obtidos foram: (1) um ligeiro acréscimo da umidade (5,79% para 6,09%) e do teor de ácidos graxos (0,36% para 0,56%); (2) a contagem de bolores e leveduras foi reduzida de 100 UFC/g, a partir de 1,0 kGy, para valores não detectáveis; (3) as aflatoxinas foram detectadas na amostra controle (sem irradiação) e na irradiada com 0,5 kGy, em níveis bem baixos, a partir do quarto mês. Nas amostras irradiadas com 1,0 kGy e 1,5 kGy não foram detectadas aflatoxinas; e (4) a avaliação sensorial mostrou que os níveis de irradiação utilizados não afetaram significativamente a textura e a palatabilidade.

Temcharoen & Thilly (1982) mostraram que a toxicidade da farinha de amendoim contaminada com aflatoxina B₁ foi reduzida em 75 e 100% após irradiação gama nas doses de 5,0 e 10,0 kGy, respectivamente.

Amostras de amendoim em grão, esterilizadas por 30 minutos a 1 atm. de pressão, foram inoculadas com *Aspergillus parasiticus* ATCC 9600 (10⁶ esporos/mL) e posteriormente irradiadas com ^{60}Co , em níveis de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 kGy. Seguiu-se incubação durante 10 dias a 25°C. Foi observada, na dose de 2,0 kGy, redução da aflatoxina B de 32000 µg/kg (controle) para 1600 µg/kg e da aflatoxina G, de 30600 µg/kg (controle) para 1200 µg/kg (Rodriguez & Rodriguez, 1983).

Chiou et al. (1990) observaram que uma dose de 2,5 kGy (^{60}Co) foi capaz de reduzir em 55% a contaminação natural fúngica em grãos de amendoim. Em doses de 5,0, 7,5, 10 e 15 kGy os fungos foram efetivamente eliminados (0%). Em outro experimento, grãos de amendoim *in natura* foram colocados em placas de Petri, artificialmente contaminados com *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 e submetidos a irradiação gama (0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e

15,0 kGy). Seguiu-se um período de incubação de 4 semanas a 30°C. Observou-se que o crescimento fúngico foi inibido inicialmente (8-12 dias), mas após 30 dias, a porcentagem de contaminação atingiu 100% dos grãos, revelando uma resistência do *Aspergillus parasiticus* à irradiação. Os níveis de aflatoxina B₁ foram reduzidos de 18630 µg/kg (0 kGy) para 2570 µg/kg na dose de 15 kGy.

Amostras de amendoim em grão (7,2% de umidade) foram irradiadas com doses de 0, 2,5, 5,0, 10,0 e 20 kGy e armazenadas a 15-31°C e -14°C durante 1 ano. Amostras controle, sem irradiação, nas duas condições de estocagem, apresentaram 100% de contaminação. Quando grãos de amendoim foram irradiados com dose de 2,5 kGy e armazenados à temperatura ambiente em condições de congelamento, a contaminação fúngica atingiu 2,5% e 0%, respectivamente. A partir de 5,0 kGy, independentemente da temperatura, a porcentagem de contaminação foi de 0% (Chiou et al., 1991).

Menasherov et al. (1992) observaram que uma dose de 2,5 kGy (⁶⁰Co) é capaz de evitar a germinação de esclerócios de *Aspergillus flavus* NRRI 3251. Redução dos níveis de oxigênio (20% O₂) e 1,0 ou 1,5 kGy de irradiação, também são capazes de reduzir a germinação dos esporos.

Rodriguez & Garzon (1993) submeteram amostras de amendoim em grão à irradiação gama (⁶⁰Co) nas doses de 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 3,0 kGy, e verificaram que com 3,0 kGy a contaminação fúngica foi reduzida de 4,1 x 10³ UFC/g para 1,0 x 10¹ UFC/g.

Amendoim previamente esterilizado a 121°C por 15 minutos foi inoculado com *Aspergillus flavus* e incubado a 25°C durante 15 dias. Seguiu-se irradiação gama (⁶⁰Co) nas doses de 5, 10 e 20 kGy. Os níveis de aflatoxina foram reduzidos de 31860 µg/kg (amostra não irradiada) para 5000 µg/kg, correspondendo a uma redução de 83% (Farag et al., 1995).

Hilmy et al. (1995), trabalhando com amendoim submetido à irradiação gama (⁶⁰Co) na dose de 5,0 kGy e incubado em diferentes ambientes de umidade

relativa (75, 85, 91, 95 e 97%), a $29\pm 2^{\circ}\text{C}$, foi inoculado com *Aspergillus flavus* (5×10^8 esporos/mL). Efetuou-se então a irradiação gama em doses de 0, 0,5, 1,0 3,0 e 5,0 kGy e incubou-se a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 14 e 20 dias. Observou-se que esporos não irradiados cresceram em umidade relativa de 91, 95 e 97%, mas não a 85%. Com 3,0 e 5,0 kGy, o crescimento de micélio e a produção de toxina foram completamente inibidos.

Grãos de amendoim (100 g) foram misturados com NaCl (0, 2, 4, 6, 10 e 12%) e esterilizados por autoclavagem a 121°C durante 15 minutos. O conteúdo de umidade dos grãos (8-12%) foi elevado para 25% e seguiu-se um acondicionamento a $4^{\circ}\text{C}/24$ horas. Procedeu-se então a inoculação com *Aspergillus flavus* (10^6 esporos) e irradiação a 1,0 e 2,0 kGy. Seguiu-se incubação a 28°C durante 14 ou 21 dias. Doses de 1,0 e 2,0 kGy reduziram os níveis de aflatoxinas, após 14 dias, de $46 \mu\text{g}/\text{kg}$ para $21 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $13 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Não houve produção de aflatoxina nas amostras irradiadas com 1,0 kGy e NaCl 6% e 2,0 kGy e NaCl 4% (Shahin & Aziz, 1997).

Diop et al. (1999) avaliaram a destruição de aflatoxina B₁ em torta de amendoim a 25 kGy e em diferentes valores de atividade de água: 0,55, 0,85 e 0,95. A maior taxa de retenção de aflatoxina B₁ foi observada nas amostras com menor atividade de água (92,3%), revelando a importância da água na eficiência do processo de irradiação.

Aziz & Youssef (2002) verificaram o efeito da irradiação gama nas doses de 0, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 kGy e 0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy, na capacidade de destruição da microbiota fúngica natural de amendoim e da aflatoxina B₁, respectivamente. Em uma dose de 5,0 kGy, a contagem total de fungos passou de $8,2 \times 10^4$ UFC/g para 0 UFC/g. Com 20 kGy, o nível de aflatoxina B₁ foi reduzido de $27,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ para não detectado.

2.6.10.3 Em outros alimentos - em função de aflatoxina B₁ e fungos

Amostras de pão foram inoculadas com *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 e NRRL 3000 (10^2 e 10^6 esporos) e irradiadas com 0, 1,0 e 2,0 kGy (25°C - ^{60}Co). Seguiu-se armazenamento por 10 dias a 25°C . A contagem total de fungos foi reduzida nas duas espécies fúngicas e nas duas concentrações de esporos. Na dose de 2,0 kGy, a produção de aflatoxina foi eliminada integralmente (Bullerman et al., 1973).

Grãos de trigo, milho e sorgo foram irradiados com 0,75 e 1,00 kGy (^{60}Co) e esterilizados com 5 mL de água ($121^\circ\text{C}/15$ minutos). Após inoculação com esporos de *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 (8×10^5 esporos/mL), procedeu-se a incubação durante 7 dias a 27°C . A produção de aflatoxina B₁ aumentou 45,7% em trigo, 31,4% em milho e 80,8% em sorgo, em relação a amostras não irradiadas (Priyadarshini & Tulpule, 1976).

Priyadarshini & Tulpule (1979) verificaram a produção de aflatoxina B₁ em trigo, após tratamento com ^{60}Co . Amostras de trigo (10 g), irradiadas com 0, 0,5, 0,75, 1,0, 2,0 e 2,5 kGy e esterilizadas por autoclavagem (15 psi/5 minutos), foram inoculadas com *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 (8×10^5 esporos/mL) e incubadas a 28°C por 7 dias. Novamente foi verificada uma maior produção de aflatoxina B₁ nas amostras irradiadas, quando comparada às amostras não irradiadas.

Aziz & El-Halfawy (1991) observaram que a irradiação gama (^{60}Co), em doses de 0,4-0,6 kGy e 2-4 kGy, inibiu completamente a presença de insetos e o crescimento fúngico em arroz e trigo armazenados. A 4,0 kGy o *Aspergillus flavus* foi completamente inibido e os grãos estavam completamente livres de fungos toxigênicos.

Resultados idênticos foram encontrados por El-Zawahry et al. (1991), quando observou-se que doses de ^{60}Co , 4 a 6 kGy inibiram completamente a microbiota fúngica de milho, cevada e trigo.

El-Far et al. (1992) verificaram o efeito da irradiação gama em dietas para aves domésticas. A partir de uma esterilização (121°C/25 minutos) e correção da umidade para 22% (equivalente a atividade de água de 0,95), foi realizada uma inoculação com *Aspergillus flavus* NRRL 5520. Seguiu-se uma incubação por 10 dias a 27°C. A população inicial de *Aspergillus flavus* 4,50 x 10⁸ UFC/g (amostra não irradiada) foi reduzida para 3,27 x 10¹ UFC/g, na dose de 5,0 kGy. Em 6,0 kGy, a contagem total de fungos foi reduzida integralmente. Nessa mesma dose não houve produção de aflatoxina B₁.

Amostras de trigo, milho e soja, fortificadas com 1000 µg/kg de aflatoxina B₁ e ajustadas para uma umidade de 9, 13 ou 17%, foram irradiadas com irradiação gama (⁶⁰Co) nas doses de 5,0, 7,5, 10,0 e 20,0 kGy. Os resultados revelaram que a irradiação gama não foi capaz de reduzir significativamente a aflatoxina B₁ nos três tipos de grãos e nos três níveis de umidade, mesmo a 20,0 kGy. A recuperação da toxina foi de 60 a 67% para milho e trigo, respectivamente, e mais de 90% para soja (Hooshmand & Klopfenstein, 1995).

Hassan & Aziz (1998) realizaram diferentes ensaios com milho e verificaram a produção de aflatoxina B₁ e o crescimento fúngico após irradiação e inoculação com *Aspergillus flavus* EA-81 (10⁶ esporos/mL) e encontraram os seguintes resultados:

(1) quando milho foi inoculado com *Aspergillus flavus* e irradiado com ⁶⁰Co (0, 1, 2, 3 e 4 kGy), os níveis de aflatoxina foram inferiores, após 45 dias, em todas as doses, em relação ao controle não irradiado. A aflatoxina B₁ não foi detectada após tratamento com 4,0 kGy de irradiação gama;

(2) a população fúngica de milho irradiado, após inoculado com 10⁶ esporos/g de *Aspergillus flavus* e armazenado por 15, 30 e 45 dias, foi reduzida à medida que as doses aumentavam de 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0. Na dose de 4,0 kGy não foi verificado crescimento fúngico;

(3) em outro experimento, milho úmido (25% de umidade) foi inoculado com 10^5 esporos/g antes e depois da irradiação com 2,0 kGy. Inoculação após irradiação com 2 kGy resultou em um aumento significativo da produção da aflatoxina B₁. Entretanto, quando a inoculação foi feita antes da irradiação (2 kGy), não houve produção de aflatoxina B₁.

A cevada, com uma umidade ajustada para 25%, foi inoculada com *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 (10^6 esporos/g) e irradiada com irradiação gama (^{60}Co) em doses de 1, 2, 3, 4 e 5 kGy. Após irradiação, as amostras foram mantidas a 28°C durante 20, 40, 60, 80 e 100 dias. Não houve crescimento fúngico e nem produção de aflatoxina B₁ em todo o período de tempo pesquisado, nas doses de 4 e 5 kGy (Aziz et al., 1999).

Aziz et al. (2002) verificaram a influência da irradiação gama (0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 kGy) na produção de aflatoxina B₁ pelo *Aspergillus flavus* EA-81, em meio de cultura com milho integral e desengordurado. Os resultados obtidos foram:

(a) o aumento da irradiação provocou um decréscimo da população fúngica viável. A 3,0 kGy não houve crescimento, após 45 dias de armazenamento a 30°C, em atividade de água de 0,84;

(b) também a partir de 3,0 kGy não houve produção de aflatoxina B₁;

Grãos de trigo e soja, com conteúdo de umidade ajustado para 25% e esterilização com dose de 20 kGy, foram inoculados com uma suspensão de esporos de *Aspergillus flavus* (10^8 esporos/mL) e irradiados com doses de 0, 1, 3 e 5 kGy. Posteriormente, foram mantidos a 25°C durante 30 dias. Dose de 5 kGy inibiu produção de aflatoxina B₁ e crescimento de *A.flavus* (Aziz & Mahrous, 2003).

Aquino (2003) avaliou o efeito da irradiação gama (^{60}Co) em milho acondicionado em ambiente de elevada umidade relativa e inoculado com uma cepa produtora de aflatoxina B₁. Após tratamento das amostras com irradiação

gama (^{60}Co) com uma dose de 20 kGy para eliminar a contaminação microbiana, foi feita uma inoculação com *Aspergillus flavus* IMI 190443 (1×10^6 esporos/ml), seguido de incubação por 15 dias a 25°C , em umidade relativa de 97,5%. Seguiu-se irradiação nas doses de 2, 5 e 10 kGy. Foi observada uma redução dos níveis de aflatoxina B₁ nas três doses, sendo que a 10 kGy não foi detectada a aflatoxina B₁. Houve redução significativa do número de unidades formadoras de colônias em todos os níveis de irradiação gama.

O impacto da irradiação gama (^{60}Co) no número de unidades formadoras de colônias, em duas variedades de café (Arábica e Robusta), foi avaliado por Ahmad et al. (2002). Ocorreu uma redução da microbiota fúngica na dose de 5,0 kGy: no café Arábica, de 120 UFC/g para 4 UFC/g, e no café Robusta, de 762 UFC/g para 0,4 UFC/g. A 10 kGy verificou-se uma completa ausência de fungos.

Refai et al. (2003) verificaram o efeito da irradiação gama (^{60}Co) em um alimento denominado Basterma (pasta composta de carne curada e condimentos), muito consumida no Egito e outros países vizinhos do Mediterrâneo, que apresentava níveis de aflatoxinas na faixa de 2,8 a 47 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Uma dose de 3 kGy reduziu a contagem de fungos de 9×10^3 UFC/g para 5×10^1 UFC/g. A 5 kGy a contagem de fungos foi nula e a aflatoxina B₁ foi totalmente destruída.

2.6.10.4 Em outras micotoxinas e fungos

Halász et al. (1989) verificaram o efeito da irradiação gama (^{60}Co) em milho e arroz com 50-55% de umidade. Amostras previamente esterilizadas ($120^\circ\text{C}/30$ minutos) foram incubadas com *Fusarium graminearum* 39/3 e *Fusarium tricinctum* 17, espécies produtoras de toxina F-2 e toxina T-2, respectivamente. Imediatamente após a inoculação, os grãos foram irradiados com doses de 0, 1, 3, e 9 kGy. Seguiu-se incubação por 7 dias a 20°C , seguidos

por 14 dias a 8-12°C e novamente a 20°C durante mais 7 dias. Foi verificado um aumento da toxina F-2 e T-2 em ambos os substratos, nas doses de 1,0 e 3,0 kGy. Em culturas tratadas com dose de 9,0 kGy, nenhuma toxina foi detectada e não foi observado crescimento visível de micélio.

Para avaliar a produção de ocratoxina A pelo *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174, Chelack et al. (1991) irradiaram com radiação gama (⁶⁰Co), em doses de 0, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 kGy, cevada com 25% de umidade, a qual foi incubada posteriormente a 28°C durante 51 dias. Os resultados encontrados foram:

(1) quando cevada foi inoculada com conídios de fungos toxigênicos (10⁶ conídios/g) e irradiado posteriormente, os níveis de ocratoxina A diminuíram em todas as doses, em relação ao controle (0 kGy). Não houve produção de ocratoxina A em dose de 4,0 kGy;

(2) em outro experimento, quando cevada foi inoculada com 10² e 10⁵ esporos/g, após irradiação de 2,0 kGy foi observada uma maior produção de ocratoxina A na menor concentração fúngica;

(3) quando a inoculação precedeu a irradiação (2,0 kGy), os níveis de ocratoxina A foram bem inferiores aos obtidos ao correspondente controle não irradiado e inoculado.

A produção de ácido tenuazônico foi avaliada em pasta e suco de tomate, esterilizados e inoculados com 10⁶ esporos/mL de *Alternaria alternata*, os quais tinham sido previamente submetidos a irradiação gama (0, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 kGy). Observou-se que a 4,0 kGy não houve crescimento fúngico e produção de toxina (Aziz et al., 1991).

O'Neil et al. (1996) observaram um aumento na produção de desoxinivalenol (DON) pelo *Fusarium culmorum* IMI 309344 em milho irradiado (0, 1,0 e 3,0 kGy), quando comparado a um controle sem irradiação.

Os valores de DON variaram de não detectado para 99,7 µg/kg, na dose de 1,0 kGy, e para 86,7 µg/kg na dose de 3,0 kGy.

A detoxificação de ocratoxina A em ração foi verificada após contaminação artificial (500 µg/kg) e irradiação com ⁶⁰Co nas doses de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 e 20 kGy. Em milho e soja, doses de 15 e 20 kGy destruíram completamente a ocratoxina A. Paralelamente, o efeito da irradiação gama no crescimento e na produção de ocratoxina A pelo *Aspergillus ochraceus*, em concentrados para aves domésticas, foi avaliado após inoculação (10⁶ esporos/g) e doses de 0, 0,25, 0,50, 1,00, 2,00, 3,00, 4,00 e 5,00 kGy. A 4,00 kGy, o crescimento de *A.ochraceus* e a subsequente produção de ocratoxina A foram completamente inibidos (Refai et al., 1996).

Visconti et al. (1996) observaram que a irradiação gama em dose de 15,0 kGy é capaz de destruir completamente colônias de *Fusarium moniliforme* em milho. Entretanto, essa mesma dose reduziu em apenas 20% o teor inicial de fumonisinas B1 e B2 em milho naturalmente contaminado.

O efeito da irradiação gama (0, 2, 4, 6 e 8 kGy) em micotoxinas de *Fusarium* (desoxinivalenol, toxina T-2 e zearalenona), em produtos naturalmente contaminados (trigo e farinha), foi avaliado por Aziz et al. (1997). Os resultados obtidos foram:

- (a) uma dose de 6,0 kGy eliminou completamente a flora fúngica;
- (b) os níveis das toxinas foram reduzidos em cerca de 50% na dose de 4,0 kGy. A 8,0 kGy, foram totalmente eliminadas.

Abdel-Aal & Aziz (1997) avaliaram o efeito da irradiação gama (0, 0,5, 1,5, 2,5, 3,5 e 4,0 kGy) em queijo após inoculação com *Penicillium viridicatum*, *Penicillium cyclopium* e *Penicillium chrysogenum* (10⁶ esporos/g), seguida de incubação a 25^oC durante 40 dias. A produção de ocratoxina A, ácido ciclopiazônico e ácido penicílico decresceu quando comparada ao controle não irradiado e inoculado. Na dose de 4,0 kGy não foi detectada nenhuma toxina.

Aziz & Moussa (2002) verificaram o efeito da irradiação gama em micotoxinas de ocorrência natural em frutas. Observou-se, que das 100 amostras de frutas (morango, ameixa, uva, maçã, pêra, amora, etc) acondicionadas durante 28 dias à temperatura de refrigeração ($< 10^{\circ}\text{C}$), 81 estavam contaminadas com micotoxinas. Ácido penicílico e patulina foram detectados em 28 e 33 amostras, respectivamente. Aflatoxina B₁ e ácido ciclopiazônico foram detectados em 6 e 10 amostras, respectivamente. Ocratoxina A foi detectada em 7 amostras e citrinina, em oito. A produção de micotoxinas em frutas decresceu com o aumento da dose de irradiação e não foi detectada a 5,0 kGy.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AAL, S. S.; AZIZ, N. H. Effect of gamma radiation on mycotoxin production by toxigenic moulds in local Karish cheese. **Egyptian Journal of Microbiology**, Cairo, v. 32, n. 2, p. 151-168, 1997.

ADÃO, R. C. **Influência da radiação gama no amadurecimento e nos teores de aminas biogênicas em banana prata (*Musa acuminata* x *Musa balbisiana*)**. 1998. 73 p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

AHMAD, R.; THARAPPAN, B.; BONGIRWAR, D. R. Impact of gamma irradiation on the monsooning of coffee beans. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 149-157, 2002.

AL-BACHIR, M. Effect of gamma irradiation on storability of two cultivars of Syrian grapes (*Vitis vinifera*) **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v.55, p. 81-85, 1999.

ALDRYHIM, Y. N.; ADAM, E. E. Efficacy of gamma irradiation against *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 225-232, July 1999.

ALMEIDA, F. R. de F. Amendoim. **Agroanalysis**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 3, p. 26-27, Mar. 1996.

ALMEIDA, L. P. **Influência da radiação gama na inibição do brotamento do rizoma e na qualidade da cúrcuma em pó**. 2000. 60 p. Dissertação. (Mestre em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

AMENDOIM. **Agrianual** 98: anuário da agricultura brasileira, São Paulo, p. 111-117, 1998.

APPLEGATE, K. L.; CHIPLEY, J. R. Daily variations in the production of aflatoxins by *Aspergillus flavus* NRRL-3145 following exposure to ⁶⁰Co irradiation. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v. 37, n. 3, p. 359-372, 1974a.

APPLEGATE, K. L.; CHIPLEY, J. R. Effects of ^{60}Co gamma irradiation on aflatoxin B₁ and B₂ production by *Aspergillus flavus*. **Mycologia**, Bronx, v. 66, n. 3, p. 436-445, 1974b.

APPLEGATE, K. L.; CHIPLEY, J. R. Increased aflatoxin G₁ production by *Aspergillus flavus* via gamma irradiation. **Mycologia**, Bronx, v. 65, n. 6, p. 1266-1273, 1973a.

APPLEGATE, K. L.; CHIPLEY, J. R. Increased aflatoxin production by *Aspergillus flavus* via cobalt irradiation. **Poultry Science**, Champaign, v. 52, n. 4, p. 1492-1496, July 1973b.

AQUINO, S. **Efeitos da radiação gama no crescimento de *Aspergillus flavus* produtor de aflatoxinas e no emprego da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostra de grãos de milho inoculadas artificialmente.** 2003. 85 p. Dissertação (Mestre em Tecnologia Nuclear) - Universidade de São Paulo.

ARANHA, F. Irradiação garante qualidade do sangue. **Brasil Nuclear**, v 9, n. 24, jan./mar. 2002.

ATROSHI, F.; RIZZO, A.; WESTERMARCK, T.; ALI-VEHMAS, T. Antioxidant nutrients and mycotoxins. **Toxicology**, Clare, v. 180, n. 2, p. 151-167, Nov. 2002.

AWUAH, R. T.; KPODO, K. A. High incidence of *Aspergillus flavus* and aflatoxins in stored groundnut in Ghana and the use of a microbial assay to assess the inhibitory effect of plant extracts on aflatoxin synthesis. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 134, n. 2, p. 109-114, 1996.

AZEREDO, G. A.; BRUNO, R. L. A.; SOUZA, A. P.; SILVA, A. BRUNO, G. B.; QUEIROGA, V. P. Qualidade fisiológica de sementes armazenadas de amendoim. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 50, n. 288, p. 127-141, mar./abr. 2003.

AZIZ, N. H.; ABDEL-REHIM, L. M.; EL-FAR, F. M. A. Effect of gamma-irradiation on aflatoxin B₁ produced by *Aspergillus parasiticus* in barley containing antimicrobial food additives. **Egyptian Journal of Radiation Science and Application**, Cairo, v. 12, n. 2, p. 101-116, 1999.

AZIZ, N. H.; ABDEL EL-AAL, S. S.; HEGAZIE, S. M. Peanut (*Arachis hypogaea* L.) as a substrate for growth and aflatoxin production by aflatoxigenic strains of *Aspergillus spp.* Under some environmental conditions. **Al-Azhar Journal of Microbiology**, Cairo, v. 26, n. 1, p. 51-59, 1994.

AZIZ, N. H.; ATTIA, E.-S. A.; FARAG, S. A. Effect of gamma-irradiation on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in wheat, flour and bread. **Nahrung**, Cairo, v. 41, n. 1, p. 34-37, 1997.

AZIZ, N. H.; EL-HALFAWY, N. A. Decontamination of toxigenic moulds in stored grains by gamma irradiation. **Isotope Radiation Research**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 41-47, 1991.

AZIZ, N. H.; EL-ZEANY, S. A.; MOUSSA, A. A. Influence of γ -irradiation and maize lipids on the production of aflatoxin B₁ by *Aspergillus flavus*. **Nahrung Food**, Cairo, v. 46, n. 5, p. 327-331, Oct. 2002.

AZIZ, N. H.; FARAG, S.; HASSANIN, M. A. Effect of gamma irradiation and water activity on mycotoxin production of *Alternaria* in tomato oaste and juice. **Nahrung**, Nahrung-Food, Cairo, v. 35, n. 4, p. 359-362-1991.

AZIZ, N. H.; MAHROUS, S. R. Effects of gamma irradiation and chemical composition of some crop seeds on aflatoxin B₁ production by *Aspergillus flavus*. **Journal of Agricultural Sciences Mansoura University**, Cairo, v. 28, n. 1, p. 649-661, 2003.

AZIZ, N. H.; MOUSSA, L. A. A. Influence of gamma-irradiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits. **Food Control**, Oxford, v. 13, n. 4/5, p. 281-288, June/July 2002.

AZIZ, N. H.; YOUSSEF, B. M. Inactivation of naturally occurring of mycotoxins in some egyptian foods a and agricultural commodities by gamma irradiation. **Egyptian Journal of Food Science**, Cairo, v. 30, n. 1, p. 167-177, 2002.

BATA, A.; LASZTITY, R. Detoxication of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 10, n. 6/7, p. 223-228, June/July 1999.

BEAVER, R. W. Decontamination of mycotoxin-containing foods and feedstuffs. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 2, n. 7, p. 170-173, 1991.

BENNETT, J. W.; HOROWITZ, P.C.; LEE, L. S. Production of sclerotia by aflatoxigenic and nonaflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **Mycologia**, Bronx, v. 71, n. 2, p. 415-422, 1979.

BEUCHAT, L. R. Media for detecting and enumerating yeasts and moulds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 145-158, Oct. 1992.

BHAT, R. V. Mould deterioration of agricultural commodities during transit: problems faced by developing countries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 7, n. 3, p. 219-225, Dec. 1988.

BHATNAGAR, D.; EHRLICH, K. C.; CLEVELAND, T. E. Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, v. 61, n. 2, p. 83-93, Apr. 2003.

BHATTACHARYA, K.; RAHA, S. Deteriorative changes of maize, groundnut and soybean seeds by fungi in storage. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 155, n. 3, p. 135-141, 2002.

BIDAWID, S.; FARBER, J. M.; SATTAR, S. A. Inactivation of hepatitis A virus (HAV) in fruits and vegetables by gamma irradiation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 57, n. 1/2, p. 91-97, June 2000.

BINGHAM, A. K.; PHILLIPS, T. D.; BAUER, J. E. Potential for dietary against the effects of aflatoxins in animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chaumburg, v. 222, n. 5, p. 591-596, Mara. 2003.

BITTAR, A. M.; LÁZZARI, F. A. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 363-367, out./dez. 1998.

BRAGA, S. R.; RIBEIRO, F.; NORDIN, N. Detection of aflatoxins in peanut products traded in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 10., 2000, Guarujá. **Proceedings...** Guarujá: IAL, 2000. p.125.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 21, de 26 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento para irradiação de alimentos. **Publicada no Diário Oficial da União** de 29 de janeiro de 2001.

BRASIL. 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 **Diário Oficial da União** de 16 de outubro de 2002.

BRASIL. Leis, decretos, etc. - Resolução n.º 34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para alimentos Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos. **Diário Oficial**, Brasília, DF, 19 jan. 1977. Seção I, pt. 1, p. 710.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento e da Reforma Agrária. 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. Publicado no **Diário Oficial da União** de 25 de março de 1996.

BRITO, M. S.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H.; MANCINI-FILHO, J. Effects of irradiation on trans fatty acids formation in ground beef. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 63, n. 3/6, p. 337-340, Mar. 2002.

BRUYN, I. N. The application of high dose food irradiation in South Africa. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 57, p. 223-225, 2000.

BUENO, D. J.; SILVA, J. O.; OLIVER, G. Fungal isolation and enumeration in foods. **Methods in Molecular Biological**, Oxford, v. 268, p. 127-132, 2004.

BULLERMAN, L. B.; BARNHART, H. M.; HARTUNG, T. E. Use of γ -irradiation to prevent aflatoxin production in bread. **Journal of Food Science**, Chicago, v.38, n. 7, p. 1238-1240, 1973.

BULLERMAN, L. B.; HARTUNG, T. E. Effect of low dose gamma irradiation on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Journal Milk of Food Technology**, Des Moines, v. 37, n. 8, p. 430-434, 1974.

BYUN, M.W.; LEE, J. W.; YOON, H. S.; JO, C.; KIM, H. Y. Application of gamma irradiation for inhibition of food allergy. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 63, n. 3/6, p. 369-370, Mar. 2002.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n.3, p. 1-10, jun. 2002.

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA – CENA.

Irradiação de alimentos. 2003. Disponível em:

<<http://www.cena.usp.br/irradiacao/irradiacaoalimentos.htm>. Acesso em: 8 abril 2003a.

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA - CENA.

Processos de irradiação. 2003. Disponível em: <[ttp://www.](http://www.cena.usp.br/irradiacao/principios.htm)

[cena.usp.br/irradiacao/principios.htm](http://www.cena.usp.br/irradiacao/principios.htm). Acesso em: 8 abril 2003b.

CHELACK, W. S.; BORSA, J.; MARQUARDT, R. R.; FROHLICH, A. A. Role of the competitive microbial flora in the radiation-induced enhancement of ochratoxin production by *Aspergillus alutaceus* var. *alutaceus* NRRL 3174. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 9, p. 2492-2496, Sept. 1991.

CHIOU, R. Y. Y.; KOEHLER, P. E.; BEUCHAT, L. R. Hygroscopic characteristics of peanut components and their influence on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 47, n. 10, p. 791-794, Oct. 1984.

CHIOU, R. Y. Y.; LIN, C. M.; SHYU, S. L. Property characterization of peanut kernels subjected to gamma irradiation and its effect on the outgrowth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 1, p. 210-213, Jan./Feb. 1990.

CHIOU, R. Y. Y.; SHYU, S. L.; TSAI, C. L. Characterization of gamma irradiated peanut kernels stored one year under ambient and frozen conditions. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, n. 5, p. 1375-1377, Sept./Oct. 1991.

CLARDY, S.; FOLEY, D. M.; CAPORASO, F.; CALICCHIA, M. L.; PRAKASH, A. Effect of gamma irradiation on *Listeria monocytogenes* in frozen, artificially contaminated sandwiches. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 11, p. 1740-1744, Nov. 2002.

CLEVELAND, T. E.; DOWD, P. F.; DESJARDINS, A. E.; BHATNAGAR, D.; COTTY, P. J. United States Department of Agriculture - Agricultural Service research on pre-harvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in US crops. **Pest Management Science**, Sussex, v. 59, n. 6/7, p. 629-642, June/July 2003.

COLLISON, E.; OHACRI, G.; WADUL-MIAN, M.; NKAMA, I.; NEGBENEBOR, C.; IGENE, J. Fungi associated with stored unprocessed cowpea and groundnut varieties in Borno State, Nigeria. **Journal of Hygiene Epidemiology Microbiology and Immunology**, Praga, v. 36, n. 4, p. 338-345, 1992.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Produção brasileira de grãos**. 2004. Disponível em : <<http://conab.gov.br/safras.asp>>. Acesso em: 6 maio 2004.

COTTY, P. J.; CARDWELL, K. F. Divergence of west African and north American Communities of *Aspergillus* Section *Flavi*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 5, p. 2264-2266, May 1999.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY - CAST. **Mycotoxins: economics and health risks**. Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Tecnology, 2003. Task Force Report 139.

CRUSCIOL, C. A. C.; LAZARINI, E.; GOLFEITO, A.R.; SÁ, M. E. Produtividade e componentes da produção do amendoim da seca em razão da época de semeadura e da aplicação de cálcio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n. 8, p. 1549-1558, ago. 2000.

DEL MASTRO, N. L. Alimentos esterilizados para uso em hospitais e rações alimentares. **Revista Brasileira de Pesquisa e Desenvolvimento**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 4, 1999.

DIEHL, J. F. Food irradiation: is it an alterative to chemical preservatives? **Food Additives and Contaminants**, London, v. 9, n. 5, p. 409-416, Sept./Oct. 1992.

DIEHL, J. F.; JOSEPHSON, E. S. Assessment of wholesomeness of irradiated foods. **Acta Alimentaria**, Dudapeste, v. 23, n. 2, p. 195-214, June 1994.

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. **Journal American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 44, n. 4, p. 259, 1967.

DILKIN, P.; MALLMANN, C. A. Sinais clínicos e lesões causadas por micotoxinas. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 11., 2004, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: USP/ESALQ, 2004. p. 32-35.

- DIOP, Y. M.; NDIAYE, B.; DIOUF, A.; FALL, M.; THIAM, A.; CISS, M.; HASSELMANN, C.; BA, D. Aflatoxines dans les aliments: Essais de decontamination des tourteaux d'arachides par traitement ionisant. **Dakar Médical**, Dakar, v. 44, n. 2, p. 149-152, 1999.
- DORNER, J. W.; COLE, R. J. BLANKENSHIP, P. D. Use of a biocompetitive agent to control preharvest aflatoxin in drought stressed peanuts. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 55, n. 11, p. 888-892, Nov. 1992.
- DORNER, J. W.; COLE, R. J. SANDERS, T. H.; BLANKENSHIP, P. D. Interrelation of kernel water activity, soil temperature, maturity, and phytoalexin production in preharvest aflatoxin contamination of drought-stressed peanuts. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 105, n. 2, p. 117-128, Feb. 1989.
- DORNER, J. W.; COLE, R. J.; CONNICK, W. J.; DAÍGLE, D. J.; MCGUIRE, M. R.; SHASHA, B. S. Evaluation of biological control formulation to reduce aflatoxin contamination in peanuts. **Biological Control**, San Diego, v. 26, n. 3, p. 318-324, Mar. 2003.
- DOYLE, M. P.; APPLEBAUM, R. S.; BRACKETT, R. E.; MARTH, E. H. Physical, chemical and biological degradation of mycotoxins in foods and agricultural commodities. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 45, n.10, p. 964-971, Oct. 1982.
- DROBY, S.; LISCHINSKI, S.; COHEN, L.; WEISS, B.; DAUS, A.; CHANDGOYAL, T.; ECKERT, J. W.; MANULIS, S. Characterization of an Epiphytic yeast population of grapefruit capable of suppression of green mold decay caused by *Penicillium digitatum* .**Biological Control**, San Diego, v. 16, n. 1, p. 27-34, Sept. 1999.
- DRUVEFORS, U. Ä. **Yeast biocontrol of grain spoilage moulds**. 2004. 44 p. Thesis (Doctoral) - University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- EGEL, D. S.; COTTY, P. J.; ELIAS, K. Relationships among isolates of *Aspergillus* sect. *flavi* that vary in aflatoxin production. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, n. 9, p. 906-912, Sept. 1994.
- EGNER, P. A.; MUNOZ, A.; KENSLER, T. W. Chemoprevention with chlorophyllin in individuals exposed to dietary aflatoxin. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 523/524, p. 209-216, Feb./Mar. 2003. Supplement.

EL-FAR, F.; AZIZ, N. H.; HEGAZY, S. Inhibition by gamma-irradiation and antimicrobial food additives of aflatoxin B₁ production by *aspergillus flavus* in poultry diet. **Nahrung Food**, v. Cairo, 36, n. 2, p. 143-149, 1992.

EL-KADY, L. A.; FARGHALY, M. S. Inactivation of aflatoxins in contaminated peanuts. **Cryptogamie Mycologie**, Paris, v. 2, n. 2, p. 131-136, 1981.

ELLIS, W. O.; SMITH, J. P.; SIMPSON, B. K. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 30, n. 3, p. 403-438, Mar. 1991.

EL-ZAWAHRY, Y. A.; AZIZ, N. H.; EL-FOULY, M. Z. Incidence of toxic and pathogenic microorganisms in different Egyptian and Saudi Arabian food commodities and their decontamination by gamma irradiation. **Egyptian Journal of Microbiology**, Cairo, v. 26, n. 2, p. 267-282, 1991.

EMPRESA BRASILEIRA DE IRRADIAÇÃO - EMBRARAD. Alimentos. 2003. Disponível em: <<http://embrarad.com.br/alimentos-hipertexto.asp>>. Acesso em: 8 abr. 2003.

FAGUNDES, M. H. Sementes de amendoim: alguns comentários. 2002. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 6 maio 2004.

FARAG, R. S.; RASHED, M. M.; HUSSEIN, A. A.; ABO-HAGAR, A. Effect of gamma irradiation on the infected yellow corn and peanuts by *Aspergillus flavus*. **Chemical Mikrobiology Tecnology Lebensm**, v. 17, n. 3/4, p. 93-98, 1995.

FARAJ, M. K.; SMITH, J. E.; HARRAN, G. Aflatoxin biodegradation: effects of temperature and microbes. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, n. 11, p. 1388-1392, Nov. 1993.

FERNANDEZ, E. M.; ROSOLEN, C. A.; MARINGONI, A. C.; OLIVEIRA, D. M. T. Fungus incidence on peanut grains as affect by drying method and Ca nutrition. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 52, n. 1/2, p. 9-15, May 1997.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C.; THRANE, U. Moulds in food spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 85-102, Nov. 1996.

FOLEY, D. M.; DUFOUR, A.; RODRIGUEZ, L.; CAPORASO, F.; PRAKASH, A. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 in shredded iceberg lettuce by chlorination and gamma irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, London, v. 63, n. 3/6, p. 391-396, Mar. 2002.

FONSECA, H. Contribuição ao estudo da ocorrência de aflatoxina em torta, farelos e farinhas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) no Estado de São Paulo. **Anais da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz**, Piracicaba, v. 25, p. 47-49, 1968.

FONSECA, H.; MARTINELLI, A.F.; DEL NERY, H.; RONCATTO, E. Espécies de *Aspergillus flavus* produtoras de aflatoxinas na região Araraquarense, São Paulo. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz**, Piracicaba, v. 31, p. 519-526, 1974.

FOONG, S. C. C.; GONZALEZ, G. L.; DICKSON, J. S. Reduction and survival of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meats after irradiation. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 1, p. 77-82, Jan. 2004.

FREIRE, R. M. M.; SANTOS, R. C.; BELTRÃO, N. E. M. Qualidade nutricional e industrial de algumas oleaginosas herbáceas cultivadas no Brasil. **Óleos & Gorduras**, São Caetano do Sul, v. 45, p. 49-53, 1996.

FREITAS, S. M.; GODOY, I. J.; VIEIRA, R.D. Aspectos comparativos da produção e comercialização de amendoim nos países de Mercosul. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 25, n. 1, p.49-56, jan. 1995.

FU, J.; SHEN, W.; BAO, J.; CHEN, Q. The decontamination effects of gamma irradiation on the edible gelatin. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 57, n. 3/6, p. 345-348, Mar. 2000.

FUNDAÇÃO DE APOIO À PESQUISA AGRÍCOLA - FUNDAG. **Amendoim**, v. 2, n. 3, p. 1-2, 2004. Disponível em: <<http://fundag.br>>. Acesso em: 21 maio 2004.

GALVEZ, F. C. F.; FRANCISCO, M. L. D. L.; VILLARINO, B. J.; LUSTRE, A. O.; RESURRECCION, A. V. A. Manual sorting to eliminate aflatoxin from peanuts. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 10, p. 1879-1884, Oct. 2003.

GEISER, D. M.; DORNER, J. W.; HORN, B. W.; TAYLOR, J. W. The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 31, n. 3, p. 169-179, Dec. 2000.

GIROUX, M.; LACROIX, M. Nutritional adequacy of irradiated meat - a review. **Food Research International**, Amsterdam, v. 31, n. 4, p. 257-264, 1998.

GODOY, I. J.; MORAES, S. A.; KASAI, F. S.; MINOTTI, D.; NOMI, A. K.; MAKIMOTO, P. **Prevenção da aflatoxina no amendoim**. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, 2001. 22 p. (Boletim).

GODOY, I. J.; MORAES, S. A.; ZONOTTO, M. D.; SANTOS, R. C. Melhoramento do amendoim. In: BORÉM, A. (Ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, UFV: Imprensa Universitária, 1999. p. 51-94.

GOLDMAN, R. G.; SHIELDS, P. G. Food mutagens. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 133, p. 965S-973S, 2003. Supplement 3.

GONG, Y. Y.; EGAL, S.; HOUNSA, A.; TURNER, P. C.; HALL, A. J.; CARDWELL, K. F.; WILD, C. P. Determinants of aflatoxin exposure in young children from Benin and Togo, West Africa: the critical role of weaning. **International Epidemiological Association**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 556-562, Aug. 2003.

GONZALEZ, O.; DIMAUNAHAN, L. B.; PILAC, L. M.; ALABASTRO, V. Q. Effects of gamma radiation in peanuts, onion, and ginger. **The Philippine Journal of Science**, Manila, v. 98, n. 3/4, p. 279-293, 1972.

GOURAMA, H.; BULLERMAN, L. B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: a Review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 12, p. 1395-1404, Dec. 1995.

HAAS, P.; SCUSSEL, V. M. Carcinoma Hepatocelular versus aflatoxina B₁ no Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 11., 2004, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: USP/ESALQ, 2004. p. 36-38.

HAAS, P.; SCUSSEL, V. M. Hepato celular carcinoma and hepatic diseases associated to consumption of food contaminated by AFB₁ in Santa Catarina. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 10., 2000, Guarujá. **Proceedings...** Guarujá: IAL, 2000. p. 86.

HALÁSZ, A.; BADAWAY, A.; SAWINSKY, J.; KOZMA-KOVACS E.; BECZNER, J. Effect of γ -irradiation on F-2 and T-2 toxin production in corn and rice. **Folia Microbiology**, Prague, v. 34, n. 3, p. 228-232, 1989.

HASSAN, A. A.; AZIZ, N. H. Influence of moisture content and storage temperature on the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus* EA-81 in maize after exposure to gamma radiation. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v. 18, n. 3, p. 159-171, Oct. 1998.

HERNANDES, N. K.; VITAL, H. C.; SABAA-SRUR, U. O. Irradiação de alimentos: vantagens e limitações. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 37, n. 2, p. 154-159, jul./dez. 2003.

HILL, R. A.; BLANKENSHIP, P. D.; COLE, R. J.; SANDERS, T. H. Effects of soil moisture and temperature on preharvest invasion of peanuts by the *Aspergillus flavus* group and subsequent aflatoxin development. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 45, n.2, p. 628-633, Feb. 1983.

HILMY, N.; CHOSDU, R.; MATSUYAMA, A. The effect of humidity after gamma irradiation on aflatoxin B-1 production of *A.flavus* in ground nutmeg and peanut. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 46, n. 4-6, p. 705-711, Oct./Dec. 1995.

HOOSHMAND, H.; KLOPFENSTEIN, C. F. Effects of gamma irradiation on mycotoxin disappearance and amino acid contents of corn, wheat, and soybean with different moisture contents. **Plant foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 47, n. 3, p.227-238, Apr. 1995.

HORN, B. W.; DORNER, J. W. Regional differences in production of aflatoxin B₁ and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 4, p. 1444-1449, Apr. 1999.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS - IAC. 2001. **Amendoim – Tatu**. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br>>. Acesso em: 7 maio 2004.

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**. Lyon, 1993. v. 56. p. 397-488.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGY
SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. Toxigenic Fungi: *Aspergillus*. In: **Microorganisms in foods: characteristics of food pathogens**. London: Academic Press, 1996. v. 5, p. 347-381.

ISMAIL, M. A. Deterioration and spoilage of peanuts and desiccated coconuts from two sub-Saharan tropical East African Countries due to the associated mycobiota and their degradative enzymes. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 150, n. 2, p. 67-84, 2001.

ITO, Y.; PETERSON, S. W.; WICKLOW, Q. T.; GOTO, T. *Aspergillus pseudotamarii*, new aflatoxin producing specie in aspergillus section Flavi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 2, p. 233-239, Feb. 2001.

JORGE, M. R.; GARZÓN, E. S. Control mediante radiaciones gamma de flora fungica presente en alimentos de consumo humano y animal. **Alimentaria**, Madrid, v. 95, p. 115-117, 1995.

KILCAST, D. Effect of irradiation on vitamins. **Food Chemistry**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 157-164, 1994.

KIM, B. H.; JANG, A.; LEE, S. O.; MIN, J. S.; LEE, M. Combined effect of electron-beam (beta) irradiation and organic acids on shelf life of pork loins during cold storage. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 1, p. 168-171, Jan. 2004.

KURTZMAN, C. P.; HORN, B. W.; HESSELTINE, C. W. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 53, n. 3, p. 147-158, 1987.

LACHANCE, M. A.; PANG, W. M. Predacious yeasts. **Yeast**, Sessex, v. 13, n. 3, p. 225-232, Mar. 1997.

LACHANCE, M. A.; PUPOVAC-VELIKONJA, A.; NATARAJAN, S.; SCHLAG-EDLER, B. Nutrition and phylogeny of predacious yeasts. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 46, n. 6, p. 495-505, June 2000.

LACROIX, M.; OUATTARA, B. Combined industrial processes with irradiation to assure innocuity and preservation of food products - a review. **Food Research International**, Amsterdam, v. 33, n. 9, p. 719-724, 2000.

LAMB, J. L.; GOGLEY, J. M.; THOMPSON, M. J.; SOLIS, D. R.; SEN, S. Effect of low-dose gamma irradiation on *Staphylococcus aureus* and product packaging in ready-to-eat ham and cheese sandwiches. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 11, p. 1800-1805, Nov. 2002.

LANDGRAF, M. Controle do desenvolvimento microbiano nos alimentos. In: MELO FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003. Cap. 7. p. 109-148.

LEE, L. S.; CUCULLU, A. F.; FRANZ, A. O.; PONS, W. A. Destruction of aflatoxins in peanuts during dry and oil roasting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 17, n. 3, p. 451-453, 1969.

LEE, L. S.; CUCULLU, A. F.; GOLDBLATT, L. A. Appearance and aflatoxin content of raw and dry roasted peanut kernels. **Food Technology**, Chicago, v. 22, n. 9, p. 1131-1134, Sept. 1968.

MAGAN, N.; HOPE, R.; CAIMS, V.; ALDRED, D. Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. **European Journal of Food Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 7, p. 723-730, Sept. 2003.

MARTIN NETO, L.; RODRIGUES, H. R.; TRAGHETTA, D. G. **Uso de radiação ionizante para esterilizar alimentos e detecção de formação de radicais livres por EPR**. São Carlos: EMBRAPA, 1996. 11 p. (EMBRAPA. Circular Técnica ; n.2).

MATSUDA, A.H. **Aplicação da técnica de irradiação gama para preservação de própolis**. 2002. 71 p. Dissertação. (Mestre em Ciência na área de Tecnologia Nuclear) - Universidade São Paulo, São Paulo.

MCKENZIE, K. S.; SARR, A. B.; MAYURA, K.; BAILEY, R. H.; MILLER, D. R.; ROGERS, T. D.; NORRED, W. P.; VOSS, K. A.; PLATTNER, R. D.; KUBENA, L. F. PHILLIPS, T. D. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.35, n. 8, p. 807-820, Aug. 1997.

MEHAN, V. K.; MCDONALD, D.; RAMAKRISHNA, N. Varietal resistance in peanut to aflatoxin production. **Peanut Science**, Raleigh, v. 13, n. 1, p. 7-10, 1986.

MENASHEROV, M.; PASTER, N.; NITZAN, R. Effects of physical preservation methods on sclerotial germination in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus* in stored grain. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 70, n. 6, p. 1206-1210, June 1992.

MILLER, J. D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research**, Elmsford, v. 31, n. 1, p. 1-16, Jan. 1995.

MISLIVEC, P. B.; DIETER, C. T.; BRUCE, V. R. Effect of temperature and relative humidity on spore germination of mycotoxic species of *Aspergillus* and *Penicillium*. **Mycologia**, Bronx, v. 67, n. 6, p. 1187-1189, 1975.

MITCHELL, G. E. Influence of irradiation of food on aflatoxin production. **Food Technology**, Chicago, v. 40, n.8, p. 324-326, Aug. 1988.

MIXON, A. C. Reducing *Aspergillus* species infection of peanut seed using resistant genotypes. **Journal Environmental Quality**, Madison, v. 15, n. 2, p. 101-103, Apr./June 1986.

MIYAGUSKU, L.; CHEN, F.; LEITÃO, M. F.; BAFFA, O. Avaliação microbiológica e sensorial da vida útil de cortes de peito de frango irradiados. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 7-16, 2003. Suplemento.

MORAES, G. W. G. Estudos sobre a aflatoxina I. Revisão Bibliográfica. **Arquivos Escola Veterinária**, Belo Horizonte, v. 16, p. 281-317, 1964.

MORAES, I. R. O uso de radiação ionizante no controle e prevenção de doenças transmitidas por alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 75, p. 36-39, ago. 2000.

MOSS, M. O. Economic importance of mycotoxins. Recent Incidence. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 195-204, 1991.

MOSS, M. O. Mycotoxins. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, p. 513-523, 1996.

- MPHANDE, F. A.; SIAME, B. A.; TAYLOR, J. E. Fungi, aflatoxins, and cyclopiazonic acid associated with peanut retailing in Botswana. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 1, p. 96-102, Jan. 2004.
- NAKAGAWA, J.; ROSOLEM, C. A.; ALMEIDA, R. M.; Efeitos da maturação e dos métodos de secagem na qualidade de sementes de amendoim. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 8, n. 3, p. 83-98, 1986.
- NICACIO, M. A. S.; PRADO, G.; LINARDI, V. R. Determinação de aflatoxina e identificação da microbiota fúngica em milho (*Zea mays* L.) pós-colheita. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 38, p. 851-857, out./dez. 1995.
- NORTHOLT, M. D.; BULLERMAN, L. B. Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 45, n. 6, p. 519-526, June 1982.
- NORTHOLT, M. D.; EGMOND, H. P.; PAULSCH, W. E. Differences between *Aspergillus flavus* strains in growth and aflatoxin B₁ production in relation to water activity and temperature. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 40, n. 11, p. 778-781, Nov. 1977.
- O'NEILL, K.; DAMOGLU, A. P.; PATTERSON, M. F. The influence of gamma radiation and substrate on mycotoxin production by *Fusarium culmorum* IMI 309344. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 81, n. 5, p. 518-524, Nov. 1996.
- OGUNDERO, V. W. Temperature and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* strains from Nigerian groundnuts. **Journal Basic Microbiology**, Berlin, v. 27, n. 9, p. 511-514, 1987.
- OKEZIE, B. O. World food security: The role of postharvest technology. **Food Technology**, Chicago, v. 52, n. 1, p. 64-69, Jan. 1998.
- OLIVEIRA, M. S.; PRADO, G.; ABRANTES, F. M.; SANTOS, L. G.; VELOSO, T. Incidência de aflatoxinas, desoxinivalenol e zearalenona em produtos comercializados em cidades do estado de Minas Gerais no período de 1998 - 2000. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 61, n.1, p. 1-6, jan./jun. 2002.

PARK, K. Y.; BULLERMAN, L. B. Effects of substrate and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 46, n. 3, p. 178-184, Mar. 1983.

PASTER, N.; BULLERMAN, L. B. Mould spoilage and mycotoxin formation in grains as controlled by physical means. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.7, n. 3, p. 257-265, Dec. 1988.

PEPELJNJAK, S.; SLOBODNJAK, Z.; SEGVIC, M.; PERAICA, M.; PAVLOVIC, M. The ability of fungal isolates from human lung aspergilloma to produce mycotoxins. **Human Experimental Toxicology**, London, v. 23, n. 1, p. 15-19, Jan. 2004.

PETERSSON, S.; SCHNÜRER, J. *Pichia anomala* as a biocontrol agent of *Penicillium roqueforti* in high-moisture wheat, rye, barley, and oats stored under airtight conditions. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 44, n. 5, p. 471-476, May 1998.

PIMENTA, R. S. **Utilização de leveduras predadoras como agentes de controle biológico de doenças pós-colheita**. 2004. 130 p. Tese. (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PITT, J. I. Corrections to species names in physiological studies on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.56, n. 3, p. 265-269, Mar. 1993.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important? **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, p. 17-22, 2000. Supplement 1.

PITT, J. I.; BASÍLICO, J. C.; ABARCA, M. L.; LÓPEZ, C. Mycotoxins and toxigenic fungi. **Medical Mycology**, Oxford, v.38, Supplement I, p. 41-46, 2000.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D.; BHUDHASAMAI, K.; MISCAMBLE, B. F.; WHEELER, K. A.; TANBOON-EK, P. The normal mycoflora of commodities from Thailand. 1. Nuts and oilseeds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 20, n. 4, p. 211-226, 1993.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D.; MISCAMBLE, B. F.; DHARMAPUTRA, O. S.; KUSWANTO, K. R.; RAHAYU, E.S. The mycoflora of food commodities from Indonesia. **Journal of Food Mycology**, North Ryde, v.1, n.1, p. 41-60, 1998.

PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds: a decade in review. In: KOE, W.; SAMSON, R. A.; VAN EGMOND, H. P.; GILBERT, J.; SABINO, M. (Ed.). **Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium**. Guraruja, 2001. Chap. 6, p. 153-172. (Proceedings of the 10th International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxin Guarujá, 2000).

PLUYER, H. R.; AHMED, E. M.; WEI, C. I. Destruction of aflatoxins on peanuts by oven- and microwave-roasting. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 50, n. 6, p. 504-508, June 1987.

POZZI, C. R.; CORRÊA, B. ; GAMBALE, W.; PAULA, C.R.; CHACON-RECHE, M. O.; MEIRELLES, M. C. A. Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxin occurrence. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 12, n. 3, p. 313-319, May/June 1995.

PRADO, G. Incidência de aflatoxina B₁ em alimentos. **Revista de Farmácia Bioquímica**, Belo Horizonte, v. 5, n. 2, p. 147-157, 1983.

PRADO, G. **Utilização de leveduras como agentes de controle biológico de fungos produtores de aflatoxina B₁ em alimentos**. 2004. 36 p. Exame de Qualificação (Mestre em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PRADO, G.; GODOY, I. J.; OLIVEIRA, M. S.; GAZZINELLI-MADEIRA, J. E.; JUNQUEIRA, R. G.; FERREIRA, S. O. Teste preliminar de resistência de dois genótipos de amendoim 2117 e Tatu Vermelho, com relação à produção de aflatoxina B₁ por uma espécie toxigênica de *Aspergillus flavus*. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 56, n. 2, p. 71-74, jul./dez. 1996a.

PRADO, G.; GODOY, I. J.; OLIVEIRA, M. S.; JUNQUEIRA, R. G.; GAZZINELLI-MADEIRA, J. E. C. Efeito do ferro na biossíntese de aflatoxina B₁ por *Aspergillus flavus* IMI 190443 após inoculação em dois genótipos de amendoim. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 57, n. 1, p. 35-39, jan./jun. 1998.

PRADO, G.; GODOY, I. J.; OLIVEIRA, M. S.; MARTINS VIEIRA, M. B. C. Influência de ferro na biossíntese de aflatoxina B₁ pelo *Aspergillus flavus* NRRL 5940 em amendoim (*Arachis hypogaea* L.) variedades Tatu Vermelho e VRR-245. **Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 16, n.1, p. 22-25, jan./mar. 1996b.

PRADO, G.; MATTOS, S. V. M.; PEREIRA, E. C. Níveis de aflatoxinas em alguns alimentos consumidos em Belo Horizonte no período de 1983 a 1988. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 9, n. 2, p. 138-147, jul./dez. 1989.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S. Efeito do forno de microondas na destruição de aflatoxinas em amendoim. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 56, n. 2, p. 21-24, 1996.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; GAZZINELLI-MADEIRA, J. E. C.; GODOY, I. J.; CORRÊA, B.; JUNQUEIRA, R. G.; FERREIRA, S. O. Resistência de quatro genótipos de amendoim à produção de aflatoxina B1 após inoculação com *Aspergillus flavus* Link. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.19, n. 1, p. 84-87, jan./mar. 1999.

PRADO, G.; VIEIRA, M. B. C. M.; NICÁCIO, M. A. S.; GLÓRIA, M. B. A. Efeito da umidade relativa na contaminação microbiana e produção de aflatoxinas em amendoim em grão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 11, n. 2, p. 264-273, jul./dez. 1991.

PREGNOLATTO, W.; SABINO, M. Pesquisa de dosagem de aflatoxina em amendoim e derivados e em outros cereais. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 29/30, p. 65-71, 1969-1970.

PRIYADARSHINI, E.; TULPULE, P. G. Aflatoxin production on irradiated foods. **Food Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 293-295, 1976.

PRIYADARSHINI, E.; TULPULE, P. G. Effect of graded doses of γ -irradiation on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in wheat. **Food Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 505-507, 1979.

REDDY, M. J.; SHETTY, H. S. Role of seed lipids in *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 59, n. 2, p. 177-181, Feb. 1992.

REFAI, M. K.; AZIZ, N. H.; EL-FAR, F.; HASSAN, A. A. Detection of ochratoxin produced by *A. ochraceus* in feedstuffs and its control by γ radiation. **Applied Radiation and Isotopes**, New York, v. 47, n. 7, p. 617-621, 1996.

REFAI, M. K.; NIAZI, Z. M.; AZIZ, N. H.; KHAFAGA, N. E. M. Incidence of aflatoxin B₁ in the egyptian cured meat basterma and control by γ -irradiation. **Nahrung Food**, Cairo, v. 47, n. 6, p. 377-382, Dec. 2003.

RELA, P. R. Cresce uso de irradiação para conservação de alimentos. **Revista de Engenharia de Alimentos**, São Paulo, n. 29, p. 26-29, 2000.

RODRIGUES JORGE, M.; GARZÓN, E. S. Control mediante radiaciones gamma de flora fungica presente en alimentos de consumo humano y animal. **Alimentaria**, Madrid, v. 95, p. 115-117, 1993.

RODRIGUEZ, M.; RODRIGUEZ, A. Reduccion de la produccion de aflatoxinas en mani por radiaciones gamma. **Ciência y Técnica en la Agricultura Veterinária**, Havana, v. 5, n. 2, p. 103-110, 1983.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: The last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.33, n. 1, p.1-14, Jan./Mar. 2002.

RUSTOM, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, Oxford, v. 59, n. 1, p. 57-67, May 1997.

SABINO, M. Variações de níveis de aflatoxina B₁ em alimentos e rações animais no período de 1971 a 1979. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 40, n. 2 p. 153-158, jul./dez. 1980.

SABINO, M.; INOMATA, E. I.; LAMARDO, L. C. A. Variação dos níveis de aflatoxina B₁ em pasta de amendoim e paçoca consumidas no Estado de São Paulo. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 42, n. 1/2, p. 39-44, jun./dez. 1982.

SABINO, M.; MILANEZ, T.; LAMARDO, L. C. A.; INOMATA, E. I.; ZORZETTO, M. A. P.; NAVAS, S. A.; STOFER, M. Occurrence of aflatoxins in peanuts and peanut products consumed in the state of São Paulo/Brazil from 1995 to 1997. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 85-88, jan./mar. 1999.

SABINO, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Mycotoxin research in Brazil. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 45, n. 6, p. 359-371, Nov./Dec. 1993.

SABINO, M.; ZORZETO, M. A. P.; PEDROSO, M. O.; MILANEZ, T. V. Incidência de aflatoxinas em amendoim e produtos derivados consumidos na cidade de São Paulo, no período de 1980 a 1987. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 49, n. 1, p. 41-44, jan./jun. 1989.

SAMARAJEEWA, U.; SEN, A. C.; COHEN, M. D.; WEI, C. I. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 53, n. 6, p. 489-501, June 1990.

SANTOS, C. C. M.; LOPES, M. R. V.; KOSSEKI, S.Y. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José do Rio Preto/SP. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 153-157, jul./dez. 2001.

SANTOS, R. C. **Utilização de recursos genéticos e melhoramento de *Arachis hypogaea* L. no Nordeste Brasileiro**. 1999. Disponível em: <<http://www.cptsa.embrapa.br>>. Acesso em: 7 maio 2004.

SANTURIO, J. M. Experiência brasileira no uso de adsorventes para aflatoxinas. In: SCUSSEL, V. M. (Ed.). **Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos**. Florianópolis, 2000.

SARGEANT, K.; SHERIDAN, A.; OKELLY, J.; CARNAGHAN, R. B. A. Toxicity associated with samples of groundnuts. **Nature**, London, v. 192, n. 480, 1095-1097, 1961.

SCHIMDT, F. R.; ESSER, K. Aflatoxins: medical, economic impact, and prospects for control. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 20, n. 6, p. 164-174, Dec. 1985.

SCHINDLER, A. F.; ABADIE, A. N.; SIMPSON, R. E. Enhanced aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* after gamma irradiation of the spore inoculum. **Journal of Food Protection**, v. 43, n. 1, p. 7-9, Jan. 1980.

SCHINDLER, A. F.; PALMER, J. G.; EISENBERG, W. V. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* as related to various temperatures. **Applied Microbiology**, Washington, v. 15, n. 5, p. 1006-1009, 1967.

SCHROEDER, H. W.; HEIN, H. Aflatoxins: production of the toxins in vitro in relation to temperature. **Applied Microbiology**, Washington, v. 15, n. 2, p. 441-444, 1967.

SCOTT, P. M.; KANHERE, S. R.; LAWRENCE, G. A.; DALEY, E. F.; FARBER, J. M. Fermentation of wort containing added ochratoxin A and fumonisins B₁ and B₂. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 12, n. 1, p.31-40, Jan./Feb. 1995.

SCUSSEL, V. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Teores de aflatoxinas em amendoim e seus produtos comercializados em Campinas em 1980-1982.

Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 19, n. 1, p. 109-119, jan./mar. 1985.

SETLOW, R. B. Human cancer: etiologic agents/dose response/DNA repair/cellular and animal models. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 477, n. 1, p. 1-6, Mar. 2001.

SHAHIN, A. A. M.; AZIZ, N. H.; Influence of gamma rays and sodium chloride on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. **Microbios**, Cambridge, v. 90, n. 364/365, p.163-175, 1997.

SHARMA, A.; PADWAL-DESAI, S. R.; NAIR, P. M. Aflatoxin-producing ability of spores of *Aspergillus parasiticus* exposed to gamma radiation. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 1, p. 275-276, Jan./Feb. 1990.

SINHA, K. K.; SINHA, A. K. Effect of *Sitophilus oryzae* infestation on *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination in stored wheat. **Journal of Stored Products Research**, Elmsford, v. 27, n. 1, p. 65-68, Jan. 1991.

SUDAKIN, D. L. Dietary aflatoxin exposure and chemoprevention of cancer: a clinical review. **Journal of Toxicology - Clinical Toxicology**, New York, v. 41, n. 2, p. 195-204, 2003.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 175, n. 2, p. 149-163, June 1999.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 43, n. 3, p. 141-158, Sept. 1998.

SYLOS, C. M.; AMAYA-FARFAN, J. Aflatoxin destruction during heat processing of contaminated peanuts. A reevaluation. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 89-96, jul./dez. 1992.

TAHA, O. G. **Aflatoxinas em amendoim (*Arachis hypogaea* L.): Efeito da radiação microondas e da estocagem**. 2000. 73 p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

TAKAHASHI, H.; KAMIMURA, H.; ICHINOE, M. Distribution of aflatoxin-producing *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in sugarcane fields in the southernmost islands of Japan. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.67, n. 1, p. 90-95, Jan. 2004.

TANGO, J. S.; MENEZES, T. J. B.; TEIXEIRA, C. G. Levantamento da ocorrência de aflatoxina de sementes de amendoim nas safras das águas e da seca. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 1, p. 1-11, 1965.

TANIWAKI, M. H. Meios de cultura para contagem de fungos em alimentos. **Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 132-141, jul./dez. 1996.

TANIWAKI, M. H.; IAMANAKA, B. T.; BANHE, A. A. Comparison of culture media to recover fungi from flour and tropical pulps. **Journal of Food Mycology**, North Ryde, v. 2, n. 1, p. 291-302, 1992.

TEMCHAROEN, P.; THILLY, W. C. Removal of aflatoxin B₁ toxicity but not mutagenicity by 1 megarad gamma irradiation of peanut meal. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v. 4, n. 4, p. 199-205, 1982.

TSAI, W. Y. J.; SHAO, K. P.; BULLERMAN, L. B. Effects of sorbate and propionate on growth and aflatoxin production of sublethally injured *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 49, n. 1, p. 86-90, Jan./Feb. 1984.

UBOLDI EIROA, M. N. Micotoxinas e Micotoxicoses. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.16, n.4, p. 355-411, out./dez. 1979.

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**, Bueno Aires, v. 30, p. 191-198, 1995.

VAAMONDE, G.; PATRIARCA, A.; FERNANDEZ PINTO, V.; COMERIO, R.; DEGROSSI, C. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *flavi* from different substrates in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 88, n. 1, p. 79-84, Nov. 2003.

VASANTHI, S.; BHAT, R. V. Mycotoxins in food - Occurrence, health & economic significance & food control measures. **Indian Journal Medical Research**, v. 108, p. 212-224, Nov. 1998.

VIEIRA, O. J. **Efeitos da radiação gama em banana prata (*Musa sp.*, Grupo AAB) irradiada em diferentes graus de maturidade e armazenada em condição ambiente e em câmara fria.** 1995. 122 p. Tese. (Doutor em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura - Universidade de São Paulo, Piracicaba.

VILLAVICENCIO, A. L. C. H.; MANCINI-FILHO, J.; DELINCÉE, H.; BOGNÁR, A. Effect of gamma irradiation on the thiamine, riboflavin and vitamin B₆ content in two varieties of Brazilian beans. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 57, n. 3/6, p. 299-303, Mar. 2000.

VISCONTI, A.; SOLFRIZZO, M.; DOKO, M. B.; BOENKE, A.; PASCALE, M. Stability of fumonisins at different storage periods and temperatures in γ -irradiated maize. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n.8, p. 929-938, Nov./Dec. 1996.

WANG, J. S.; HUANG, T.; SU, J.; LIANG, F.; WEI, Z.; LIANG, Y.; LUO, H.; KUANG, S. Y.; QIAN, G. S.; SUN, G.; HE, X.; KENSLER, T. W.; GROOPMAN, J. D. Hepatocellular carcinoma and aflatoxin exposure in Zhuqing Village, Fusui County, People's Republic of China. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, Birmingham, v. 10, n. 2, p. 143-146, Feb. 2001.

WILD, C. P.; HALL, A. J. Primary prevention of hepatocellular in developing countries. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 462, p. 381-393, 2000.

WILD, C. P.; TURNER, P. C. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. **Mutagenesis**, v.17, n. 6, p. 471-481, 2002.

WORCMAN-BARNINKA, D.; LANDGRAF, M. Irradiação de carnes. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas. v. 37, n. 1, p. 22-27, jan./jun. 2003.

WORD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Mycotoxins**. Geneva: UNEP/WHO, 1979. 127 p. (Environmental Health Criteria 11).

YOUSSEF, B. M.; MAHROUS, S. R.; AZIZ, N. H. Effect of gamma irradiation on aflatoxin B₁ production by *Aspergillus flavus* in ground beef stored at 5⁰C. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v. 19, n. 4, p. 231-239, Dec. 1999.

YU, J.; BHATNAGAR, D.; EHRLICH, K. C. Aflatoxin biosynthesis. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 19, p. 191-200, 2002.

ZAICA, L. L.; BUCHANAN, R. L. Review of compounds affecting the biosynthesis or bioregulation of aflatoxins. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 50, n. 8, p. 691-708, Aug. 1987.

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DA IRRADIAÇÃO GAMA (^{60}Co) NA DESTRUIÇÃO DA AFLATOXINA B₁ EM AMENDOIM (*Arachis hypogaea* L.)

RESUMO

PRADO, G. Influência da irradiação gama (^{60}Co) na destruição da aflatoxina B_1 em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). In: **Influência da irradiação gama (^{60}Co) na microbiota fúngica e na aflatoxina B_1 em amendoim (*Arachis hypogaea* L.).** 2005. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Foi verificado o efeito da irradiação gama (^{60}Co) em doses que variaram de 0 a 30 kGy, em destruir a aflatoxina B_1 em amostras de amendoim cultivar Tatu Vermelho cultivadas em São Paulo, nas safras 2001/2002 e 2002/2003, artificialmente e naturalmente contaminadas em diferentes níveis. A aflatoxina B_1 foi extraída em mistura de metanol e KCl 4% (270 + 30, v/v), seguido de clarificação com CuSO_4 10% e partição com clorofórmio. A quantificação foi feita por cromatografia em camada delgada, medindo-se a área das fluorescências de amostras e padrões em densitômetro a 366 nm. Doses de irradiação gama (^{60}Co) de 1, 5 e 10 kGy reduziram em cerca de 20 % os níveis de aflatoxina B_1 em amostras artificialmente contaminadas com 55,3, 105,8 e 159,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Amostras naturalmente contaminadas com aflatoxina B_1 (84,0 e 258,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e tratadas com irradiação gama (^{60}Co) em doses de 5 e 10 kGy, não apresentaram redução do teor de aflatoxina B_1 . Entretanto, amostras naturalmente contaminadas com aflatoxina B_1 (86,0 e 248,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e irradiadas nas doses de 15, 20, 25 e 30 kGy apresentaram valores menores de aflatoxina B_1 , com faixa de redução que variou de 49 a 72%. Desta forma, pode-se concluir que a irradiação gama (^{60}Co) não é capaz de destruir totalmente a aflatoxina B_1 em condições naturais, mesmo em doses de até 30 kGy.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA

ABSTRACT

PRADO, Guilherme. Effect of gamma-irradiation on destruction of aflatoxin B₁ in peanut (*Arachis hypogaea* L.). In: **Gamma radiation (⁶⁰Co) influence on mycoflora and on aflatoxin B₁ in peanut (*Arachis hypogaea* L.)**. 2005. Thesis (Doctorate in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

The effect of gamma-irradiation was verified in doses, which ranged from 0 to 30 kGy, in order to destroy aflatoxin B₁ in peanuts samples, Tatu Vermelho cultivar, cultivated in São Paulo state, 2001/2002 and 2002/2003 crops, artificially and naturally contaminated, in different levels. Aflatoxin B₁ was extracted with methanol:4% potassium chloride (270 + 30, v/v), followed by clarification with 10% cupric sulfate and partition with chloroform. The quantification was done by thin layer chromatography, measuring the samples fluorescence areas and standards in densitometer (366 nm). Gamma-irradiation (⁶⁰Co) doses of 1, 5 and 10 kGy reduced the levels of aflatoxin B₁ around 20% in samples artificially contaminated with 55.3, 105.8 and 159.3 µg kg⁻¹. Naturally contaminated samples with levels of 84.0 µg kg⁻¹ and 258.3 µg kg⁻¹ of aflatoxin B₁ and treated with gamma-irradiation (⁶⁰Co) in 5 and 10 kGy doses, did not show reduction of aflatoxin B₁ level. However, samples naturally contaminated with aflatoxin B₁ (86.0 and 248.0 µg kg⁻¹) and irradiated in 15, 20, 25 and 30 kGy doses, showed lower values of aflatoxin B₁, ranged from 49 to 72%. This way, it can be concluded that gamma-irradiation (⁶⁰Co) is not capable of totally destroying aflatoxin B₁ in natural conditions, even in 30 kGy dose.

Adviser: Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA

1 INTRODUÇÃO

As micotoxinas podem ser definidas como produtos naturais, de baixo peso molecular, produzidos no final da fase log de crescimento de fungos filamentosos (metabolismo secundário), provocando resposta tóxica em vertebrados superiores e outros animais quando ingeridas em baixas concentrações. Esses compostos não têm significado bioquímico e não fazem parte do crescimento e desenvolvimento dos fungos produtores. São geralmente produzidos no micélio do fungo filamentoso, mas podem acumular em estruturas especializadas, tais como conídios ou esclerócios, e em torno do ambiente do organismo (Moss, 1996; Pitt, 2000).

As aflatoxinas são produtos do metabolismo secundário do *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*, que contaminam as culturas no campo durante o armazenamento e também os produtos alimentícios, apresentando atividade carcinogênica, teratogênica e mutagênica para os seres humanos e animais (CAST, 2003).

As aflatoxinas são um grupo de pelo menos 16 derivados bisfuranoisocumarínicos, sendo as 4 principais naturalmente produzidas as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. A aflatoxina B₁, entre todas, é usualmente a toxina de maior ocorrência e concentração nos alimentos (Sweeney & Dobson, 1999).

A contaminação de alimentos com aflatoxinas é mais freqüente em regiões tropicais e semitropicais, como o Brasil, onde o clima favorece o desenvolvimento de fungos toxigênicos, principalmente em amendoim (Bhat, 1988; Rodriguez-Amaya & Sabino, 2002).

No Brasil, está em vigor a Resolução n.º 274, de 15 de outubro de 2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que estabelece o limite de 20 µg kg⁻¹ para a soma das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, em milho e amendoim, e a

Portaria nº 183, de 21 de março de 1996, do Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, que estabelece o mesmo valor (Brasil, 1996; Brasil, 2002).

O processo de irradiação consiste na exposição de alimentos a uma fonte de radiação ionizante, minuciosamente controlada, por tempo pré-fixado. Radiações ionizantes são partículas ou fótons que possuem energia suficiente para produzir partículas eletricamente carregadas (íons) nos materiais com os quais entram em contato. Os irradiadores gama comerciais utilizam, em sua maioria, fontes de ^{60}Co . Esta escolha está baseada na insolubilidade do ^{60}Co em água e no fato de este fornecer a mesma dose em tempo 7 vezes menor (Hernandes et al., 2003; Verruma-Bernardi & Spoto, 2003).

A radiação ionizante pode agir diretamente sobre os componentes essenciais da célula ou indiretamente, proporcionando a formação de produtos radiolíticos, particularmente os radicais livres formados a partir da água (Worcman-Barninka & Landgraf, 2003)

Os produtos radiolíticos são quimicamente iguais aos produzidos nos processos de tratamentos térmicos e não apresentam nenhum efeito nocivo à saúde. Além disso, a irradiação não afeta os macronutrientes como proteínas, carboidratos e gorduras. Apenas vitamina C e B1 (Tiamina) são sensíveis à irradiação, assim como ao tratamento térmico (GCIIA, 1990; GCIIA, 1999).

Em 1981, a preservação de alimentos pelo tratamento com a irradiação foi aprovada pelo Comitê Misto da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO/WHO) e a Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA). Em 1984, foi criado o Grupo Consultivo Internacional sobre Irradiação de alimentos (GCIIA) pela WHO, juntamente com a FAO e a IAEA, para acompanhar a evolução dessa tecnologia. O Brasil, junto com mais 44 países, faz parte desse grupo (Del Mastro, 1999; Giroux & Lacroix, 1998).

O emprego da irradiação de alimentos no Brasil mostra-se muito promissor e de suma importância através de sua contribuição na conservação, reduzindo as perdas de pós-colheita, e pela possibilidade de melhorar a oferta de alimentos (Lima et al., 2001).

No Brasil está em vigor a Resolução RDC N.º 21, de 26 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (Brasil, 2001). Não há mais restrições em relação às doses a serem aplicadas. Qualquer alimento pode ser irradiado, desde que sejam observadas as seguintes condições: (1) a dose mínima absorvida deve ser suficiente para alcançar a finalidade desejada; (2) a dose máxima deve ser inferior àquela que comprometeria as propriedades funcionais do alimento.

O objetivo do trabalho foi verificar a eficiência da irradiação gama (^{60}Co) em destruir a aflatoxina B₁ em amostras de amendoim artificialmente e naturalmente contaminadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Para os ensaios de validação de metodologia e efeito da irradiação gama em amostras artificialmente e naturalmente contaminadas, as amostras foram constituídas de grãos de amendoim beneficiado, cultivar Tatu Vermelho, safra 2001/2002 e safra 2002/2003, provenientes da Indústria de Alimentos Santa Helena (Ribeirão Preto - São Paulo). As amostras foram coletadas e preparadas segundo o fluxograma padrão da Unidade de Beneficiamento, apresentado a seguir na figura 1.

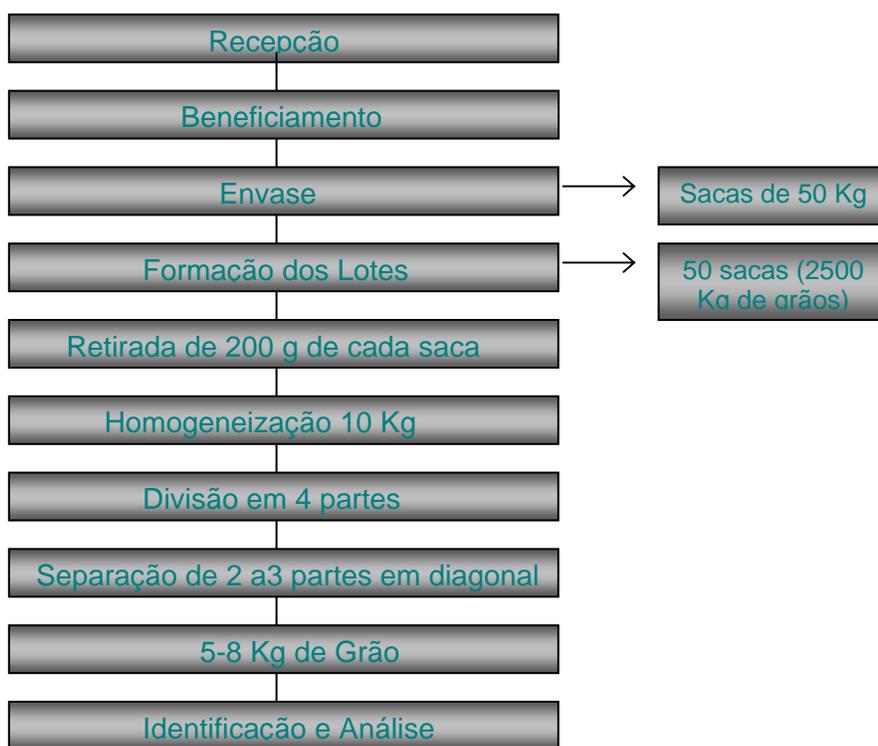


FIGURA 1. Fluxograma de amostragem de amendoim *in natura*.

As seis amostras encaminhadas apresentavam os seguintes níveis de aflatoxinas:

A. Safra 2001/2002

1. Aflatoxinas: Não Detectadas (ND)

2. Aflatoxinas: Não Detectadas (ND)

3. Aflatoxina B₁: 84,0 µg kg⁻¹

4. Aflatoxina B₁: 258,3 µg kg⁻¹

B. Safra 2002/2003

5. Aflatoxina B₁: 248,0 µg kg⁻¹

6. Aflatoxina B₁: 86,0 µg kg⁻¹

A quantificação das aflatoxinas foi efetuada na Indústria de Alimentos Santa Helena e confirmada na Fundação Ezequiel Dias (Laboratório de Micologia e Micotoxinas).

2.2 Preparo das amostras

O preparo das amostras foi efetuado de acordo com a finalidade de cada ensaio e descrito a seguir:

2.2.1 Validação do método de quantificação de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

A amostra 1 (Aflatoxinas: ND) foi previamente moída, homogeneizada e passada em tamiz 20 mesh. Após quarteamento, foi acondicionada em frascos plásticos e guardada sob refrigeração (4⁰C) até o momento da fortificação com soluções padrões de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (item 2.3).

2.2.2 Verificação da eficiência da irradiação gama (⁶⁰Co) em destruir a aflatoxina B₁ em amostras artificialmente contaminadas

A amostra 2 (Aflatoxina B₁: ND) foi espalhada e dividida em 3 bandejas de alumínio, com cerca de 2,0 kg em cada uma delas. Posteriormente, realizou-

se a contaminação com solução padrão de aflatoxina B₁ (item 2.3) para obter concentrações de 50, 100 e 150 µg kg⁻¹ de aflatoxina B₁, respectivamente. As amostras permaneceram à temperatura ambiente durante a noite para evaporação do solvente. Em seguida foram moídas, homogeneizadas e passadas em tamiz 20 mesh. Após quarteamento, as amostras foram pesadas em sacos plásticos (200 g) e guardadas sob refrigeração (4°C) até o momento de serem irradiadas. Anteriormente ao processo de irradiação, foram determinados em triplicata os níveis de aflatoxina B₁ das três amostras fortificadas.

2.2.3 Verificação da eficiência da irradiação gama em destruir a aflatoxina B₁ em amostras naturalmente contaminadas

As outras amostras (3, 4, 5 e 6), naturalmente contaminadas com aflatoxina B₁, foram moídas, homogeneizadas e passadas em tamiz 20 mesh. Após quarteamento, as amostras foram distribuídas em sacos plásticos contendo cerca de 200 g. Em seguida o material foi acondicionado sob refrigeração (4°C) até o momento de ser irradiado.

2.3 Soluções padrão de aflatoxinas

Soluções padrão estoque de aflatoxina B₁ (10,92 µg mL⁻¹), aflatoxina B₂ (10,02 µg mL⁻¹), aflatoxina G₁ (12,17 µg mL⁻¹), e aflatoxina G₂ (8,36 µg mL⁻¹) foram preparadas, dissolvendo o padrão sólido (Sigma, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) em benzeno:acetonitrila (98:2, v/v). A concentração exata foi medida em espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC, Shimadzu Scientific Instrument, Japan, utilizando cubetas de quartzo de 1,0 cm. Para a fortificação das amostras de amendoim foram utilizadas essas soluções, as quais foram diluídas 1:10 em benzeno:acetonitrila (98:2, v/v) quando a fortificação a ser efetuada era inferior a 10 µg kg⁻¹. Para a quantificação das aflatoxinas, em cromatografia em camada delgada, foram utilizadas as concentrações aflatoxina

B₁ (0,88 µg mL⁻¹), aflatoxina B₂ (1,00 µg mL⁻¹), aflatoxina G₁ (1,22 µg mL⁻¹) e aflatoxina G₂ (0,84 µg mL⁻¹), preparadas a partir da diluição das soluções estoque em benzeno:acetonitrila (98:2, v/v) de acordo com a AOAC (1997).

2.4 Metodologia de fortificação com soluções padrão de aflatoxinas

A amostra preparada no item 2.2.1 foi artificialmente contaminada pela adição de quantidades definidas das soluções padrão de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (item 2.3), utilizando micropipeta automática. Foram realizadas contaminações artificiais em 9 concentrações para cada toxina, com 5 repetições cada. A solução de contaminação foi distribuída uniformemente sobre a massa de amostra de amendoim, tomando-se o cuidado de não atingir as paredes de vidro dos frascos Erlenmeyer. As amostras permaneceram na capela durante a noite para evaporação total do solvente. Em alguns casos, nitrogênio comum foi utilizado para acelerar o processo.

2.5 Metodologia de irradiação

O processo de irradiação foi conduzido e executado na Empresa Brasileira de Radiações Ltda - EMBRARAD (São Paulo). A taxa de dose foi por volta de 4,0 kGy h⁻¹, tendo o irradiador uma fonte de ⁶⁰Co com tecnologia da Nordion Canadian (Anexos, figuras 2, 3 e 4, páginas 183 e 184).

2.5.1 Em amostras artificialmente contaminadas

A amostra preparada no item 2.2.2 foi irradiada com irradiação gama (⁶⁰Co) nos níveis de 0,0, 1,0, 5,0 e 10,0 kGy, em triplicata. Posteriormente, a quantificação da aflatoxina B₁ nas três concentrações de contaminação, foi executada em triplicata, obtendo-se então nove resultados para cada nível de irradiação e concentração de aflatoxina B₁.

2.5.2 Em amostras naturalmente contaminadas

As amostras preparadas no item 2.2.3 seguiram o seguinte esquema de irradiação gama:

Amostra 3 ($84,0 \mu\text{g kg}^{-1}$): Controle (sem irradiação) e irradiada com 5,0 e 10,0 kGy. A irradiação em cada um dos níveis estudados foi efetuada em uma única amostra. As análises de quantificação de aflatoxina B₁ foram realizadas em triplicata;

Amostra 4 ($258,3 \mu\text{g kg}^{-1}$): Controle (sem irradiação) e irradiada com 1,0, 5,0 e 10,0 kGy. A irradiação em cada um dos níveis estudados foi efetuada em triplicata e as análises de aflatoxina B₁ também;

Amostra 5 ($248,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) e Amostra 6 ($86,0 \mu\text{g kg}^{-1}$): Controle (sem irradiação) e irradiadas com 15, 20, 25 e 30 kGy. A irradiação em cada um dos níveis estudados foi efetuada em uma única amostra. As análises de quantificação de aflatoxina B₁ foram realizadas em triplicata.

2.6 Quantificação de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂

O método empregado foi o descrito por Valente Soares e Rodriguez-Amaya (1989). As aflatoxinas foram separadas e identificadas por cromatografia em camada delgada (CCD), em placas de sílica gel 60G, 20 x 20 cm (Merck), sem indicador fluorescente, espessura de 0,25 mm, utilizando-se como fase móvel tolueno:acetato de etila:clorofórmio:ácido fórmico (70:50:50:20, v/v/v/v), recomendado por Gimeno (1979). Os extratos das amostras para CCD foram ressuspendidos em benzeno:acetonitrila (98:2), em volumes que variavam de 100 a 300 μL . Para aplicação na placa de cromatografia de camada delgada foram utilizados volumes que variaram de 2 a 10 μL . Para a elaboração das curvas de calibração foram utilizados volumes das soluções padrões (item 2.3) na faixa de 2 a 10 μL , sempre com um mínimo de 4 pontos. A quantificação das aflatoxinas foi feita por medidas das intensidades das fluorescências dos spots

das amostras e de padrões, em Densitômetro Shimadzu, modelo CS9301PC, com lâmpada de xenônio, em leitura linear, com feixe 0,4 x 5,0 mm e alta sensibilidade de fluorescência. Os níveis de aflatoxinas nas amostras foram calculados a partir do cálculo das áreas dos picos das aflatoxinas referentes aos extratos das amostras e das soluções padrão de aflatoxinas (vide Anexos, figuras 7 e 8, página.186).

2.7 Delineamento experimental e análise estatística

O modelo estatístico foi dado em função do delineamento inteiramente casualizado, cujo método consiste em realizar análise de variância para identificar diferenças dos tratamentos (Sampaio, 1998). No experimento descrito no item 2.5.1 (pág.96), o esquema fatorial foi 4 doses de irradiação gama (0, 1, 5 e 10 kGy e 3 concentrações de aflatoxina B₁, totalizando 12 tratamentos. Analogamente, no experimento descrito no item 2.5.2 (pág. 97) foi utilizado o esquema fatorial somente nas amostras 5 e 6, constituindo 5 doses de irradiação gama (0, 15, 20, 25 e 30 kGy) e duas concentrações de aflatoxina B₁, totalizando 10 tratamentos. Em todos os experimentos efetuados os resultados foram avaliados pelo Teste F para constatar a presença de efeitos significativos ($p < 0,05$). Nestes casos foi aplicado o teste de Tukey para determinar as diferenças entre as médias e/ou a técnica de regressão. Foram utilizados os recursos do software estatístico SAS (SAS, 1996) e SISVAR (Ferreira, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Validação da metodologia

Para a obtenção de resultados analíticos confiáveis está na validação do método analítico escolhido. É importante salientar, que mesmo que um determinado método já tenha sido objeto de estudo colaborativo, é necessário que seja validado intralaboratorialmente (Valente Soares, 2001).

Os níveis de contaminação das aflatoxinas empregados e encontrados, a partir da amostra 1 (itens 2.2.1 e 2.4), bem como os valores de recuperação (Exatidão) e coeficientes de variação (Precisão), estão apresentados, a seguir, nas tabelas 1 a 4.

TABELA 1. Valores de recuperação e coeficiente de variação para **aflatoxina B₁** adicionada em amendoim e quantificada por cromatografia em camada delgada (Densitometria).

Teor de aflatoxina B ₁ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Valor Encontrado ¹	Recuperação (%)	Coefficiente de Variação
218,0	218,0	100,0	4,6
109,0	94,0	86,0	7,8
44,0	52,0	118,2	22,0
22,0	26,0	118,3	13,4
11,0	7,9	72,0	10,3
4,3	3,6	83,7	7,7
1,1	1,11	102,4	16,3
0,9	Presença	–	–
0,7	ND	–	–

¹ Média de 5 repetições. ND = Não Detectado. Limite de Detecção: 0,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$

TABELA 2. Valores de recuperação e coeficiente de variação para **aflatoxina B₂** adicionada em amendoim e quantificada por cromatografia em camada delgada (Densitometria).

Teor de aflatoxina B₂ (µg kg⁻¹)	Valor Encontrado¹ (µg kg⁻¹)	Recuperação (%)	Coeficiente de Varição (%)
200,0	184,0	92,0	10,1
100,0	116,0	116,0	5,1
40,0	34,0	85,0	19,6
20,0	17,4	87,0	16,5
10,0	9,7	97,0	16,6
4,0	3,6	90,0	7,7
1,0	1,1	108,0	10,7
0,8	Presença	–	–
0,6	ND	–	–

¹ Média de 5 repetições. ND = Não Detectado. Limite de Detecção: 0,8 µg kg⁻¹

TABELA 3. Valores de recuperação e coeficiente de variação para **aflatoxina G₁** adicionada em amendoim e quantificada por cromatografia em camada delgada (Densitometria).

Teor de aflatoxina G₁ (µg kg⁻¹)	Valor Encontrado¹ (µg kg⁻¹)	Recuperação (%)	Coeficiente de Varição (%)
243,0	244,0	100,4	4,4
122,0	115,0	94,0	27,4
49,0	57,0	116,0	16,5
24,0	27,2	113,5	10,5
12,2	10,6	86,9	16,5
4,9	5,2	106,1	19,0
1,2	1,0	82,0	10,7
1,0	Presença	–	–
0,8	ND	–	–

¹ Média de 5 repetições. ND = Não Detectado. Limite de Detecção: 1,0 µg kg⁻¹

TABELA 4. Valores de recuperação e coeficiente de variação para **aflatoxina G₂** adicionada em amendoim e quantificada por cromatografia em camada delgada (Densitometria).

Teor de aflatoxina G₂ (µg kg⁻¹)	Valor Encontrado¹ (µg kg⁻¹)	Recuperação (%)	Coeficiente de Varição (%)
167,0	140,0	84,0	2,5
84,0	87,0	103,6	24,2
34,0	28,0	82,3	18,4
17,0	17,0	100,0	20,6
8,3	9,0	108,4	18,2
3,5	3,8	108,5	2,2
0,8	0,7	87,9	15,3
0,7	Presença	–	–
0,5	ND	–	–

¹ Média de 5 repetições. ND = Não Detectado. Limite de Detecção: 0,7 µg kg⁻¹

Em função dos níveis de contaminação, os valores de recuperação das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ variaram de 72,0 a 118,3%, 85 a 116%, 82% a 116,0 e 82,3 a 108,5%, respectivamente. Os valores de coeficientes de variação ficaram para aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ entre 4,6 a 22%, 5,1 a 19,6%, 4,4 a 27,4% e 2,2 a 24,2%, respectivamente. Valores de recuperação entre 70 e 120% e coeficientes de variação menores que 30% são geralmente aceitáveis para análises de micotoxinas. (Horwitz e Albert, 1982; Commission Regulation, 1998).

Os valores médios de recuperação e coeficientes de variação, para aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, foram 97,2%, 96,4%, 99,8%, 96,4% e 11,7%, 12,3%, 15,0%, 14,5%, respectivamente.

Boa linearidade ($R^2 > 0,99$) foi obtida entre fluorescência emitida e concentração de todas as aflatoxinas pesquisadas. A regressão linear para a aflatoxina B₁, na faixa de 0,88 a 8,8 ng, foi $Y=2553x - 776,91$, em que $R^2=0,99297$.

Considerando que o limite de quantificação representa a menor concentração do analito que pode ser determinado com segurança, ou seja, com precisão e exatidão aceitáveis (recuperação >70% e coeficiente de variação < 30%), os limites de quantificação para aflatoxinas B₁ e B₂ foram 1,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Para aflatoxinas G₁ e G₂, obteve-se 1,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 0,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Por sua vez, o limite de detecção representa a menor concentração do analito que o método distingue, com segurança, como sendo a resposta. Dessa forma, os limites de detecção para as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ foram 0,90 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 0,80 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 1,00 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 0,70 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

Em função dos resultados encontrados para as 4 aflatoxinas, pode-se afirmar que o método em avaliação pode ser considerado seletivo, ou seja, fornece várias respostas para vários analitos e é capaz de distinguir a resposta de interesse.

Finalmente, pode-se inferir que a metodologia de análise de aflatoxina B₁ utilizada nesta pesquisa apresentou uma eficiência analítica dentro das normas recomendadas, sendo, pois recomendado para a quantificação de aflatoxina B₁ em amendoim.

3.2 Destruição da aflatoxina B₁ em amostras artificialmente contaminadas e irradiadas

As concentrações obtidas de aflatoxina B₁ em amendoim artificialmente contaminado, a partir da fortificação da amostra 2 (item 2.2.2), foram 55,3, 105,8 e 159,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Após irradiação com ⁶⁰Co a 1,0, 5,0 e 10,0 kGy (item

2.5.1), os teores encontrados de aflatoxina B₁ e o resumo da análise de variância estão apresentados nas tabelas 5 e 6.

TABELA 5. Teores de aflatoxina B₁ em amendoim *in natura*, artificialmente contaminado em três concentrações, após irradiação, em triplicata com ⁶⁰Co a 0, 1, 5 e 10 kGy.

Dose de irradiação (kGy)	Aflatoxina B ₁ (µg kg ⁻¹)		
0	55,3*	105,8*	159,3*
1	43,4**	91,4**	135,4**
5	39,6**	85,0**	132,6**
10	39,0**	82,1**	131,2**

*Médias de triplicata.

**Médias de triplicata em cada nível de irradiação da quantificação de aflatoxina B₁.

TABELA 6. Análise de variância das respostas de contaminação em 3 concentrações de aflatoxina B₁ e 4 doses de irradiação gama (⁶⁰Co).

Fonte de variação	G.L.	Q.M.	p-valor
Concentração	2	27233,7608	0,0000
Dose	3	971,5996	0,0000
Concentração*Dose	6	29,8403	0,8700
Erro	24	74,1427	
Total	35		

Coefficiente de variação: 9,4%

Fixando o nível de significância em 5% (teste F), os resultados encontrados indicam que apenas os efeitos principais, doses ($p= 0,0000$) e concentração ($p= 0,000$), foram significativos, isto é, pelo menos uma das médias apresenta diferença significativa quando comparada com as demais. Convém salientar que a interação dose*concentração não foi significativa ($p= 0,8700$), o que leva a crer na ausência da dependência entre as concentrações de aflatoxina B₁ com as doses empregadas de irradiação gama.

Dessa forma, como não ficou comprovada a interação entre os fatores, efetuou-se o teste de Tukey, em nível de significância de 5% para os efeitos principais: dose de irradiação gama e concentração de contaminação de aflatoxina B₁ (Tabela 7).

TABELA 7. Efeitos médios de doses de irradiação gama (a) e de concentrações de contaminação de aflatoxina B₁ (b) na redução do nível de aflatoxina B₁. Teste de Tukey em nível de significância de 5%.

Doses de irradiação gama (kGy)	Médias de aflatoxina B ₁ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentrações de contaminação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Médias de aflatoxina B ₁ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
10	84,1 b	55,3	44,3 c
5	85,7 b	105,8	91,0 b
1	90,0 b	159,3	139,6 a
0	106,8 a		

Os resultados foram considerados para cada fator, independentemente do outro. Comparando as doses de irradiação, pode-se verificar que apenas a dose inicial (0 kGy) difere significativamente das demais (letra minúscula diferente),

ao passo que, doses de 1, 5 e 10 kGy apresentaram comportamento similar (letra minúscula igual). Em relação às concentrações de contaminação, as mesmas apresentaram médias diferenciadas (letras minúsculas diferentes). Pode-se observar que o aumento da dose de irradiação, nas três concentrações de contaminação, provocou aumento na redução do teor de aflatoxina B₁. Entretanto, mesmo a dose de irradiação a 10 kGy não foi capaz de eliminar totalmente a aflatoxina B₁.

3.3 Destruição da aflatoxina B₁ em amostras naturalmente contaminadas e irradiadas

Os resultados do efeito da irradiação gama (⁶⁰Co) na destruição da aflatoxina B₁, em amostras naturalmente contaminadas, 84,0 e 258,3 µg kg⁻¹, amostras 3 e 4, respectivamente (item 2.5.2) e os resumos das respectivas análises de variâncias dos dados referentes aos efeitos dos tratamentos efetuados são apresentados nas tabelas 8, 9, 10 e 11.

TABELA 8. Teores de aflatoxina B₁ em amendoim naturalmente contaminado com 84,0 µg kg⁻¹ (Amostra 3), após irradiação com ⁶⁰Co a 0; 5 e 10 kGy e análise em triplicata.

Dose de Irradiação (kGy)	Aflatoxina B ₁ (µg kg ⁻¹)	Média (µg kg ⁻¹)	Coefficiente de Variação (%)
0	69,0	84,0	29,5
	71,0		
	113,0		
5	98,0	90,3	8,3
	90,0		
	83,0		
10	75,0	82,7	9,1
	83,0		
	90,0		

TABELA 9. Análise de variância para verificar o efeito da dose de irradiação gama (⁶⁰Co) na destruição de aflatoxina B₁ em amostra naturalmente contaminada (84,0 µg kg⁻¹).

Fonte de variação	G.L.	Q.M.	p-valor
Dose	2	49	0,824
Erro	6	243	
Total	8		

Coefficiente de variação: 18,2%

TABELA 10. Teores de aflatoxina B₁ em amendoim naturalmente contaminado com 258,3 µg kg⁻¹, (Amostra 4), após irradiação, em triplicata, com ⁶⁰Co a 0; 1; 5 e 10 kGy.

Dose de Irradiação (kGy)	Repetições	Aflatoxina B ₁ (µg kg ⁻¹)*	Média Aflatoxina B ₁ (µg kg ⁻¹)	Coefficiente de Variação (%)
0	A	238,7	258,3	7,2
	B	259,0		
	C	277,3		
1	A	245,0	253,0	6,1
	B	265,7		
	C	249,0		
5	A	277,0	266,0	7,4
	B	274,7		
	C	247,0		
10	A	251,3	251,0	5,7
	B	245,3		
	C	258,3		

* Médias de três determinações

TABELA 11. Análise de variância para verificar o efeito da dose de irradiação gama (⁶⁰Co) na destruição de aflatoxina B₁ em amostra naturalmente contaminada (258,3 µg kg⁻¹).

Fonte de variação	G.L.	Q.M.	p-valor
Dose	3	384	0,392
Erro	32	373	
Total	35		

Coefficiente de variação: 7,5%

Observou-se que nas doses de 1, 5, e 10 kGy (tabelas 8 e 10) praticamente não ocorreu destruição da aflatoxina B₁ em amostras naturalmente contaminadas, diferentemente das amostras artificialmente contaminadas, que apresentaram redução de cerca de 20% (tabela 5). Esta diferença pode ser explicada pelo fato de a aflatoxina B₁, na amostra *in natura*, estar ligada a componentes naturais como as proteínas, conferindo proteção aos efeitos da irradiação gama. Da mesma forma, as interações dos radicais livres e moléculas ativas, produzidas durante o processo de irradiação, com a aflatoxina B₁ livre, como no caso das amostras fortificadas, devem acontecer de forma mais fácil e efetiva (Samarajeewa et al., 1990).

A análise de variância mostrada na tabela 9 evidencia estatisticamente que as doses de irradiação gama (5 e 10 kGy – tabela 8) utilizadas para destruição da toxina na amostra avaliada, apresentaram o mesmo comportamento em relação à amostra não irradiada (0 kGy). Este fato foi constatado em virtude de a probabilidade do teste F ($p= 0,824$) ser superior a probabilidade 0,05, isto é, nível de significância. Da mesma forma, a análise de variância registrada na tabela 11 mostra que não há diferença significativa entre as doses de irradiação gama utilizadas (1; 5 e 10 kGy – tabela 10) na destruição da aflatoxina B₁. Este fato foi observado em função de a probabilidade do teste F ($p= 0,392$) ser superior à probabilidade 0,05, isto é, nível de significância.

Os resultados do efeito da irradiação gama (⁶⁰Co) em doses de 0, 15, 20, 25 e 30 kGy na destruição da aflatoxina B₁, em amostras naturalmente contaminadas, 248,0 e 86,0 µg kg⁻¹, amostras 5 e 6, respectivamente (item 2.5.2), as análises de variância e os modelos quadráticos são mostrados nas tabelas 12, 13, 14, 15, 16 e 17 e figuras 2, 3 e 4.

TABELA 12. Teores de aflatoxina B₁ em amendoim naturalmente contaminado com 248 µg kg⁻¹ (Amostra 5), após irradiação com ⁶⁰Co a 0, 15, 20, 25 e 30 kGy.

Dose (kGy)	Repetições	Aflatoxina B ₁ (µg kg ⁻¹)	Média (µg kg ⁻¹)*	Coefficiente de Variação (%)
0	A	268	248a	8,3
	B	227		
	C	249		
15	A	84	75b	12,1
	B	68		
	C	71		
20	A	84	69b	19,3
	B	58		
	C	66		
25	A	70	69b	3,6
	B	72		
	C	67		
30	A	67	78b	18,2
	B	94		
	C	73		

*Médias com a mesma letra na vertical, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, em 5% de probabilidade.

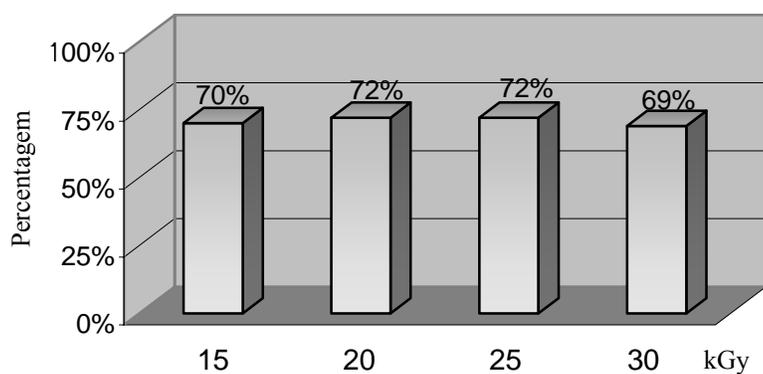


FIGURA 2. Percentagem média de redução de aflatoxina B₁ - 248 µg kg⁻¹ - em função da dose de irradiação.

TABELA 13. Teores de aflatoxina B₁ em amendoim naturalmente contaminado com 86 µg kg⁻¹ (Amostra 6), após irradiação com ⁶⁰Co a 0, 15, 20, 25 e 30 kGy.

Dose (kGy)	Repetições	Aflatoxina B ₁ (µg kg ⁻¹)	Média (µg kg ⁻¹)*	Coefficiente de Variação (%)
0	A	94	86a	
	B	96		
	C	69		
15	A	42	44b	9,1
	B	52		
	C	39		
20	A	38	35b	5,2
	B	35		
	C	32		
25	A	29	29b	3,9
	B	29		
	C	31		
30	A	30	33b	13,2
	B	31		
	C	38		

*Médias com a mesma letra na vertical, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, em 5% de probabilidade.

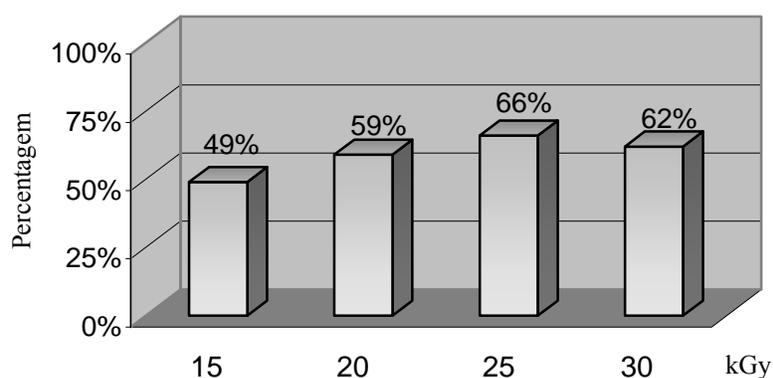


FIGURA 3. Percentagem média de redução de aflatoxina B₁ - 86 µg kg⁻¹ - em função da dose de irradiação.

TABELA 14. Análise de variância das concentrações de aflatoxina B₁ em função dos tratamentos de irradiação gama (⁶⁰Co): 0, 15, 20, 25 e 30 kGy.

Fonte de variação	G.L.	Q.M.	p-valor
Dose	4	15401,8833	0,0000
Concentração	1	29016,3000	0,0000
Dose*Concentração	4	4685,8833	0,0000
Erro	20	118,0000	
Total	29		

Coeficiente de variação: 14,1%.

Fixando o nível de significância em 5%, os resultados encontrados na tabela 14 indicam que os efeitos principais, doses (p= 0,0000) e concentrações de contaminação (p= 0,0000) foram significativos, isto é, pelo menos uma das médias apresenta diferença significativa quando comparada com as demais. No caso da interação dose*concentração, esta se mostrou significativa (p= 0,0000). Assim sendo, pode-se afirmar que as doses de irradiação apresentaram-se dependentes da concentração de aflatoxina B₁. Portanto, para melhor investigação tornou-se necessário a realização do desdobramento das dosagens de irradiação dentro de cada concentração de aflatoxina B₁ (tabela 15).

TABELA 15. Análise de variância das doses de irradiação fixando as concentrações de aflatoxina B₁.

Fonte de variação	G.L.	Q.M.	Pr>F
Dose /86	4	1639,3333	0,0000
Dose /248	4	18448,4333	0,0000
Resíduo	20	118,0000	

Considerando o nível de significância em 5%, os resultados encontrados evidenciam que para cada concentração de aflatoxina B₁ as doses de irradiação apresentaram comportamento diferenciado. Para uma melhor investigação foram elaborados os modelos quadráticos (figura 4).

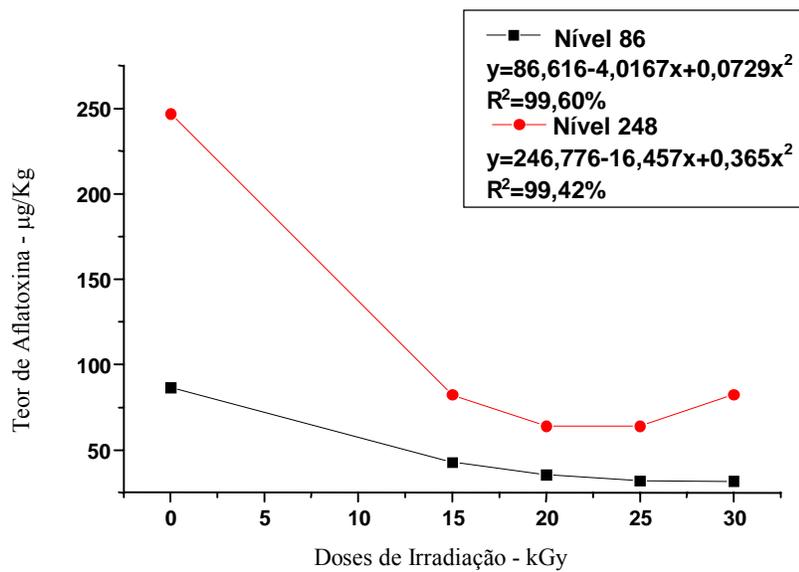


FIGURA 4. Modelos quadráticos para as doses de irradiação na concentração alta e baixa de aflatoxina.

Conforme se pode observar, os modelos ajustados estão adequados aos dados experimentais. Este fato foi comprovado mediante o alto valor do R^2 verificado em ambas as concentrações de contaminação, ou seja, próximo a 100%. Observou-se nos modelos acima, que a maior concentração de aflatoxina B_1 ocasionou resposta maior após irradiação da amostra. Notou-se também, que à medida que as doses de irradiação gama aumentavam, houve redução na resposta de teor de aflatoxina B_1 . Esta redução foi mais acentuada para a maior concentração de aflatoxina B_1 . Verificou-se também que doses superiores a 15 kGy apresentaram baixas variações em relação ao teor de aflatoxina B_1 . Para uma melhor investigação efetuou-se o teste de Tukey para cada uma das concentrações de aflatoxina B_1 , sendo as médias comparadas em função das doses de irradiação gama (tabelas 16 e 17).

TABELA 16. Análise de variância para verificar o efeito da dose de irradiação gama (^{60}Co), 0, 15, 20, 25 e 30 kGy, na destruição de aflatoxina B₁ em amostra naturalmente contaminada (248,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	QM
Total	14	250078	
Grupos	4	248322	
Erro	10	1756	175,6

Diferença Mínima Significativa: 35,4

TABELA 17. Análise de variância para verificar o efeito da dose de irradiação gama (^{60}Co), 0, 15, 20, 25 e 30 kGy, na destruição de aflatoxina B₁ em amostra naturalmente contaminada (86,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	QM
Total	14	38443	
Grupos	4	37839	
Erro	10	604	60,4

Diferença Mínima Significativa: 20,9

A aplicação de doses maiores de irradiação gama (15, 20, 25 e 30 kGy), em amostras naturalmente contaminadas, com 5-6% de umidade, conferiu redução de aflatoxina B₁ na faixa de 49 a 72% (figuras 2 e 3). Esses resultados estão em desacordo com os obtidos por Aziz & Youssef (2002). Esses autores, no único trabalho descrito na literatura sobre o assunto, conseguiram redução da aflatoxina B₁, em amendoim *in natura*, de 45% na dose de 5 kGy, 82-88% com 10 kGy e 100% com 20 kGy. Deve-se registrar que nesse trabalho foi utilizada amostra com concentração de 27,0 µg kg⁻¹ de aflatoxina B₁ e que os autores não mencionaram o nível de umidade da amostra irradiada. Sabe-se que quanto maior o teor de água do grão, mais efetivo é o processo de irradiação. O processo de radiólise da água forma maior número de radicais livres e de outras espécies iônicas e excitadas, aumentando os efeitos indiretos da irradiação (Rela, 2000; Landgraf, 2003).

Outra possível explicação para a irradiação gama não ser totalmente efetiva seria o pequeno tamanho da molécula da aflatoxina B₁ (peso molecular 312 g). Sabe-se que a sensibilidade à irradiação gama é proporcional ao seu peso molecular. Uma molécula de DNA, por exemplo, é mais sensível que a de um aminoácido (Landgraf, 2003). Além disso, o amendoim apresenta elevado teor de proteínas e lipídeos (50% de gordura e 22-30% de proteína). Essas moléculas teriam maior probabilidade (efeito competição) de sofrer ação direta e indireta das radiações ionizantes, durante o processo de irradiação, que a aflatoxina B₁ (Azeredo, 2003; Fagundes, 2002; Landgraf, 2003).

Desde que não foi observada diferença significativa, em nível de 5 % de probabilidade, entre o percentual de destruição de aflatoxina B₁ e as doses de 15, 20, 25 e 30 kGy, sugere-se que seja aplicada a dose de 15 kGy para amendoim *in natura* contaminado com aflatoxina B₁, com o objetivo de reduzir níveis elevados de contaminação. Entretanto, a estabilidade do óleo de amendoim e a qualidade do produto devem ser avaliadas pelo monitoramento dos valores de

ácido tiobarbitúrico e do índice de peróxido. Chiou et al. (1990) observaram um ligeiro aumento desses parâmetros, quando dose de 15 kGy foi aplicada em amendoim em grão.

4 CONCLUSÕES

Doses de irradiação gama (^{60}Co) até 10 kGy, não foram suficientes para destruir aflatoxina B₁ em amostras naturalmente contaminadas. Estas mesmas doses, entretanto, destruíram cerca de 20% da aflatoxina B₁ em amostras artificialmente contaminadas.

Doses de irradiação gama (^{60}Co) de 15, 20, 25 e 30 kGy destruíram a aflatoxina B₁, em amostras naturalmente contaminadas, em percentual que variou de 49 a 72%.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of the AOAC international**. 16. ed. Gaithersburg: AOAC International, 1997.

AZEREDO, G. A.; BRUNO, R. L. A.; SOUZA, A. P.; SILVA, A. BRUNO, G. B.; QUEIROGA, V. P. Qualidade fisiológica de sementes armazenadas de amendoim. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 50, n. 288, p. 127-141, mar./abr. 2003.

AZIZ, N. H.; YOUSSEF, B. M. Inactivation of naturally occurring of mycotoxins in some egyptian foods a and agricultural commodities by gamma irradiation. **Egyptian Journal of Food Science**, Cairo, v. 30, n. 1, p. 167-177, 2002.

BHAT, R. V. Mould deterioration of agricultural commodities during transit: problems faced by developing countries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 7, n. 3, p. 219-225, Dec. 1988.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n° 21, de 26 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento para irradiação de alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 29 jan. 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n°. 274, de 15 de outubro de 2002. aprova o regulamento técnico sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim e no milho. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 16 out. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento e da Reforma Agrária. 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. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 25 mar. 1996.

COMMISSION REGULATION (98/53/EC) of 16th july 1998. **Official Journal of the European Communities L201/93**. Luxembourg.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY - CAST. **Mycotoxins: economics and health risks**. Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Tecnology, 2003. Task Force Report 139.

CHIOU, R. Y. Y.; LIN, C. M.; SHYU, S. L. Property characterization of peanut kernels subjected to gamma irradiation and its effect on the outgrowth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 1, p. 210-213, Jan./Feb. 1990.

DEL MASTRO, N. L. Alimentos esterilizados para uso em hospitais e rações alimentares. **Revista Brasileira de Pesquisa e Desenvolvimento**, São Paulo, v. 2, n. 1, p.4, 1999.

FAGUNDES, M. H. Sementes de amendoim: alguns comentários. 2002. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 6 maio 2004.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análise estatística – SISVAR**. Lavras: UFLA, 2000.

GIMENO, A. Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin and penitrem A. **Journal Association Official and Analytical Chemists**, Washington, v. 62, p. 579-585-1979.

GIROUX, M.; LACROIX, M. Nutritional adequacy of irradiated meat - a review. **Food Research International**, Amsterdam, v. 31, n. 4, p. 257-264, 1998.

GRUPO CONSULTIVO INTERNACIONAL SOBRE IRRADIAÇÃO DE ALIMENTOS - GCIIA. **Fatos sobre a irradiação de alimentos**. Ed. CDTN. (Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear), Brasil, 1999. 46 p.

GRUPO CONSULTIVO INTERNACIONAL SOBRE IRRADIAÇÃO DE ALIMENTOS - GCIIA. **A irradiação de alimentos: ficção e realidade**. Ficha Descritiva, 1990. 38 p.

HERNANDES, N. K.; VITAL, H. C.; SABAA-SRUR, U. O. Irradiação de alimentos: vantagens e limitações. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 37, n. 2, p. 154-159, jul./dez. 2003.

HORWITZ, W.; ALBERT, R. The reliability of aflatoxin assays. **Association Food and Drug Official Quarterly Bulletin**, v. 46, p. 14-24, 1982.

LANDGRAF, M. Controle do desenvolvimento microbiano nos alimentos. In: MELO FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003. Cap. 7. p. 109-148.

- LIMA, K. S. C.; GROSSI, J. L. S.; LIMA, A. L. S.; ALVES, P. F. M. P.; CONEGLIAN, R. C. C.; GODOY, R. L. O.; SABBA-SRUR, A. U. O. Efeito da irradiação ionizante γ na qualidade pós-colheita de cenouras (*Daucus carota* L.) cv. Nantes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 202-208, 2001.
- MOSS, M. O. Mycotoxins. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, p. 513-523, 1996.
- PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important? **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, p. 17-22, 2000. Supplement 1.
- RELA, P. R. Cresce uso de irradiação para conservação de alimentos. **Revista de Engenharia de Alimentos**, São Paulo, n. 29, p. 26-29, 2000.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: The last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.33, n. 1, p.1-14, Jan./Mar. 2002.
- SAMARAJEEWA, U.; SEN, A. C.; COHEN, M. D.; WEI, C. I. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 53, n. 6, p. 489-501, June 1990.
- SAMPAIO, M. B. I. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221 p.
- SAS INSTITUTE. **Users guide: statistics**. 1989-1996. Version 6.11. System for Windows. Edition. Cary North Carolina, 1996.
- VALENTE SOARES, L. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxins A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal Association Official and Analytical Chemists**, Washington, v. 72, n. 1, p. 22-25, 1989.
- VALENTE SOARES, L. M. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 60, n. 1, p. 79-84, 2001.

VERRUMA-BERNARDI, M. R.; SPOTO, M. H. F. Efeito da radiação gama sobre o perfil sensorial de suco de laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 28-32, 2003.

WORCMAN-BARNINKA, D.; LANDGRAF, M. Irradiação de carnes. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas. v. 37, n. 1, p. 22-27, jan./jun. 2003.

CAPÍTULO 3

INFLUÊNCIA DA IRRADIAÇÃO GAMA (^{60}Co) NA MICROBIOTA FÚNGICA E PRODUÇÃO DE AFLATOXINA B₁ PELO *Aspergillus flavus* IMI 190443 EM AMENDOIM (*Arachis hypogaea* L.)

RESUMO

PRADO, G. Influência da irradiação gama (^{60}Co) na microbiota fúngica e produção de aflatoxina B₁ pelo *Aspergillus flavus* IMI 190443 em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). In: _____. **Influência da irradiação gama (^{60}Co) na microbiota fúngica e na aflatoxina B₁ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.)**. 2005. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Foi verificado o efeito da irradiação gama (^{60}Co), em diferentes doses, na destruição da microbiota fúngica natural de amendoim *in natura*, variedade Tatu Vermelho, safras 2001/2002 e 2002/2003, pela Contagem Total de Fungos (UFC/g), utilizando a técnica do espalhamento em superfície, e pela Porcentagem de Infecção Fúngica, usando a técnica do plaqueamento direto. Em ambas as metodologias foi empregado o meio Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC). Observou-se também a produção de aflatoxina B₁ pelo *Aspergillus flavus* IMI 190443 em amostras de amendoim, variedade Tatu Vermelho, irradiadas e inoculadas e previamente inoculadas e posteriormente irradiadas. A aflatoxina B₁ foi extraída em mistura de metanol e KCl 4% (270 + 30, v/v), seguido de clarificação com CuSO₄ 10% e partição com clorofórmio. A quantificação foi feita por cromatografia em camada delgada, medindo-se a área das fluorescências de amostras e padrões em densitômetro a 366 nm. Observou-se que em doses de 5 e 10 kGy a microbiota fúngica natural foi totalmente destruída. Entretanto, doses de 25 e 30 kGy foram necessárias para a completa inativação de esporos de *Aspergillus flavus* IMI 190443. A inoculação de amendoim previamente irradiado, com cepa aflatoxigênica, provocou a formação de níveis elevados de aflatoxina B₁.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA

ABSTRACT

PRADO, G. Gamma-irradiation effect in the mycoflora and aflatoxin B₁ production by *Aspergillus flavus* IMI 190443 in peanut. (*Arachis hypogaea* L.). In: _____. **Gamma radiation influence on mycoflora and on aflatoxin B₁ in peanut (*Arachis hypogaea* L.)**. 2005. Thesis (Doctorate in Food Science). Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

Gamma-irradiation effect was verified, in different doses, in the destruction of the peanuts in natural mycoflora, Tatu Vermelho variety, 2001/2002 and 2002/2003 crops, by the colony forming units/g (UFC/g) and percentage of fungi infection. In both methodologies was used dichoran rose bengal chloranphenicol agar (DRBC). It was also observed the aflatoxin B₁ production by *Aspergillus flavus* IMI 190443 in peanuts sample, Tatu Vermelho variety, irradiated and inoculated and previously inoculated and irradiated later on. Aflatoxin B₁ was extracted with a mixture of methanol e 4% potassium chloride (270 + 30, v/v), followed by clarification with 10% cupric sulfate and partition with chloroform. The quantification was done by thin layer chromatography, measuring the samples fluorescences areas and standards in densitometer (366 nm). It was showed that in 5 and 10 kGy doses the natural mycoflora was totally destroy. However, 25 and 30 kGy doses were necessary to complete inactivation of *Aspergillus flavus* IMI 190443 spores. Peanuts inoculation previously irradiated, with aflatoxigenic isolate, induced the production of high levels of aflatoxin B₁.

Adviser: Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA

1 INTRODUÇÃO

O problema das micotoxinas é muito sério em países em desenvolvimento, onde condições climáticas favoráveis, práticas agrícolas e de armazenamento inadequadas, conduzem ao crescimento fúngico e à produção de toxinas em diferentes alimentos (Aziz & Youssef, 2002; CAST 2003).

O cultivo do amendoim (*Arachis hypogaea* L.), uma das mais importantes sementes oleaginosas do mundo em desenvolvimento, caracteriza-se por ser uma valiosa fonte de proteína para a nutrição humana e animal e por fornecer um óleo para a cozinha de alta qualidade (Fagundes, 2002; Shahim & Aziz, 1997). Entretanto, fungos do gênero *Aspergillus*, em áreas de clima quente e úmido, são capazes de invadir figos, nozes, cereais, mas principalmente amendoim e milho, e produzir as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, metabólitos secundários que apresentam atividade mutagênica, teratogênica e carcinogênica (Pepeljnjak et al., 2004). *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* são as espécies mais importantes produtoras de aflatoxinas (CAST, 2003).

No Brasil, em amostras de amendoim da região de Araraquara (São Paulo), espécies de *Aspergillus*, principalmente *Aspergillus flavus*, foram as mais isoladas. De 107 culturas isoladas, 102 foram identificadas como *A. flavus* (Fonseca et al., 1974).

Em Ghana, em amostras de amendoim de 10 regiões, foram observados altos níveis de infestação com *Aspergillus flavus*. A porcentagem atingiu 31,7% e 12,8%, em sementes danificadas e não danificadas, respectivamente (Awuah & Kpodo, 1996).

Resultados semelhantes foram registrados na Indonésia, onde em 256 amostras de amendoim analisadas, 251 (98%) apresentavam o *A. flavus*, e em 205 (80%), o *A. niger* (Pitt et al., 1998).

Em amostras de amendoim coletadas em diferentes supermercados de dois países tropicais da África (Uganda, cidade de Kampala; Kênia, cidades de Nairobi e Nakuru), foram observados 69% e 74%, respectivamente, de infestação com fungos. *Aspergillus spp* (38,97%) foi o mais freqüentemente isolado, sendo *A.niger* (21,81%), *A.flavus* (12,01%) e *A.parasiticus* (3,43%) as espécies mais comumente encontradas (Ismail, 2000).

Aziz & Youssef (2002) avaliaram um total de 90 amostras de sementes, incluindo amendoim, de diferentes províncias do Egito, e verificaram que *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus niger* ocorreram em faixa de 62,2-95,6%.

Vaamonde et al. (2003) isolaram, em 30 amostras de amendoim cultivadas na província de Córdoba, área típica de produção da Argentina, 37 espécies de *A.flavus* e 30 de *A.parasiticus*.

A aflatoxina B₁ é certamente, entre todas as toxinas, a mais tóxica para os seres humanos e pode estar envolvida epidemiologicamente em câncer de fígado humano, em algumas partes do mundo, como na China e África, agindo sinergicamente com o vírus da hepatite B (Moss, 1996; Wild & Hall, 2000).

No Brasil, a incidência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim, continua a ser grande problema, embora a extensão e os níveis estejam situados em patamares inferiores aos relatados no período de 1965 a 2000 (Oliveira et al., 2002; Rodriguez-Amaya & Sabino, 2002; Sabino & Rodriguez-Amaya, 1993).

Vários métodos de preservação têm sido descritos para impedir o crescimento de fungos e a produção de aflatoxinas, tais como fumigação, amônia, luz ultravioleta, tratamento pelo calor e solventes químicos, mas nenhum desses métodos oferece completo controle dos fungos toxigênicos e das micotoxinas. Além do mais, efeitos nocivos à saúde humana e ao meio ambiente, associados aos resíduos, limitam a aplicação química em grande

extensão. Conseqüentemente, irradiação ionizante por meio de uma fonte de ^{60}Co , também chamada de esterilização a frio, tem sido investigada como um processo alternativo para a preservação de alimentos (Aziz et al., 1997; Aziz et al., 2002; CAST, 2003; Chiou et al., 1990; Farag et al., 1995).

O interesse no processo de irradiação é crescente devido às grandes perdas de alimentos decorrentes da infestação por insetos, da contaminação e da deterioração por microorganismos. Além disso, com o aumento de regulamento restritivo ou a total proibição do uso de fumigantes químicos, muito utilizados para controle de insetos e microorganismos, a irradiação tem sido alternativa efetiva no controle de qualidade dos alimentos (GCIIA, 1999).

Algumas investigações descritas na literatura mundial destacam a eficiência da irradiação gama no controle de espécies fúngicas de *Aspergillus* e *Penicillium* em diferentes alimentos (Aziz et al., 1999; Aziz & Mahrous, 2003; Rodriguez Jorge & Garzón, 1993). Entretanto, não foi ainda relatado o efeito da irradiação gama na microbiota fúngica natural do amendoim, variedade Tatu Vermelho, cultivado no Brasil, e a capacidade de produção de aflatoxina B₁, por uma cepa aflatoxigênica, no amendoim previamente irradiado.

No Brasil, a legislação que trata do emprego da irradiação em alimentos é a Resolução RDC N.^o 21, de 26 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. As doses a serem aplicadas devem ser compatíveis com os efeitos desejados, não tendo a legislação fixado valores mínimos ou máximos (Brasil, 2001).

O propósito da presente investigação foi: (1) estudar o efeito da irradiação gama na Contagem Total de fungos e na capacidade de reduzir a porcentagem de infecção fúngica em amendoim; (2) verificar a produção de aflatoxina B₁ por uma cepa aflatoxigênica, em amendoim, em função da concentração de esporos e do tempo de incubação; (3) verificar a produção de aflatoxina B₁ por uma cepa aflatoxigênica, em amendoim, previamente

irradiado, em diferentes níveis; (4) verificar a porcentagem de infecção fúngica e a produção de aflatoxina B₁ por uma cepa aflatoxigênica previamente inoculada em amendoim, seguida de irradiação em diferentes níveis.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Foram utilizadas amostras de amendoim em grão *in natura* (4-6 kg), enviadas pela Santa Helena Indústria de Alimentos S. A. (Ribeirão Preto - São Paulo), cultivar Tatu Vermelho, das safras de 2001/2002 e 2002/2003, isentas de aflatoxinas, conforme análise prévia realizada na Fundação Ezequiel Dias.

O plano de amostragem para a formação das amostras envolveu formação de lotes de 2500 kg de grãos beneficiados, descascados e ensacados em sacos de 50 kg, correspondendo a 50 sacos. De cada lote foram tirados 100 incrementos de amostra, sendo 2 de cada saco. Cada incremento correspondeu a 100 g, em um total de 200 g por saco, ou seja, 10 kg de grãos. A amostra foi homogeneizada e dividida por quarteamento. Para formação da amostra de trabalho, duas partes foram separadas em diagonal, obtendo-se aproximadamente 5 Kg de grãos.

2.2 Fungo aflatoxigênico

Foi utilizada uma cepa de *Aspergillus flavus* IMI 190443, proveniente do International Mycological Institute (Inglaterra), isolada de pistache da Turquia, forte produtora de aflatoxina B₁.

2.3 Preparação da suspensão de esporos do fungo aflatoxigênico

A cepa de *Aspergillus flavus* foi inoculada em placa de Petri contendo o meio de Czapek (nitrato de sódio 4%, cloreto de potássio 1%, sulfato de magnésio 7H₂O 1%, sulfato ferroso 7H₂O 0,02%, fosfato de potássio dibásico 2%, sacarose 3%, sulfato de zinco 7H₂O a 1% 0,1 mL, sulfato de cobre a 0,5% 0,1 mL, ágar 2%) e incubada por 7 dias a 25°C. Após esporulação, uma alçada de esporos foi transferida para um tubo de Eppendorf contendo

aproximadamente 1,5 mL de Tween 0,1%, com posterior agitação por 1 minuto para dispersão dos esporos. Foram transferidos, então, 200 µL desta suspensão para Erlenmeyer de 250 mL, contendo 25 mL do meio GYEP (glicose 2%, extrato de levedura 0,3% e peptona 1%) solidificado. Seguiu-se incubação a 25°C por 7 dias para esporulação. Após esse tempo, foram adicionados 20 mL de Tween 0,1% ao frasco e 10 pérolas de vidro, agitando-se gentilmente e transferindo-se o sobrenadante para um outro Erlenmeyer. O número de esporos/mL da suspensão foi calculado em câmara de Neubauer e ajustado para 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 esporos mL⁻¹, conforme o experimento a ser executado.

2.4 Processo de irradiação

O processo de irradiação foi conduzido e executado no Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - CDTN/MG. A taxa de dose foi ao redor de 6,0 kGy h⁻¹ (Anexos, figuras 2, 3 e 4, páginas 183 e 184).

2.5 Extração e quantificação de aflatoxina B₁

A extração da aflatoxina B₁ das amostras e a purificação dos extratos foram feitos segundo o método descrito por Valente Soares & Rodriguez-Amaya (1989). Posteriormente, a aflatoxina B₁ foi separada, identificada e quantificada por cromatografia em camada delgada (CCD), em placas de sílica gel 60G, 20 x 20 cm (Merck), sem indicador fluorescente, com espessura de 0,25 mm, utilizando-se como fase móvel tolueno:acetato de etila:clorofórmio:ácido fórmico (70:50:50:20, v/v/v/v), recomendado por Gimeno (1979). Os extratos das amostras para CCD foram ressuspensos em benzeno:acetonitrila (98:2), em volumes que variavam de 100 a 5000 µL. Para aplicação na placa de cromatografia de camada delgada, foram utilizados volumes que variaram de 2 a 10 µL. Para a elaboração da curva de calibração da aflatoxina B₁, foram

utilizados volumes de 2 a 10 μL da solução padrão, de concentração de 0,88 $\mu\text{g/mL}$, sempre com um mínimo de 4 pontos. A quantificação da aflatoxina B_1 foi feita através das medidas das intensidades das fluorescências dos spots das amostras e de padrões, em Densitômetro Shimadzu modelo CS9301PC, com lâmpada de xenônio, em leitura linear, com feixe 0,4 x 5,0 mm e alta sensibilidade de fluorescência. Os níveis de aflatoxina B_1 nas amostras foram calculados a partir do cálculo das áreas dos picos das aflatoxinas dos extratos das amostras e da solução padrão de aflatoxina B_1 .

A concentração exata da solução padrão de aflatoxina B_1 foi medida de 3 em 3 meses, em espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC, Shimadzu Scientific Instrument, Japan, utilizando cubetas de quartzo de 1,0 cm (AOAC, 1997).

2.6 Isolamento e determinação fúngica

A quantificação de fungos (bolores e leveduras) foi efetuada utilizando duas técnicas para propósitos gerais:

2.6.1 Diluição em placa

É um método que determina o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g) de bolores e leveduras pela técnica do espalhamento em superfície, descrita por Pitt & Hocking (1999) e resumida a seguir.

Foram homogeneizados 25 g de amendoim em grão, com 225 mL de água peptonada a 0,1%, durante 2 minutos, usando um "stomacher" 400 (Seward, London, UK). A partir dessa diluição inicial (10^{-1}) foram preparadas diluições decimais seriadas até 10^{-3} . Aliquotas de 1,0 mL (0,3 mL, 0,3 mL, 0,3 mL e 0,1 mL) de cada uma das diluições foram distribuídas em 4 placas de Petri, em duplicata, no meio de cultivo Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC/DIFCO), preparado como sugerido por Taniwaki & Silva (2001).

Seguiu-se incubação a 25°C por 5 dias, em ausência de luz e contagem das colônias expressa em UFC/g.

2.6.2 Plaqueamento direto

É considerada a técnica mais efetiva para o exame micológico de alimentos particulados, tais como grãos e amêndoas (Pitt & Hocking, 1999).

Os grãos de amendoim dos diferentes experimentos foram desinfetados externamente, por imersão em uma solução de hipoclorito de sódio a 0,4%, por 2 minutos. Em seguida, foram distribuídos 5 grãos/placa, em um total de 6 placas contendo o meio de cultivo DRBC. Seguiu-se incubação a 25°C durante 5 dias, e então foi observado o crescimento visual fúngico. Os resultados foram expressos em porcentagem de infecção interna.

2.7 Procedimento para verificação do efeito da irradiação gama (⁶⁰Co) na microbiota fúngica

Grãos de amendoim *in natura* (200 g) em duplicata, acondicionados em sacos plásticos, foram irradiados com ⁶⁰Co (item 2.4) conforme o seguinte esquema:

1. Amostra safra 2001/2002: 0 (Controle), 1,0, 2,0, 3,0, 5,0 e 10,0 kGy, com o objetivo de verificar a contagem total de unidades formadoras de colônias (UFC/g), conforme o item 2.6.1, e porcentagem de infecção interna do grão, de acordo com o item 2.6.2;
2. Amostra safra 2002/2003: 0 (Controle), 0,1, 0,3, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 5,0 e 10,0 kGy para verificar a porcentagem de infecção interna do grão, de acordo com o item 2.6.2.

2.8 Procedimento de inoculação dos grãos de amendoim com suspensão de *A.flavus* IMI 190443

Com o objetivo de avaliar a produção da aflatoxina B₁ pelo *A.flavus* IMI 190443, foi estruturada uma marcha analítica conforme recomendado por Rodriguez & Rodriguez (1983) e Prado et al. (1999).

A partir das suspensões de esporos preparadas como descrito no item 2.3 procedeu-se, em triplicata, a inoculação de 5 mL de cada uma das suspensões (10^3 , 10^4 e 10^5 esporos mL⁻¹) em 15 g de amendoim em grão, contidos em Erlenmeyer de 125 mL previamente autoclavado a 121°C durante 15 minutos. Seguiu-se incubação a 25°C por um período de 21 dias. Posteriormente, quantificou-se a aflatoxina B₁ conforme descrito no item 2.5.

2.9 Procedimento para verificação da produção de aflatoxina B₁ em amostras irradiadas e posteriormente inoculadas com *A.flavus* IMI 190443

A partir de amostras de amendoim em grão (200 g) irradiadas com 0, 1,0, 2,0, 3,0, 5,0 e 10,0 kGy, foram pesados 15 g em Erlenmeyer de 125 ml, os quais foram inoculados com 5 mL da suspensão de esporos de *A.flavus* IMI 190443 10^4 esporos mL⁻¹, preparada como descrito no item 2.3. Em seguida, incubou-se o material a 25°C durante 7 dias e quantificou-se a aflatoxina B₁ como descrito no item 2.5. Com amostras da safra 2001/2002, o procedimento foi realizado em triplicata para cada nível de irradiação. Com amostras da safra 2002/2003 foram realizadas 6 repetições.

2.10 Procedimento para verificação da produção de aflatoxina B₁ e porcentagem de infecção fúngica em amendoim inoculado e posteriormente irradiado

Neste experimento foram feitos dois procedimentos para atender os objetivos propostos.

2.10.1 Determinação da porcentagem fúngica

Foram distribuídos, em frascos Erlenmeyer de 500 mL, 45 g de amendoim *in natura* e 15 mL de uma suspensão de esporos de *A.flavus* IMI 190443 10^6 esporos mL^{-1} , preparada como descrito no item 2.3. Após equilíbrio a 4°C por uma noite, realizou-se o processo de irradiação nos níveis de 0, 0,3, 0,5, 1,0, 3,0, 5,0 e 10,0 kGy (item 2.4). Esse procedimento foi realizado em duplicata. Em seguida, realizaram-se os processos de desinfecção e plaqueamento, como descrito no item 2.6.2.

Paralelamente foram calculadas, também em duplicata, a porcentagem fúngica da amostra *in natura* (sem inoculação e sem irradiação) e a da amostra inoculada nas mesmas condições das anteriores, mas sem irradiação com ^{60}Co .

Este procedimento foi repetido, com a mesma amostra, alterando apenas os níveis de irradiação para 0, 15, 20, 25 e 30 kGy.

2.10.2 Determinação da aflatoxina B₁

Foram distribuídos, em frascos Erlenmeyer de 125 mL, 15 g de grãos de amendoim e 5 mL de uma suspensão de esporos de *A.flavus* IMI 190443 10^6 esporos mL^{-1} , preparada como descrito no item 2.3. Após equilíbrio a 4°C por uma noite, realizou-se o processo de irradiação nos níveis de 0,3, 0,5, 1,0, 3,0, 5,0 e 10,0 kGy (item 2.4). Em seguida, procedeu-se a incubação a 25°C por 7 dias e realizou-se a quantificação da aflatoxina B₁ de acordo com o item 2.5. Este procedimento foi realizado em triplicata.

Paralelamente, foram realizados um branco (sem inoculação e sem irradiação) e um controle (sem irradiação, mas com inoculação), nas mesmas condições descritas anteriormente.

Este procedimento também foi repetido, com a mesma amostra, alterando apenas os níveis de irradiação para 15, 20, 25 e 30 kGy.

2.11 Delineamento experimental e análise estatística

Na situação em que foi possível a análise via o teste F e os resultados foram significativos, utilizou-se o teste Scott-Knott para determinar as diferenças entre as médias em nível de significância de 5% (Sampaio, 1998). Para comparar tratamentos no caso em que a significância foi detectada pelo teste Kruskal-Wallis, executou-se comparação múltipla do próprio teste. Foram utilizados os recursos do software estatístico SAS (SAS, 1996).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da irradiação gama (^{60}Co) na microbiota fúngica

O efeito da irradiação gama (^{60}Co) na contagem total de fungos em amendoim *in natura* é mostrado na tabela 1. Foi observado decréscimo na população fúngica (UFC/g) à medida que as doses de irradiação aumentavam, sendo os fungos completamente inibidos em dose de 3 kGy. Resultados semelhantes foram encontrados por Shahin & Aziz (1997). A contagem total de fungos em amendoim moído foi reduzida de $19,5 \times 10^6$ para $6,0 \times 10^2$ UFC/g na dose de 2 kGy e, a 3 kGy, o fungo foi completamente inibido. Entretanto, Rodriguez Jorge & Garzón (1993) conseguiram redução de $4,1 \times 10^3$ UFC/g para $1,0 \times 10^1$ UFC/g, quando a mesma dose de irradiação de 3 kGy foi aplicada em amendoim em grão, enquanto Aziz & Youssef (2002) alcançaram redução total da contagem fúngica em amendoim moído, a partir da contaminação inicial de $8,2 \times 10^4$ UFC/g, somente quando foi aplicada dose de 5 kGy.

TABELA 1. Efeito da irradiação gama na contagem total de fungos em grãos de amendoim Tatu Vermelho *in natura* safra 2001/2002.

Dose de Radiação (kGy)	Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g) ¹	População Fúngica (log ₁₀ UFC/g)
0	$1,3 \times 10^4$	4,1
1	$2,0 \times 10^1$	1,3
2	$1,0 \times 10^1$	1,0
3	< 10	0
5	< 10	0
10	< 10	0

¹Média de duplicata

Em outros alimentos, diferentes trabalhos também relataram o efeito letal da irradiação gama em fungos, em doses próximas de 3 kGy. Em milho e cevada, a partir de uma contagem total de fungos de $3,3 \times 10^4$ UFC/g e $5,8 \times 10^5$ UFC/g, respectivamente, a população fúngica atingiu valores < 10 UFC/g quando a dose de irradiação gama foi de 4 kGy (Aziz et al., 1999; El-Zawahry et al., 1991). Em trigo e soja, foi necessária uma dose de 5 kGy para obter sementes com valores de $0 \log_{10}$ UFC/g (Aziz & El-Halfawy, 1991; Aziz & Mohrous, 2003). Em grãos de café variedades Arábica e Robusta, uma completa destruição da população fúngica foi alcançada somente com irradiação a 10 kGy (Ahmad et al., 2003). Entretanto, em diferentes frutas (maçã, pêra, uva, figo e morango), uma dose de 3,5 kGy foi capaz de reduzir a Contagem Total de Fungos para valores em torno de $1,0 \times 10^1$ UFC/g (Aziz & Moussa, 2002).

Os resultados da contaminação fúngica de amendoim *in natura*, safras 2001/2002 e 2002/2003, antes e após irradiação, são mostrados na tabela 2.

TABELA 2. Efeito da irradiação gama na porcentagem de infecção fúngica em grãos de amendoim Tatu Vermelho *in natura*, safras 2001/2002 e 2002/2003.

Dose de Radiação (kGy)	Infecção (%) ¹	
	2001/2002	2002/2003
0	21,0	22,0
0,1	—	22,0
0,3	—	18,0
0,5	—	15,0
1,0	3,3	6,6
2,0	3,3	3,3
3,0	0	3,3
5,0	0	0
10,0	0	0

¹Média de duplicata. — Não foi executado.

Novamente os resultados obtidos sugerem a afirmativa de que a microbiota fúngica natural em amendoim é relativamente sensível a pequenas doses de irradiação. A 3,0 kGy a redução da porcentagem de infecção fúngica foi muito intensa, de 21-22% para 0-3,3%, sendo que, a 5,0 kGy, observou-se redução total da infecção fúngica natural do amendoim variedade Tatu Vermelho. Chiou et al. (1990) observaram o grau de infecção fúngica natural em grãos de amendoim após irradiação com ^{60}Co em doses de 0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 15,0 kGy. A 2,5 kGy, 45% das sementes ainda apresentavam fungos viáveis, mostrando crescimento após 3 dias de incubação a 30°C em meio de Ágar Dextrose Batata. Os fungos foram completamente eliminados em dose maior ou igual a 5,0 kGy.

A comprovação estatística de que o aumento da irradiação (0 a 10 kGy) provoca um decréscimo na porcentagem de infecção fúngica, foi avaliada pela correlação entre as doses aplicadas de irradiação gama e as porcentagens de infecção obtidas (Tabela 2 – dados de 2002/2003). O coeficiente de correlação de Pearson calculado foi -0,707, com probabilidade de 0,002, inferior a 0,05. Dessa forma, com base no resultado obtido, há evidência estatística de que aumentando as doses de irradiação gama as porcentagens de infecção fúngica são reduzidas.

3.2 Produção de aflatoxina B₁ por *Aspergillus flavus* IMI 190443 após inoculação em amendoim

A produção de aflatoxina B₁ por *Aspergillus flavus* IMI 190443 após inoculação em amendoim, em três concentrações de esporos, 10³, 10⁴ e 10⁵ esporos mL⁻¹, seguido de incubação a 25°C durante o período de 21 dias, é mostrada na tabela 3 e figura 1.

TABELA 3. Teores de aflatoxina B₁ em amendoim, cultivar Tatu Vermelho, previamente autoclavado e inoculado com *Aspergillus flavus* IMI 190443, em três concentrações de esporos e incubação em diferentes períodos de tempo.

Tempo (dias)	Aflatoxina B ₁ (µg kg ⁻¹) ¹ após inoculação com <i>A. flavus</i>		
	Esporos mL ⁻¹		
	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
1	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND
3	ND	54	31
4	189	328	621
5	1787	1255	1446
6	3000	2816	2697
7	4316	3912	3036
8	4690	4167	1616
9	3423	2304	1603
10	3216	2952	1861
11	5677	3764	2197
12	6061	2374	1889
13	4752	3973	1887
14	3246	3305	2158
15	5277	4056	3138
21	5630	3075	2013

¹Médias de três repetições. ND = Não Detectado

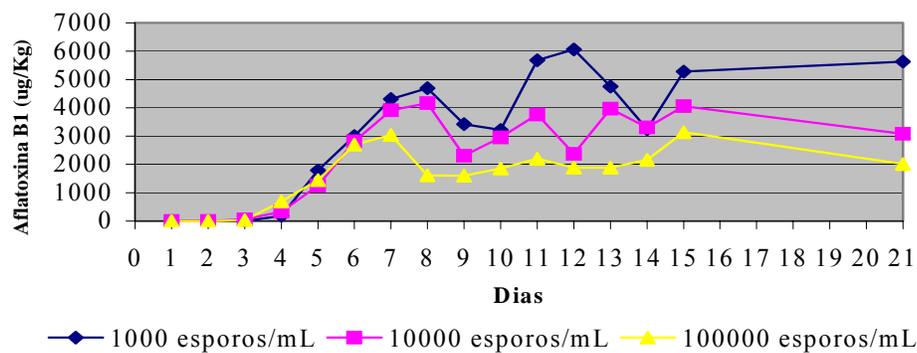


FIGURA 1. Teores de aflatoxina B₁ em amendoim previamente autoclavado, cultivar Tatu Vermelho, inoculado com *Aspergillus flavus* IMI 190443 e incubado a 25°C.

Os resultados apresentados evidenciam que as concentrações dos inóculos fúngicos apresentaram efeitos diferenciados em cada tempo. Importante ressaltar que para as três concentrações, os tempos iniciais (1 a 4 dias) tiveram respostas nulas ou de produção pouco significativa de aflatoxina B₁. Portanto, para análise inferencial, mais especificamente a análise de variância, a qual pressupõe homogeneidade de variâncias e normalidade, torna-se inviável analisar o efeito concentração para esses tempos, uma vez que as conclusões são bastante óbvias, isto é, os níveis de aflatoxina B₁ produzidos são diferentes quando se comparam estes com os outros tempos.

Desta forma encontra-se, na tabela 4, a análise de variância, enfatizando que os níveis de aflatoxina B₁ nos tempos 1, 2, 3 e 4 dias foram excluídos dessa análise estatística. Nos outros tempos, os níveis de aflatoxina B₁ sofreram transformações logarítmicas, pois foi observada instabilidade da resposta, isto é, aumento da proporcionalidade entre as médias dos grupos experimentais e seus respectivos desvios padrão, configurando a não conformidade com os pré-requisitos exigidos para análise de variância, conforme descrito por Sampaio (1998).

TABELA 4. Análise de variância dos teores de aflatoxina B₁ após inoculação com *A.flavus* em três concentrações (10³, 10⁴ e 10⁵ esporos mL⁻¹) e após 12 intervalos de tempo.

Fonte de Variação	GL.	QM.	p-valor
Concentração	2	3,71598	0,000
Tempo	11	0,61855	0,000
Concentração*Tempo	22	0,14851	0,057
Erro	72	0,08973	
Total	107		

Coeficiente de variação: 3,7%

Fixando o nível de significância em 5% (teste F), os resultados encontrados indicam que apenas os efeitos principais, concentração ($p=0,000$) e tempo ($p=0,000$), foram significativos, isto é, pelo menos uma das médias apresenta diferença significativa quando comparada com as demais. Convém destacar que a interação concentração*dose não foi significativa ($p=0,057$), o que leva à afirmação de que não existe dependência entre as concentrações fúngicas utilizadas e o período de tempo do experimento. Dessa forma, foi realizado o teste Scott-Knott para cada fator, independentemente do outro. Os resultados são apresentados a seguir nas tabelas 5 e 6.

TABELA 5. Efeitos médios dos teores de aflatoxina B₁ em função das concentrações de *A.flavus* IMI 190443.

<i>A.flavus</i> (esporos mL ⁻¹)	Médias de aflatoxina B ₁ (µg kg ⁻¹)
10 ⁵	7.619432 a1
10 ⁴	7.981543 a2
10 ³	8.260184 a3

Médias com o mesmo símbolo na vertical, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, em nível de 5% de significância.

TABELA 6. Efeitos médios dos teores de aflatoxina B₁ em função do tempo.

Tempo (dias)	Médias de aflatoxina B ₁ (µg kg ⁻¹)
5	7.267002 a1
9	7.727444 a2
10	7.838282 a2
14	7.939599 a2
6	7.945158 a2
12	7.987780 a2
21	8.023140 a3
8	8.032663 a3
13	8.065182 a3
11	8.160488 a3
7	8.209838 a3
15	8.248062 a3

Médias com o mesmo símbolo na vertical, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, em nível de 5% de significância.

Observa-se que no 7^o e 15^o dias a produção de aflatoxina B₁ atingiu os valores mais elevados, os quais não diferiram entre a si em 5% de significância. Foi verificada diferença significativa entre as três concentrações fúngicas em nível de 5% de significância. As concentrações de 10³ e 10⁵ esporos mL⁻¹ de *A.flavus* produziram o maior e o menor nível de aflatoxina B₁, respectivamente.

A influência do tamanho do inóculo no crescimento e na produção de aflatoxina pelo *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus flavus* em meio sintético e milho, respectivamente, foi relatado por Sharma et al. (1980) e Odamtten et al. (1987). Esses autores observaram que decréscimo no tamanho do inóculo dos fungos proporcionava aumento na produção de aflatoxina. Em populações menores de fungos, maior expansão lateral no meio de cultivo durante o crescimento do micélio resultava em maiores rendimentos de aflatoxina. Segundo Farkas (1989), em altos níveis do inóculo fúngico, a diminuição do processo de esporulação, que está relacionado ao metabolismo secundário das aflatoxinas e à possibilidade de decomposição mais intensa da micotoxina em períodos de incubação mais prolongados, são fatores que podem explicar essa diferença na produção de aflatoxina. Karunaratne & Bullerman (1990) observaram esse mesmo fenômeno em arroz. Os maiores níveis de aflatoxina foram produzidos na concentração de 10³ esporos mL⁻¹ e os menores, quando a concentração era alta (10⁷ esporos mL⁻¹) ou baixa (10² e 10¹ esporos mL⁻¹).

Prado et al. (1996) em trabalho desenvolvido com o *Aspergillus flavus* IMI 190443 em amendoim cultivar Tatu Vermelho, verificaram, em concentração de 10⁶ esporos mL⁻¹, grande produção de aflatoxina B₁ no período de 21 dias de incubação a 25°C.

Em função dos resultados obtidos foi feita a opção de inocular o *Aspergillus flavus* em concentração de 10⁴ esporos mL⁻¹ (concentração que produziu níveis intermediários de aflatoxina B₁) e incubá-lo durante 7 dias a 25°C para verificar a produção de aflatoxina B₁ em amendoim previamente

irradiado em diferentes níveis (item 2.9). Para verificar o efeito da irradiação gama na capacidade de destruir esporos do *Aspergillus flavus* IMI 190443 e afetar a produção de aflatoxina B₁ (item 2.10) foi utilizada a concentração de 10⁶ esporos mL⁻¹ (item 2.10).

3.3 Produção de aflatoxina B₁ em amostras irradiadas e posteriormente inoculadas com *A.flavus* IMI 190443

Os teores de aflatoxina B₁ produzidos pelo *Aspergillus flavus* IMI 190443, em amostras previamente irradiadas, são mostrados na tabela 7.

TABELA 7. Teores de aflatoxina B₁ em amendoim em grão, irradiado com ⁶⁰Co (0, 1, 2, 3, 5 e 10 kGy) e inoculado com *Aspergillus flavus* IMI 190443, em concentração de 10⁴ esporos mL⁻¹ e incubado a 25°C durante 7 dias.

Dose (kGy)	SAFRA	
	2001/2002	2002/2003
	Aflatoxina B ₁ (µg kg ⁻¹)*	Aflatoxina B ₁ (µg kg ⁻¹)**
0	689,3	740,0
1	832,0	551,0
2	1427,0	1480,0
3	2933,0	1689,0
5	4931,0	4011,0
10	18022,0	5353,0

* Média de 3 repetições. **Média de 6 repetições

Observa-se que a produção de aflatoxina B₁ apresentou aumento de 689,3 µg kg⁻¹ e 740,0 µg kg⁻¹ (amostras não irradiadas) para 18022 µg kg⁻¹ e

5353 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (irradiadas com 10 kGy), safras 2001 e 2002, respectivamente. Esses dados estão consistentes com os obtidos por Hassan & Aziz (1998), segundo os quais, após irradiação de milho com 2,0 kGy e inoculação com *Aspergillus flavus* EA-81 (10^5 esporos mL^{-1}), o nível de aflatoxina da amostra irradiada e inoculada ($35600 \mu\text{g kg}^{-1}$) foi superior ao da amostra não irradiada e inoculada ($22800 \mu\text{g kg}^{-1}$).

O aumento do teor de aflatoxina pode ser explicado por dois possíveis mecanismos: (i) a irradiação afeta alguns constituintes do grão, tornando-o mais disponível ao fungo; (ii) a irradiação elimina ou reduz alguma microbiota que competiria com o fungo, resultando em melhor crescimento e produção de aflatoxina pelo *Aspergillus spp* (Hassan & Aziz, 1998).

Priyadarshini & Tulpule (1979) também observaram aumento dos níveis de aflatoxina em trigo, previamente irradiado (0,5-2,5 kGy) e inoculado posteriormente com *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 em concentração de 8×10^5 esporos mL^{-1} . O teor de aflatoxina passou de $358 \mu\text{g g}^{-1}$ para $633 \mu\text{g g}^{-1}$ quando a dose aplicada de irradiação foi de 2,5 kGy.

Resultados semelhantes também foram obtidos por Chelack et al. (1991) quando cevada foi irradiada (2 kGy) e posteriormente inoculada com *Aspergillus alutaceus* (10^6 esporos g^{-1}) e incubada a 28°C durante 51 dias. A produção de ocratoxina A foi superior quando comparada à do controle inoculado e não irradiado.

Esses resultados sugerem que os cuidados de controle da umidade relativa e da umidade dos grãos de amendoim irradiados, parâmetros importantes no processo de formação de toxinas, devem ser eficientes a fim de evitar contaminação posterior com fungos aflatoxigênicos e produção de níveis elevados de aflatoxina. Valores de umidade superiores a 10% podem contribuir para a produção de aflatoxinas.

3.4 Produção de aflatoxina B₁ em amostras inoculadas com *A.flavus* IMI 190443 e posteriormente irradiadas

Os resultados obtidos de porcentagem de infecção fúngica e produção de aflatoxina B₁ em amendoim em grão inoculado e irradiado são mostrados nas tabelas 8 e 9 e figuras 2 e 3.

TABELA 8. Teores de aflatoxina B₁ e porcentagem de infecção fúngica em amendoim, cultivar Tatu Vermelho, após inoculação com *Aspergillus flavus* IMI 190443 (10⁶ esporos mL⁻¹), irradiação com ⁶⁰Co e incubação a 25°C durante 7 dias. Safra 2002/2003.

Amostra	Infecção (%)		Aflatoxina B ₁ (µg kg ⁻¹)*
	Resultados	Média	
<i>In natura</i> (sem irradiação)	23	22c	ND
	21		
Inoculada (sem irradiação)	100	100a	3290d
	100		
Inoculada e Irradiada (kGy)			
0,3	100	100a	4165d
	100		
0,5	100	100a	7956bc
	100		
1,0	90	95a	7659c
	100		
3,0	87	87b	8871b
	87		
5,0	43	38bc	9480ab
	33		
10,0	33	27c	9780a
	21		

ND = Não Detectado.* Média de triplicata.

Valores numéricos seguidos com as mesmas letras minúsculas na vertical não diferem entre si em nível de 5% de significância pelo teste Kruskal-Wallis.

TABELA 9. Teores de aflatoxina B₁ e porcentagem de infecção fúngica em amendoim, cultivar Tatu Vermelho, após inoculação com *Aspergillus flavus* IMI 190443 (10⁶ esporos mL⁻¹), irradiação com ⁶⁰Co e incubação a 25°C durante 7 dias. Safra 202/2003.

Amostra	Infecção (%)		Aflatoxina B ₁ (µg kg ⁻¹)*
	Resultado	Média	
Inoculada (sem irradiação)	100 100	100	1112a
Inoculada e Irradiada (kGy)			
15	2 0	1	946a
20	2 2	2	236a
25	0 0	0	ND
30	0 0	0	ND

ND = Não Detectado.* Média de triplicata.

Valores numéricos seguidos com as mesmas letras minúsculas na vertical, não diferem entre si em nível de 5% de significância pelo teste Kruskal-Wallis.

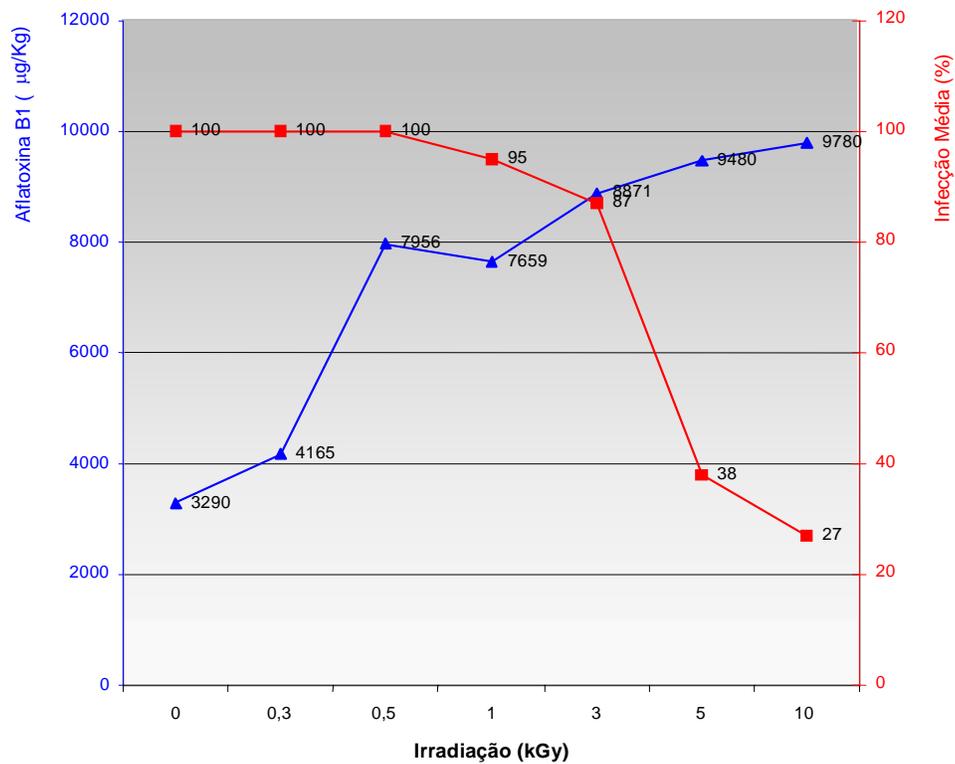


FIGURA 2. Teores de aflatoxina B₁ após irradiação com ⁶⁰Co e inoculação do amendoim cultivar Tatu Vermelho com *Aspergillus.flavus*.IMI 190443.

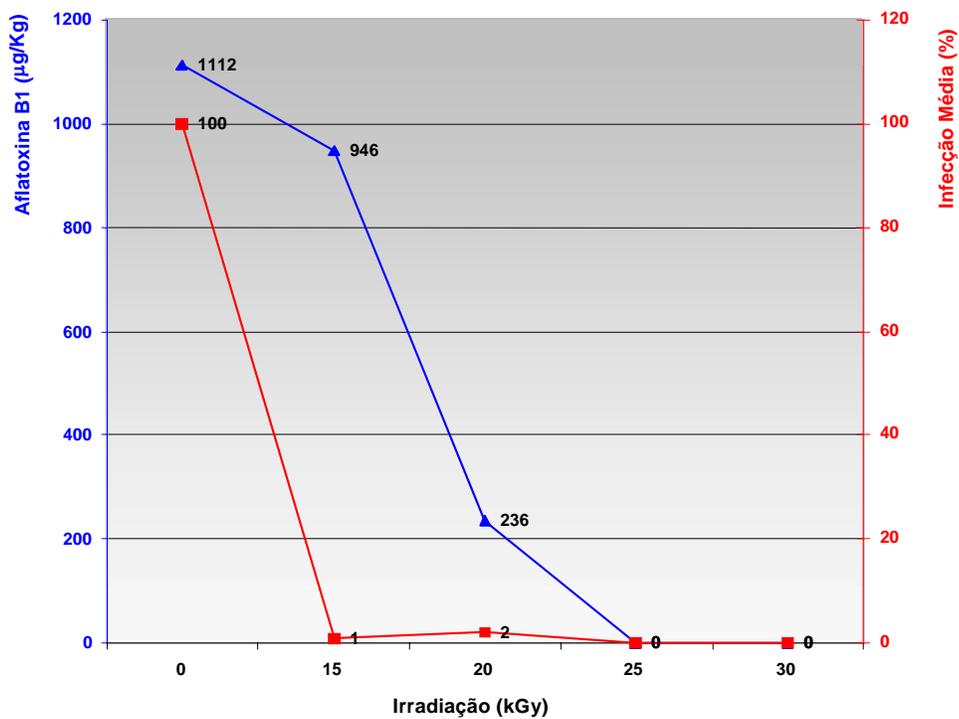


FIGURA 3. Teores de aflatoxina B₁ após irradiação com ⁶⁰Co e inoculação do amendoim cultivar Tatu Vermelho com *Aspergillus flavus* IMI 190443.

A análise estatística referente à porcentagem de infecção após inoculação, irradiação com ^{60}Co em diferentes níveis (0,3 a 10 kGy) e incubação por 7 dias a 25°C, foi feita mediante o teste Kruskal-Wallis, cuja probabilidade foi de 0,046. Comparando esse valor com o nível de significância de 0,05, constata-se que há evidências estatísticas de que as médias das amostras diferiram entre si. Analogamente, a análise estatística dos níveis de aflatoxina B₁ (resposta), revelou, por meio do teste Kruskal-Wallis, probabilidade de 0,026, ou seja, inferior a 0,05. Dessa forma, pelo menos uma dose apresentou-se diferente em relação às demais (tabela 8).

A análise estatística referente aos níveis de aflatoxina B₁ após inoculação, seguido de irradiação em cinco níveis (0, 15, 20, 25 e 30 kGy) e incubação por 7 dias a 25°C, foi feita mediante o teste Kruskal-Wallis. Conforme se pode verificar pela tabela 9, a resposta obtida para os níveis de aflatoxina B₁ foi nula para altas dosagens (25 e 30 kGy). Com base nos valores não nulos obtidos foi determinada a probabilidade ($p=0,061$), superior ao nível de significância estabelecido em 5%. Constatou-se, então, que não há evidências estatísticas de diferença significativa entre as dosagens avaliadas: 0, 15 e 20 kGy.

Observa-se que os níveis de aflatoxina B₁ nas amostras inoculadas e irradiadas com doses de 0,3 a 10,0 kGy, 4165 e 9780 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, foram superiores quando comparados ao nível encontrado na amostra inoculada sem irradiação (3290 $\mu\text{g kg}^{-1}$), atingindo cerca de 300% de aumento com a dose de 10 kGy. Entretanto, em doses de 15,0 a 30,0 kGy, verificou-se redução do teor de aflatoxina B₁ (1112 $\mu\text{g kg}^{-1}$) encontrado na amostra inoculada não irradiada, para valores inferiores ao limite de detecção do método empregado (1 $\mu\text{g kg}^{-1}$), ou seja, não detectado, como nas amostras inoculadas e irradiadas com doses de 25,0 e 30,0 kGy. Nota-se também, em elevadas doses de irradiação, uma correspondência inversa entre níveis de aflatoxina B₁ e infecção fúngica, ou

seja, quanto maior a dose de irradiação menor a viabilidade fúngica e menores níveis de aflatoxina foram produzidos por *Aspergillus flavus* IMI 190443. O aumento dos níveis de aflatoxina B₁ nas amostras irradiadas com doses de 0,3 a 10,0 kGy pode ser explicado pela resistência parcial do *Aspergillus flavus* à irradiação, pela gradativa destruição da microbiota competidora natural e pela maior disponibilidade do substrato ao fungo (Chelack et al., 1991; Hassan & Aziz, 1998). A partir de doses de irradiação mais elevadas, superiores a 15 kGy, cessa a resistência natural e a viabilidade dos esporos fúngicos, diminuindo a produção de aflatoxina B₁.

Chiou et al. (1990) observaram que após inoculação de amendoim *in natura*, variedade Tainam 9, com *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 em concentração não especificada, seguida de irradiação com ⁶⁰Co em doses de 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 15,0 kGy e incubação durante 4 semanas a 30°C, os níveis de aflatoxina B₁ foram menores quando comparados aos do controle não irradiado e inoculado: de 18630 µg kg⁻¹ para 12620 µg kg⁻¹ (5,0 kGy); 7770 µg kg⁻¹ (7,5 kGy); 4280 µg kg⁻¹ (10,0 kGy) e 2570 µg kg⁻¹ (15,0 kGy). Grãos de amendoim com intenso grau de infecção foram também observados. Estes resultados estão parcialmente coerentes com os obtidos nesta pesquisa, visto que completa destruição dos conídios pela irradiação gama, mesmo a 15,0 kGy, não foi alcançada. Por outro lado, diferentemente dos nossos resultados, foi observada uma diminuição da produção de aflatoxina B₁ em função da dose de irradiação gama aplicada. Parece que o tipo da espécie fúngica envolvida (*A.flavus* e *A.parasiticus*), as condições de inoculação e incubação, a umidade e o tamanho do inóculo afetam o crescimento fúngico e a produção de toxina e podem explicar essa diferença na produção de aflatoxina B₁ em função da dose aplicada (Schindler et al., 1980; Aziz et al., 2002). Ainda existe a possibilidade, segundo Doyle & Marth (1978), citados por Farkas (1989), de variação na decomposição da micotoxina por culturas de micélio durante prolongado tempo

de incubação. Neste trabalho, a quantificação da aflatoxina B₁ foi executada após 7 dias de incubação a 25°C, diferentemente do armazenamento a 30°C durante 4 semanas, efetuado por Chiou et al. (1990).

Frag et al. (1995) verificaram também resistência de esporos de *Aspergillus flavus* NRRL 3145, em concentração não especificada, após inoculação em amendoim previamente esterilizado a 121°C durante 15 minutos e irradiação a 5,0, 10,0 e 20,0 kGy. Da mesma forma, a produção de aflatoxina B₁ estava presente mesmo após uma dose de 20,0 kGy.

O processo de irradiação deve ser visualizado como uma opção válida no controle de fungos aflatoxigênicos. Entretanto, caso ocorra recontaminação de amendoim em grão previamente exposto à irradiação, com esporos toxigênicos, em condições adequadas de temperatura e umidade para a viabilidade fúngica, poderá ocorrer produção de aflatoxinas em níveis mais elevados. Dessa forma, a utilização da irradiação gama para reduzir a população natural fúngica deve estar conjugada com as boas práticas de fabricação, como adequada higienização, secagem e armazenamento com baixa umidade relativa, para preservar a segurança e a qualidade do produto.

4 CONCLUSÕES

Irradiação gama (^{60}Co) nas doses de 5 e 10 kGy é efetiva na redução da microbiota fúngica natural de amendoim, cultivar Tatu Vermelho.

Produção de aflatoxina B₁ pelo *Aspergillus flavus* IMI 190443 é maior em concentração mais diluída de esporos (10^3 esporos mL⁻¹).

Contaminação de grãos de amendoim previamente irradiados, com cepa aflatoxigênica, pode aumentar a produção de aflatoxinas.

Irradiação gama (^{60}Co) não é totalmente efetiva para destruir esporos fúngicos, a menos que doses elevadas sejam empregadas (25 e 30 kGy).

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, R.; THARAPPAN, B.; BONGIRWAR, D. R. Impact of gamma irradiation on the monsooning of coffee beans. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 149-157, 2002.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of the AOAC international**. 16. ed. Gaithersburg: AOAC International, 1997.

AWUAH, R. T.; KPODO, K. A. High incidence of *Aspergillus flavus* and aflatoxins in stored groundnut in Ghana and the use of a microbial assay to assess the inhibitory effect of plant extracts on aflatoxin synthesis. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 134, n. 2, p. 109-114, 1996.

AZIZ, N. H.; ABD EL-REHIM, L. M.; EL-FAR, F. M. A. Effect of gamma-irradiation on aflatoxin B₁ produced by *Aspergillus parasiticus* in barley containing antimicrobial food additives. **Egyptian Journal of Radiation Science and Application**, Cairo, v. 12, n. 2, p. 101-116, 1999.

AZIZ, N. H.; ATTIA, E.-S. A.; FARAG, S. A. Effect of gamma-irradiation on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in wheat, flour and bread. **Nahrung**, Cairo, v. 41, n. 1, p. 34-37, 1997.

AZIZ, N. H.; EL-HALFAWY, N. A. Decontamination of toxigenic moulds in stored grains by gamma irradiation. **Isotope Radiation Research**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 41-47, 1991.

AZIZ, N. H.; EL-ZEANY, S. A.; MOUSSA, A. A. Influence of γ -irradiation and maize lipids on the production of aflatoxin B₁ by *Aspergillus flavus*. **Nahrung Food**, Cairo, v. 46, n. 5, p. 327-331, Oct. 2002.

AZIZ, N. H.; MAHROUS, S. R. Effects of gamma irradiation and chemical composition of some crop seeds on aflatoxin B₁ production by *Aspergillus flavus*. **Journal of Agricultural Sciences Mansoura University**, Cairo, v. 28, n. 1, p. 649-661, 2003.

AZIZ, N. H.; MOUSSA, L. A. A. Influence of gamma-irradiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits. **Food Control**, Oxford, v. 13, n. 4/5, p. 281-288, June/July 2002.

AZIZ, N. H.; YOUSSEF, B. M. Inactivation of naturally occurring of mycotoxins in some egyptian foods a and agricultural commodities by gamma irradiation. **Egyptian Journal of Food Science**, Cairo, v. 30, n. 1, p. 167-177, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 21, de 26 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento para irradiação de alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 29 jan. 2001.

CHELACK, W. S.; BORSA, J.; MARQUARDT, R. R.; FROHLICH, A. A. Role of the competitive microbial flora in the radiation-induced enhancement of ochratoxin production by *Aspergillus alutaceus* var. *alutaceus* NRRL 3174. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 9, p. 2492-2496, Sept. 1991.

CHIOU, R. Y. Y.; LIN, C. M.; SHYU, S. L. Property characterization of peanut kernels subjected to gamma irradiation and its effect on the outgrowth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55. n. 1, p. 210-213, Jan./Feb. 1990.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY - CAST. **Mycotoxins: economics and health risks**. Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Tecnology, 2003. Task Force Report 139.

EL-ZAWAHRY, Y. A.; AZIZ, N. H.; EL-FOULY, M. Z. Incidence of toxic and pathogenic microorganisms in different Egyptian and Saudi Arabian food commodities and their decontamination by gamma irradiation. **Egyptian Journal of Microbiology**, Cairo, v. 26, n. 2, p. 267-282, 1991.

FAGUNDES, M. H. Sementes de amendoim: alguns comentários. 2002. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 6 maio 2004.

FARAG, R. S.; RASHED, M. M.; HUSSEIN, A. A.; ABO-HAGAR, A. Effect of gamma irradiation on the infected yellow corn and peanuts by *Aspergillus flavus*. **Chemical Mikrobiology Tecnology Lebensm**, v. 17, n. 3/4, p. 93-98, 1995.

FARKAS, J. Microbiological safety of irradiated foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 9, p. 1-15, 1989.

FONSECA, H.; MARTINELLI, A. F.; DEL NERY, H.; RONCATTO, E. Espécies de *Aspergillus flavus* produtoras de aflatoxinas na região Araraquarense, São Paulo. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz**, Piracicaba, v. 31, p. 519-526, 1974.

GIMENO, A. Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin and penitrem A. **Journal Association Official and Analytical Chemists**, Washington, v. 62, p. 579-585-1979.

GRUPO CONSULTIVO INTERNACIONAL SOBRE IRRADIAÇÃO DE ALIMENTOS - GCIIA. **Fatos sobre a irradiação de alimentos**. Ed. CDTN. (Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear), Brasil, 1999. 46 p.

HASSAN, A. A.; AZIZ, N. H. Influence of moisture content and storage temperature on the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus* EA-81 in maize after exposure to gamma radiation. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v. 18, n. 3, p. 159-171, Oct. 1998.

ISMAIL, M. A. Deterioration and spoilage of peanuts and desiccated coconuts from two sub-Saharan tropical East African Countries due to the associated mycobiota and their degradative enzymes. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 150, n. 2, p. 67-84, 2001.

KARUNARATNE, A.; BULLERMAN, L. B. Interactive effects of spore load and temperature on aflatoxin production. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 53, n. 3, p. 227-229, 1990.

MOSS, M. O. Mycotoxins. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, p. 513-523, 1996.

ODAMTTEN, G. T.; APPIAH, V.; LANGERAK, D. I. Influence of inoculum size of *Aspergillus flavus* Link on the production of aflatoxin B₁ in maize medium before and after exposure to combination treatment of heat and gamma radiation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 4, p. 119-127, 1987.

PEPELJNJAK, S.; SLOBODNJAK, Z.; SEGVIC, M.; PERAICA, M.; PAVLOVIC, M. The ability of fungal isolates from human lung aspergilloma to produce mycotoxins. **Human Experimental Toxicology**, London, v. 23, n. 1, p. 15-19, Jan. 2004.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Methods for isolation, enumeration and identification. In: **Fungi and food spoilage**. 2. ed. Gaithersburg: Aspen, 1999. p. 21-57.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D.; MISCAMBLE, B. F.; DHARMAPUTRA, O. S.; KUSWANTO, K. R.; RAHAYU, E.S. The mycoflora of food commodities from Indonesia. **Journal of Food Mycology**, North Ryde, v.1, n.1, p. 41-60, 1998.

PRADO, G.; GODOY, I. J.; OLIVEIRA, M. S.; GAZZINELLI-MADEIRA, J. E.; JUNQUEIRA, R. G.; FERREIRA, S. O. Teste preliminar de resistência de dois genótipos de amendoim 2117 e Tatu Vermelho, com relação à produção de aflatoxina B₁ por uma espécie toxigênica de *Aspergillus flavus*. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 56, n. 2, p. 71-74, jul./dez. 1996b.

PRIYADARSHINI, E.; TULPULÉ, P. G. Effect of graded doses of γ -irradiation on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in wheat. **Food Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 505-507, 1979.

RODRIGUES JORGE, M.; GARZÓN, E. S. Control mediante radiaciones gamma de flora fungica presente en alimentos de consumo humano y animal. **Alimentaria**, Madrid, v. 95, p. 115-117, 1993.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: The last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 1-14, 2002.

SABINO, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Mycotoxin research in Brazil. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 45, n. 6, p. 359-371, Nov./Dec. 1993.

SAMPAIO, M. B. I. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221 p.

SAS INSTITUTE. **Users guide**: statistics. 1989-1996. Version 6.11. System for Windows. Edition. Cary North Carolina, 1996.

SCHINDLER, A. F.; ABADIE, A. N.; SIMPSON, R. E. Enhanced aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* after gamma irradiation of the spore inoculum. **Journal of Food Protection**, v. 43, n. 1, p. 7-9, Jan. 1980.

SHAHIN, A. A. M.; AZIZ, N. H.; Influence of gamma rays and sodium chloride on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. **Microbios**, Cambridge, v. 90, n. 364/365, p.163-175, 1997.

SHARMA, A.; PADWAL-DESAI, S. R.; NAIR, P. M. Aflatoxin-producing ability of spores of *Aspergillus parasiticus* exposed to gamma radiation. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 1, p. 275-276, Jan./Feb. 1990.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. **Fungos em alimentos: ocorrência e detecção**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2001. 82 p.

VAAMONDE, G.; PATRIARCA, A.; FERNANDEZ PINTO, V.; COMERIO, R.; DEGROSSI, C. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *flavi* from different substrates in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 88, n. 1, p. 79-84, Nov. 2003.

VALENTE SOARES, L. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxins A, zearalenone, and sterigmatocystin in some brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal Association Official and Analytical Chemists**, Washington, v. 72, n. 1, p. 22-25, 1989.

WILD, C. P.; HALL, A. J. Primary prevention of hepatocellular in developing countries. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 462, p. 381-393, 2000.

CAPÍTULO 4

EFEITO DA IRRADIAÇÃO GAMA (^{60}Co) NA FREQUÊNCIA FÚNGICA DE AMENDOIM *in natura* EM FUNÇÃO DO TEMPO DE PRATELEIRA

RESUMO

PRADO, G. Efeito da irradiação gama (^{60}Co) na frequência fúngica de amendoim *in natura* em função do tempo de prateleira. In: _____. **Influência da irradiação gama (^{60}Co) na microbiota fúngica e na aflatoxina B₁ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.)**. 2005. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, Minas Gerais, Brazil.

Foi verificado o efeito da irradiação gama (^{60}Co) na capacidade de destruir a microbiota fúngica, em amendoim em grão, cultivar Tatu Vermelho, da safra 2003 (segundo semestre). Os grãos de amendoim, após a irradiação, foram mantidos à temperatura ambiente em embalagem plástica comercial, durante 180 dias. Para a determinação da porcentagem fúngica foi utilizada a técnica do plaqueamento direto utilizando o meio Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), desinfetando ou não os grãos com solução de hipoclorito de sódio. Em grãos de amendoim irradiados e desinfetados externamente, observou-se redução da infecção fúngica a 5 kGy e destruição total de fungos a 10 kGy, após 180 dias de armazenamento à temperatura ambiente. Em grãos irradiados e não desinfetados externamente foram verificados, em função do tempo de armazenamento, aumento da população de fungos com a dose de 1 kGy, redução com a dose de 5 kGy e eliminação total com a aplicação de 10 kGy. A irradiação gama, na dose de 10 kGy ou superior, demonstrou ser um processo eficaz na redução da microbiota fúngica de amendoim em grão, cultivar Tatu Vermelho.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA

ABSTRACT

PRADO, Guilherme. Gamma-irradiation effect (^{60}Co) in fungi frequency of peanuts in natura and after storage. In: _____. **Gamma-irradiation influence on mycoflora and on aflatoxin B₁ in peanut** (*Arachis hypogaea* L.). 2005. Thesis (Doctorate in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

Gamma-irradiation effect was verified in order to destroy the mycoflora of peanuts grain, cultivar Tatu Vermelho, 2003 crop (second semester). The peanuts grains, after irradiation, were kept at room temperature, in plastic bags, during 180 days. To determine the percentage of fungi, the direct plating technique was used and the grains were plated out on mycological media dicholoran rose bengal chloranphenicol (DRBC), disinfected or not with sodium hypochlorite solution. Irradiated and disinfected peanuts was observed a reduction of fungi infection at 5 kGy and total fungi destruction at 10 kGy, after 180 days in storage at room temperature. Irradiated and non disinfected grains showed a increase of fungi population with 1 kGy dose, reduction with 5 kGy dose and total destruction with 10 kGy dose. Gamma-irradiation, in 10 kGy dose or higher, showed to be an efficient process to reduce the mycoflora of peanuts, cultivar Tatu Vermelho.

Adviser: Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA

1 INTRODUÇÃO

Os fungos estão amplamente distribuídos no solo, plantas, matéria orgânica em decomposição, água, ar e poeira. Conseqüentemente, produtos não processados de origem animal e vegetal podem tornar-se contaminados com uma ampla variedade de espécies fúngicas dessas fontes. Sob condições favoráveis, os fungos podem crescer em diferentes tipos de alimentos (cereais, carne, leite, frutas, vegetais e grãos) e causar deterioração (Beuchat, 1992; Filtenborg et al., 1996).

Os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor* são encontrados principalmente em armazéns, depósitos e silos, (Ismail, 2000; Miller, 1995; Sinha & Sinha, 1991). Segundo Bueno et al. (2004) pode ser identificado um terceiro grupo durante o armazenamento de cereais como os fungos de deterioração avançada (*Papulospora*, *Sordaria*, *Fusarium graminearum* e membros da ordem *Mucorales*), que podem estar misturados com os outros gêneros citados anteriormente. Contudo, a fonte original dos fungos nas circunstâncias descritas é o campo (Miller, 1995).

Somente nos últimos 30 anos tornou-se claro que o crescimento de fungos em alimentos e rações pode produzir toxinas, conhecidas como micotoxinas, as quais são definidas como metabólitos secundários, ou seja, não apresentam nenhuma função no metabolismo normal que envolve o desenvolvimento dos fungos. São compostos de baixo peso molecular, produzidos no final da fase log de crescimento e que provocam resposta tóxica em vertebrados e outros animais quando ingeridos em baixa concentração (Pitt, 2000).

Muitos fungos capazes de produzir micotoxinas são também freqüentes contaminantes de alimentos e produtos agrícolas. Os fungos micotoxigênicos associados com a cadeia alimentar abrangem basicamente três gêneros:

Aspergillus, *Penicillium* e *Fusarium* (Pitt et al., 2000). Os fungos pertencentes aos dois primeiros gêneros são comumente encontrados como contaminantes de alimentos durante a secagem e armazenamento, enquanto o último é descrito como patógeno de plantas que produzem micotoxinas antes ou imediatamente após a colheita (Sweeney & Dobson, 1999).

O processo de prevenção e controle das micotoxinas, após mais de 40 anos da sua descoberta, ainda não apresentou um modelo seguro, eficaz e de solução definitiva. A técnica de radiação ionizante é um processo físico que está sendo utilizado atualmente com o objetivo de aumentar a vida de prateleira e aprimorar a segurança dos alimentos pela desinfestação de grãos, especiarias, vegetais e frutas secas; inibição de brotamento de bulbos; destruição de parasitas em carnes vermelhas e retardo na maturação de frutas e vegetais, sem alterar a temperatura natural do produto (CAST, 2003)

Três são as fontes utilizadas em unidades de radiação: (1) raios gama produzidos por fontes de ^{60}Co e ^{137}Cs ; (2) raios-x gerados por máquinas operadas com energia máxima de 5 milhões de elétrons-volt (Mev); e (3) feixes de elétrons produzidos por aceleradores de elétrons com energia máxima de 10 Mev (Diehl & Josephson, 1994).

Algumas investigações descritas na literatura mundial destacam a eficiência da irradiação gama no controle de espécies fúngicas de *Aspergillus* e *Penicillium* em diferentes alimentos (Rodriguez Jorge & Garzón, 1993; Aziz et al., 1999; Aziz & Mahrous, 2003). Entretanto, não foi ainda relatado o efeito da irradiação gama na capacidade de redução da porcentagem fúngica natural do amendoim, cultivar Tatu Vermelho, plantado no Brasil, em função da dose aplicada e do tempo de armazenamento.

No Brasil, a legislação que trata do emprego da irradiação em alimentos é a Resolução RDC N.º 21, de 26 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (Brasil, 2001). As doses a serem

aplicadas devem ser compatíveis com os efeitos desejados, não tendo a legislação fixado valores mínimos ou máximos.

O objetivo do trabalho foi verificar o efeito da irradiação gama (^{60}Co), em diferentes níveis, na porcentagem de infecção fúngica de amendoim *in natura*, variedade Tatu Vermelho, com e sem o processo de desinfecção dos grãos, em função do tempo de prateleira.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Foram utilizadas amostras de amendoim em grão *in natura* (18 kg) enviadas pela Santa Helena Indústria de Alimentos S. A. (Ribeirão Preto - São Paulo), variedade Tatu Vermelho, da safra do segundo semestre de 2002/2003, isentas de aflatoxinas.

2.2 Preparo das amostras para o processo de irradiação

Experimento 1: As amostras, em duplicata, foram acondicionadas em sacos plásticos, contendo cerca de 500 g cada, reproduzindo a embalagem comercial exposta no comércio.

Experimento 2: As amostras, em triplicata, foram acondicionadas em sacos plásticos contendo cerca de 500 g cada, como no experimento 1.

Todo esse procedimento foi executado em capela de fluxo laminar.

2.3 Meio de cultivo

Foi utilizado o meio de cultura Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC/Difco), conforme recomendado por King et al. (1979) e Pitt & Hocking (1999).

2.4 Isolamento e determinação fúngica

A quantificação da infecção fúngica foi efetuada utilizando a técnica do plaqueamento direto, segundo Pitt & Hocking (1999), considerada por Ismail (2000) a técnica adequada para isolamento de fungos em amendoim em grão.

Os grãos de amendoim de cada uma das amostras do experimento 1 foram desinfetados externamente, por imersão, em uma solução de hipoclorito

de sódio a 0,4%, por 2 minutos. Posteriormente, de cada uma das duas amostras irradiadas, por dose de irradiação aplicada, distribuíram-se, em duplicata, 5 grãos/placa, em um total de 10 placas (50 grãos) contendo o meio de cultivo DRBC (item 2.3), preparado como sugerido por Taniwaki & Silva (2001). Foram utilizados, portanto, 200 grãos de cada amostra por nível de irradiação. Seguiu-se incubação a 25°C durante 5 dias, e então foi observado o crescimento visual fúngico. Os resultados foram expressos em porcentagem de infecção interna após 0, 20, 60 e 180 dias de acondicionamento à temperatura ambiente.

As amostras irradiadas do experimento 2 (em triplicata), não sofreram o processo de desinfecção e foram distribuídas, da mesma forma, utilizando 5 grãos/placa, em um total de 10 placas (50 grãos) contendo o meio DRBC. Foram utilizados, portanto, 150 grãos de cada amostra por nível de irradiação. Seguiu-se incubação a 25°C durante 5 dias, e então foi observado o crescimento visual fúngico. Os resultados foram expressos em porcentagem de infecção após 0, 60 e 180 dias de acondicionamento à temperatura ambiente.

2.5 Procedimento de irradiação e acondicionamento posterior das amostras

O processo de irradiação foi executado no Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - CDTN/MG. A taxa de dose utilizada foi por volta de 6,0 kGy h⁻¹ e o irradiador com uma fonte de ⁶⁰Co é de tecnologia da Nordion Canadian.

Para o experimento 1 foram utilizadas as doses de irradiação gama de 0, 1, 5 e 10 kGy. Imediatamente após o processo de irradiação foi efetuada a determinação da porcentagem fúngica (item 2.4), representando o tempo (dias) 0. As embalagens que continham o restante das amostras foram devidamente fechadas e deixadas à temperatura ambiente durante 20, 60 e 180 dias, quando novamente foi efetuada a determinação da infecção fúngica.

Para o experimento 2 foram utilizadas as doses de 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 kGy. Após o processo de irradiação, foi efetuada também a determinação da porcentagem fúngica (item 2.4), representando o tempo (dias) 0. As embalagens que continham o restante das amostras, foram devidamente fechadas, e deixadas à temperatura ambiente durante 60 e 180 dias, quando novamente foi efetuada a determinação da infecção fúngica.

2.6 Delineamento experimental e análise estatística

No experimento que envolveu desinfecção externa com hipoclorito (item 2.5) a análise estatística foi feita por meio de um delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial, cujos fatores foram doses (0, 1, 5 e 10 kGy) e tempo (0, 20, 60 e 180 dias). Os dados foram submetidos à análise de variância para verificar a presença de efeitos significativos e, nestes casos, foi aplicado o teste de Tukey para determinar as diferenças entre as médias, em nível de 5% de significância. Foram utilizados os recursos do software estatístico SAS (SAS, 1996; Sampaio, 1998).

Em relação à variável porcentagem de infecção sem desinfecção externa (item 2.5), foi utilizada a técnica exploratória de dados, mais especificamente os gráficos “Box-Plot” (Bussab & Morettin, 2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se pela tabela 1 que a irradiação gama reduziu a contaminação fúngica em amendoim, previamente desinfetado, nas três doses utilizadas e durante todo o intervalo de tempo do experimento. Na dose de 10 kGy não foi observado crescimento fúngico, mesmo após 6 meses de armazenamento à temperatura ambiente. Observou-se que nos tempos iniciais (0 e 20 dias), as médias de infecção em 0 e 1 kGy foram semelhantes. Para os maiores tempos (60 e 180 dias) isso não foi observado. As figuras 5 e 6, em Anexos, página 185, ilustram estes resultados.

Chiou et al. (1990) verificando o grau de infecção fúngica natural em grãos de amendoim, após irradiação com ^{60}Co em doses de 0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 15,0 kGy, observaram que a 2,5 kGy, 45% das sementes ainda apresentavam fungos viáveis, mostrando crescimento após 3 dias de incubação a 30°C, em meio de Ágar Dextrose Batata. Os fungos foram completamente eliminados em dose igual ou maior a 5,0 kGy. Constatou-se também que amendoim (100 g) mantido durante 2 meses em sacos plásticos, em ambiente úmido, após irradiação, não mostrou crescimento visível com doses de irradiação de 10 e 15 kGy.

TABELA 1. Porcentagem de infecção fúngica em amendoim *in natura*, previamente irradiado (^{60}Co) e externamente desinfectado, seguido de armazenamento à temperatura ambiente por diferentes períodos de tempo.

Irradiação Gama (kGy)	Tempo (dias)			
	0	20	60	180
	% Infecção ¹			
0	24 ^a	16a	17a	15a
1	21 ^a	12a	7b	6b
5	6b	8b	5b	3b
10	0	0	0	0

¹ Os valores numéricos representam a média de 4 repetições. Médias seguidas de mesma letra minúscula na vertical não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os resumos das análises estatísticas referentes à tabela 1 são mostrados nas tabelas 2 e 3. O valor correspondente a 10 kGy (0%) não foi incluído.

TABELA 2 – Análise de variância para a resposta porcentagem de infecção.

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
DOSES	2	650.2500	51.336	0.0000
TEMPO	3	193.4444	15.272	0.0000
DOSES*TEMPO	6	44.6944	3.529	0.0075
ERRO	36	12.6666		
TOTAL	47			

Coefficiente de variação (%) = 31,6

Considerando o nível de significância fixado em 5% e analisando os resultados mostrados na tabela 2, pode-se verificar que os efeitos principais, doses de irradiação gama e tempo foram significativos, isto é, seus respectivos níveis apresentaram pelo menos uma média diferente das demais. Em relação à interação doses*tempo, observou-se resultado significativo ($p < 0,05$). Assim sendo, constatou-se dependência entre os fatores avaliados. Portanto, tornou-se necessária melhor investigação por meio do desdobramento das doses em função do tempo, cujos resultados estão na tabela 3.

TABELA 3 – Análise de variância dos níveis de doses de irradiação gama fixado o tempo.

FV	GL	QM	Pr>Fc
DOSES /0	2	380.3333	0.0000
DOSES /20	2	72.3333	0.0067
DOSES /60	2	185.3333	0.0000
DOSES/180	2	146.3333	0.0001
RESÍDUO	36	12.6667	

Constatou-se que o efeito dose para todos os tempos avaliados apresentou pelo menos uma média diferente das demais para nível de significância de 5%. A identificação dessas diferenças foi registrada pelo teste de Tukey, conforme mostrado na tabela 1.

Considerando que a indústria de alimentos, caso venha futuramente a utilizar a irradiação gama como uma alternativa no processo de conservação e garantia de qualidade de grãos, provavelmente não irá realizar o processo de desinfecção após a irradiação, os dados da tabela 4 refletem melhor a realidade.

TABELA 4. Porcentagem de infecção fúngica em amendoim *in natura*, previamente irradiado (^{60}Co) e sem desinfecção, seguido de armazenamento à temperatura ambiente por diferentes períodos de tempo.

Irradiação (kGy)	Tempo (dias)		
	0	60	180
	% Infecção ¹		
0	82,0	90,7	100,0
1	59,1	64,0	75,3
5	17,3	7,3	4,0
10	0	0	0
15	0	0	0
20	0	0	0
25	0	0	0
30	0	0	0

1 - Valores numéricos representam média de 3 repetições

Observa-se que a porcentagem de infecção fúngica nas amostras de amendoim em grão, não irradiadas e sem desinfecção, aumentou de 82% para 90,7% e para 100%, no tempo de 0, 60 e 180 dias, respectivamente. Resultados idênticos foram obtidos por Bhattacharya & Raha (2002) na Índia, após observarem durante um ano, em um armazém da cidade de Santinikihan, a microbiota fúngica de amendoim em grão. O grau inicial de infecção fúngica foi de 70%, atingindo 100% no final do experimento.

Para um melhor entendimento dos resultados obtidos foi executada análise exploratória da porcentagem de infecção através dos gráficos denominados por “Box-Plot”. As médias são representadas por pontos vermelhos e a variabilidade dos resultados, pela amplitude de cada caixa. O valor nulo corresponde a um traço. Em doses inferiores a 10 kGy notaram-se

respostas diferenciadas, ocasionando uma variabilidade que é demonstrada pelas amplitudes de cada caixa (Figuras 1, 2 e 3).

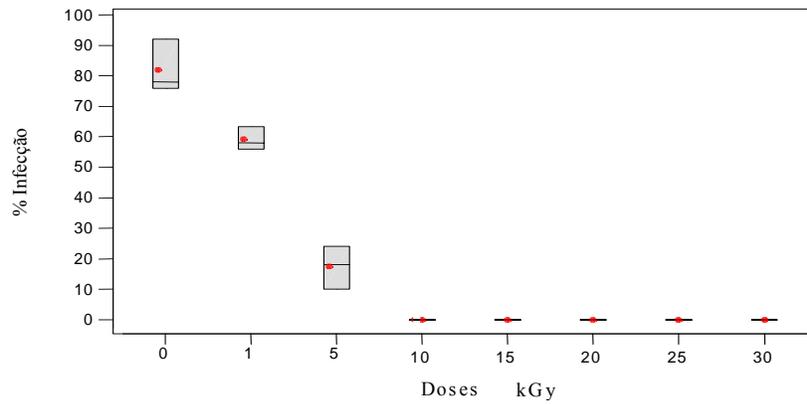


FIGURA 1 – Box-Plot para as doses de irradiação fixado o tempo 0 (dias) – início do experimento.

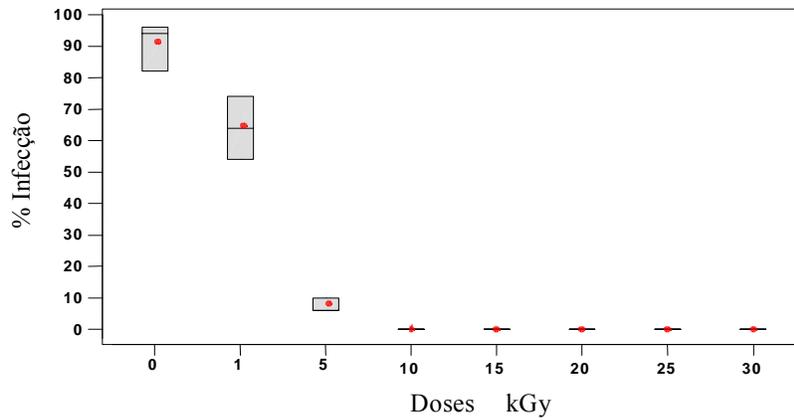


FIGURA 2 – Box-Plot para as doses de irradiação fixado o tempo 60 (dias).

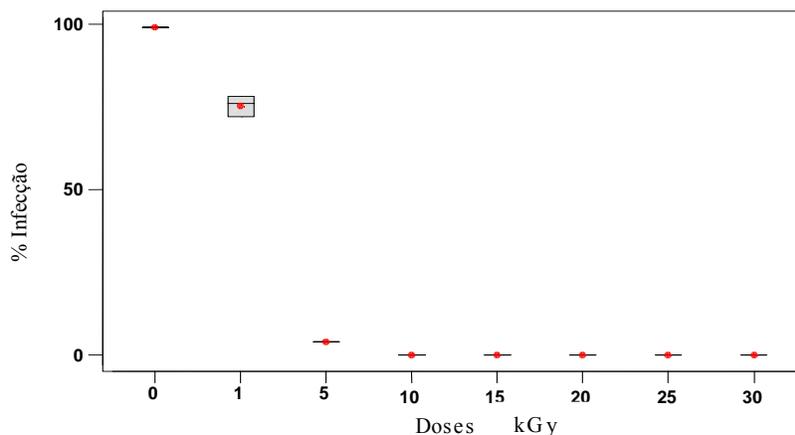


FIGURA 3 – Box-Plot para as doses de irradiação fixado o tempo 180 (dias).

Foi observado aumento da infecção fúngica depois de 60 e 180 dias, quando as amostras foram irradiadas com 1 kGy e não foram desinfetadas com hipoclorito. A partir de 5 kGy, os níveis de infecção fúngica apresentaram valores inferiores após o tempo inicial de armazenamento, indicando que a partir dessa dose, mesmo que não tenha ocorrido morte dos fungos, foi observada uma injúria que afetou o desenvolvimento. Nota-se também que, com a irradiação com ^{60}Co em doses de 10, 15, 20, 25 e 30 kGy os níveis de infestação foram reduzidos para 0%, tanto no início da estocagem como depois de 6 meses de permanência à temperatura ambiente. Aziz & Youssef (2002) observaram que com uma irradiação de 5 kGy (^{60}Co) os fungos em amendoim em grão eram completamente destruídos. A contagem inicial de $8,2 \times 10^4$ UFC/g foi reduzida para <10 UFC/g. Apesar de os resultados das técnicas de plaqueamento direto (% de infecção) e Contagem Total de Fungos e Leveduras (UFC/g) não apresentarem uma correlação (Pitt & Hocking, 1999), pode-se afirmar que a

irradiação gama é uma boa alternativa para o controle de fungos em amendoim em grão, quando uma dose de 5 kGy ou maior for aplicada.

Observa-se que a porcentagem de infecção fúngica inicial dos grãos de amendoim, sem desinfecção com hipoclorito, atingiu 82%, enquanto 24% dos grãos estavam contaminados inicialmente com fungos após o processo de desinfecção. Este valor representa, na realidade, a porcentagem de fungos que efetivamente invadiram os grãos.

Aziz et al. (1994) analisando amostras de grãos de amendoim comercializadas no Cairo (Egito), observaram crescimento fúngico em 75% das sementes desinfetadas superficialmente, enquanto detectou-se crescimento de fungos em 85% das sementes não desinfetadas. Em amostras de amendoim coletadas em diferentes supermercados de dois países tropicais da África (Uganda e Kênia), foram registrados 69% e 74%, respectivamente, de infestação com fungos após descontaminação com hipoclorito (Ismail, 2000). A afirmativa de que as variações encontradas nos resultados de porcentagem fúngica das amostras podem ser devidas a diferentes meios de cultivo utilizados não apresenta fundamento. Taniwaki et al. (2001) verificaram, em amendoim e em outros 13 diferentes tipos de alimentos, que os meios Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), Ágar Dicloran Glicerol 18% (DG18) e Ágar Dextrose Batata, os meios de cultura mais utilizados neste tipo de análise, apresentaram um coeficiente de correlação, para recuperação de contagem total de fungos, na faixa de 0,9903 e 0,9781.

4 CONCLUSÕES

Irradiação gama (^{60}Co) na dose de 5 kGy é capaz de reduzir a porcentagem fúngica de amendoim em grão, após 20, 60 e 180 dias à temperatura ambiente, quando comparada à contaminação inicial e independentemente da utilização do processo de desinfecção.

Irradiação gama (^{60}Co) na dose de 10 kGy ou superior é capaz de reduzir totalmente a contaminação fúngica (0%) de amendoim em grão, por 6 meses, à temperatura ambiente, independentemente do processo prévio de desinfecção.

Amendoim em grão não irradiado e não desinfetado externamente, proporcionou aumento do grau de infecção fúngica durante o período de armazenamento.

Irradiação gama (^{60}Co) na dose de 1 kGy, em amendoim em grão, não desinfetado superficialmente, produziu aumento do grau de infecção fúngica com o aumento do tempo de armazenamento.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZIZ, N. H.; ABDEL EL-AAL, S. S.; HEGAZIE, S. M. Peanut (*Arachis hypogaea* L.) as a substrate for growth and aflatoxin production by aflatoxigenic strains of *Aspergillus spp.* Under some environmental conditions. **Al-Azhar Journal of Microbiology**, Cairo, v. 26, n. 1, p. 51-59, 1994.

AZIZ, N. H.; EL-ZEANY, S. A.; MOUSSA, A. A. Influence of γ -irradiation and maize lipids on the production of aflatoxin B₁ by *Aspergillus flavus*. **Nahrung Food**, Cairo, v. 46, n. 5, p. 327-331, Oct. 2002.

AZIZ, N. H.; MAHROUS, S. R. Effects of gamma irradiation and chemical composition of some crop seeds on aflatoxin B₁ production by *Aspergillus flavus*. **Journal of Agricultural Sciences Mansoura University**, Cairo, v. 28, n. 1, p. 649-661, 2003.

AZIZ, N. H.; YOUSSEF, B. M. Inactivation of naturally occurring of mycotoxins in some egyptian foods and agricultural commodities by gamma irradiation. **Egyptian Journal of Food Science**, Cairo, v. 30, n. 1, p. 167-177, 2002.

BEUCHAT, L. R. Media for detecting and enumerating yeasts and moulds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 145-158, Oct. 1992.

BHATTACHARYA, K.; RAHA, S. Deteriorative changes of maize, groundnut and soybean seeds by fungi in storage. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 155, n. 3, p. 135-141, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 21, de 26 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento para irradiação de alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 29 jan. 2001.

BUENO, D. J.; SILVA, J. O.; OLIVER, G. Fungal isolation and enumeration in foods. **Methods in Molecular Biological**, Oxford, v. 268, p. 127-132, 2004.

BUSSAB, W. O.; MORETTIN, P. A. **Estatística básica**. 5. ed. São Paulo: Atual, 2003. 205 p.

CHIOU, R. Y. Y.; LIN, C. M.; SHYU, S. L. Property characterization of peanut kernels subjected to gamma irradiation and its effect on the outgrowth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55. n. 1, p. 210-213, Jan./Feb. 1990.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY - CAST. **Mycotoxins: economics and health risks**. Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Tecnology, 2003. Task Force Report 139.

DIEHL, J. F.; JOSEPHSON, E. S. Assessment of wholesomeness of irradiated foods. **Acta Alimentaria**, Dudapeste, v. 23, n. 2, p. 195-214, June 1994.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C.; THRANE, U. Moulds in food spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 85-102, Nov. 1996.

ISMAIL, M. A. Deterioration and spoilage of peanuts and desiccated coconuts from two sub-Saharan tropical East African Countries due to the associated mycobiota and their degradative enzymes. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 150, n. 2, p. 67-84, 2001.

KING, A. D.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Dichloran-Rose Bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 959-964, 1979.

MILLER, J. D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research**, Elmsford, v. 31, n. 1, p. 1-16, Jan. 1995.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important? **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, p. 17-22, 2000. Supplement 1.

PITT, J. I.; BASÍLICO, J. C.; ABARCA, M. L.; LÓPEZ, C. Mycotoxins and toxigenic fungi. **Medical Mycology**, Oxford, v.38, Supplement I, p. 41-46, 2000.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Methods for isolation, enumeration and identification. In: **Fungi and food spoilage**. 2. ed. Gaithersburg: Aspen, 1999. p. 21-57.

RODRIGUES JORGE, M.; GARZÓN, E. S. Control mediante radiaciones gamma de flora fungica presente en alimentos de consumo humano y animal. **Alimentaria**, Madrid, v. 95, p. 115-117, 1993.

SAMPAIO, M. B. I. **Estatística aplicada à experimentação animal** . Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221 p.

SAS INSTITUTE. **Users guide**: statistics. 1989-1996. Version 6.11. System for Windows. Edition. Cary North Carolina, 1996.

SINHA, K. K.; SINHA, A. K. Effect of *Sitophilus oryzae* infestation on *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination in stored wheat. **Journal of Stored Products Research**, Elmsford, v. 27, n. 1, p. 65-68, Jan. 1991.

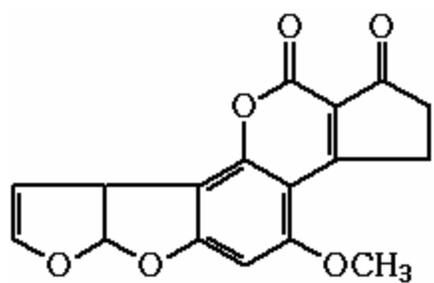
SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 175, n. 2, p. 149-163, June 1999.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. **Fungos em alimentos: ocorrência e detecção**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2001. 82 p.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N.; BANHÉ, A. A.; IAMANAKA, B. T. Comparison of culture media, simplate, and petrifilm for enumeration of yeasts and molds in food. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 10, p. 1592-1596, 2001.

ANEXOS

	Página
FIGURA 1 Estrutura química da aflatoxina B ₁	182
FIGURA 2 Fonte de cobalto 60.....	183
FIGURA 3 Área de irradiação com fonte de cobalto 60.....	183
FIGURA 4 Irradiador do Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear.....	184
FIGURA 5 Amendoim em grão sem irradiação e irradiado com 1 kGy.....	185
FIGURA 6 Amendoim em grão irradiado com 5 e 10 kGy.....	185
FIGURA 7 Separação e identificação das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ por cromatografia em camada delgada.....	186
FIGURA 8 Quantificação da aflatoxina B ₁ por densitometria.....	186



AFLATOXINA B₁

FIGURA 1. Estrutura química da aflatoxina B₁.

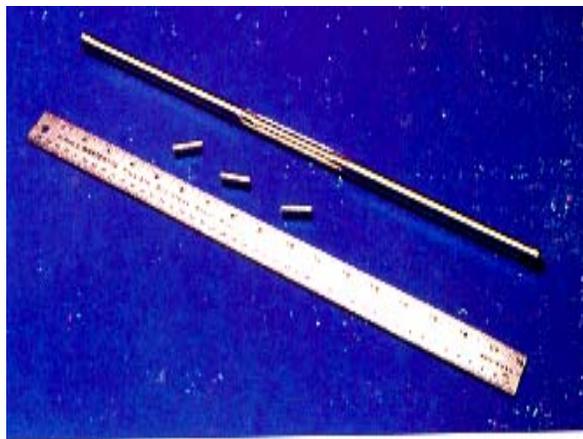


FIGURA 2. Fonte de cobalto 60 duplamente encapsulada em aço inoxidável.

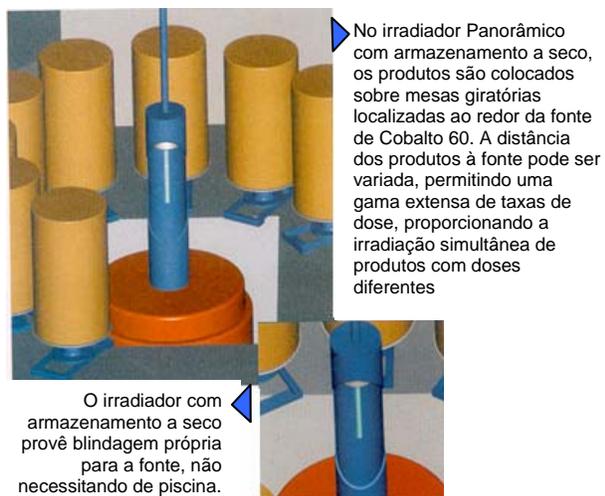


FIGURA 3. Irradiador apresentando mesas giratórias localizadas ao redor da fonte de cobalto 60. (Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear – CDTN - BH/MG).



FIGURA 4. Irradiador do Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear – CDTN - BH/MG.

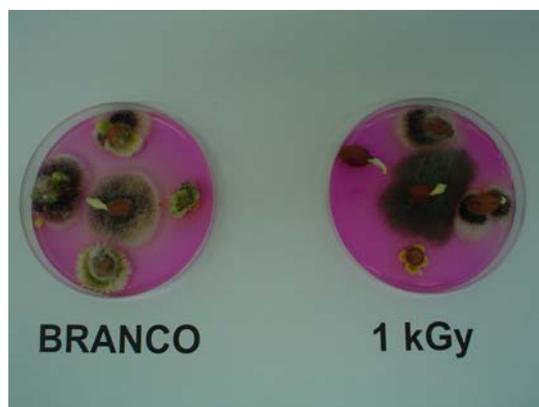


FIGURA 5. Amendoim em grão sem irradiação (branco) e após irradiação com ^{60}Co (1 kGy), seguido de desinfecção e cultivo em meio de Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) e incubação por 5 dias a 25 °C.

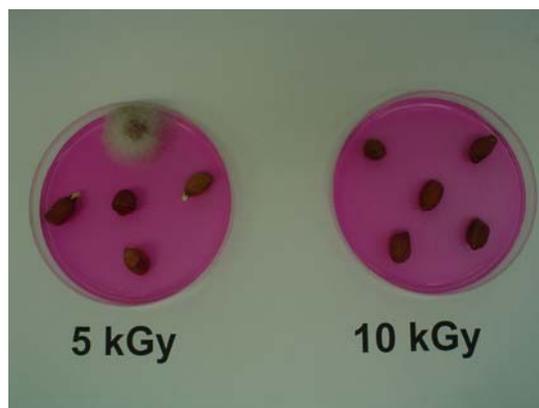


FIGURA 6. Amendoim em grão irradiado com ^{60}Co (5 e 10 kGy), seguido de desinfecção e cultivo em meio de Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) e incubação por 5 dias a 25 °C.

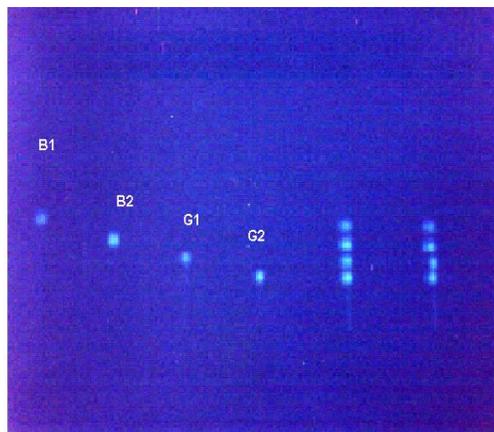


FIGURA 7. Separação e identificação das aflatoxinas B1, B2, G1, G2 por cromatografia em camada delgada.

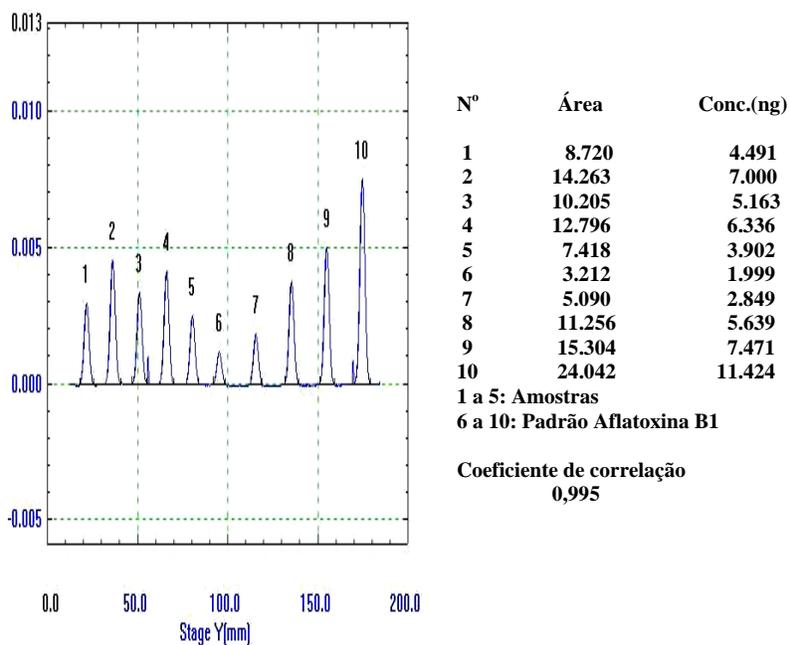


FIGURA 8. Quantificação da aflatoxina B1 comparando as áreas das soluções dos extratos das amostras (1 a 5) e da curva padrão (6 a 10) por densitometria.