

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

Influência da radiação gama sobre a microbiota natural de ração avícola e seu efeito sobre a morfologia, fisiologia e genética de cepas de referência de *Aspergillus* spp.

Jéssika Mara Martins Ribeiro

2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO GAMA SOBRE A MICROBIOTA
NATURAL DE RAÇÃO AVÍCOLA E SEU EFEITO SOBRE A
MORFOLOGIA, FISIOLOGIA E GENÉTICA DE CEPAS DE
REFERÊNCIA DE *ASPERGILLUS* SPP.**

JÉSSIKA MARA MARTINS RIBEIRO

Sob a Orientação do Professor
Carlos Alberto da Rocha Rosa

e Co-orientação da Professora
Glória Maria Direito

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal

Seropédica, RJ
Junho de 2008

598.2

R484i Ribeiro, Jéssika Mara Martins, 1977-

T

Influência da radiação gama sobre a micobiota natural de ração avícola e seu efeito sobre a morfologia, fisiologia e genética de cepas de referência de *Aspergillus* ssp. / Jéssika Mara Martins Ribeiro - 2008.

81f. : il.

Orientador: Carlos Alberto da Rocha Rosa.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 55-67.

1. Ave - Alimentação e rações - Efeito da irradiação - Teses. 2. Rações - Efeito da radiação - Teses. 3. Rações - Microbiologia - Teses. 4. *Aspergillus* - Teses. I. Rosa, Carlos Alberto da Rocha , 1953- . II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

JÉSSIKA MARA MARTINS RIBEIRO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

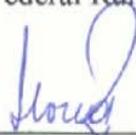
TESE APROVADA EM 24/06/2008



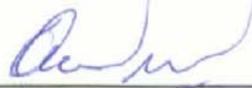
Carlos Alberto da Rocha Rosa Ph.D., L.D.
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



Glória Maria Direito Ds.
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



Lilia Renée Cavaglieri DSc.
Universidad Nacional de Rio Cuarto, Argentina



Ana Maria Dalcero DSc.
Universidad Nacional de Rio Cuarto, Argentina



Helio de Carvalho Vital Ph.D.
Centro Tecnológico do Exército

*Dedico este trabalho aos meus pais Péricles Ferreira
Martins Ribeiro (in memoriam) e Raquel Carvalho
Martins Ribeiro, pessoas de visão que sempre
estimularam a busca pelo conhecimento.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Carlos Alberto da Rocha Rosa do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária do IV/UFRRJ por orientar minha formação científica e, fundamentalmente, pelo apoio e amizade essenciais para a concretização deste trabalho.

Ao pesquisador Dr. Hélio de Carvalho Vital do Centro Tecnológico do Exército pelo apoio e orientação nos trabalhos de irradiação.

À professora Dra. Glória Maria Direito pelos ensinamentos em cromatografia líquida e auxílio nos momentos críticos.

Ao pesquisador do Departamento de Biologia da Fundação Oswaldo Cruz, Mário Jorge Gatti pelo fornecimento das cepas fúngicas de referência utilizadas neste experimento.

Ao meu esposo e companheiro Adriano Perin, cujo apoio foi fundamental para concluir este trabalho. Às minhas irmãs Andréa e Priscila, sempre na torcida por novas conquistas.

Às Dras Ana Maria Dalcerro e Carina Magnoli, ao belo grupo de doutorandos do Departamento de Microbiologia da Universidad Nacional de Rio Cuarto (UNRC) e em especial, à Dra. Lília Cavaglieri, pela oportunidade de compartilhar momentos de grande aprendizado, um exemplo de profissionalismo e acima de tudo, uma pessoa de alma pura.

À doutoranda Andrea Cristofolini e Dra. Cecilia Merkis do Departamento de Microscopia (UNRC), pela cooperação com as análises de microscopia eletrônica de transmissão. À Dra. Estela Monteresino por todo apoio e acolhimento.

Aos amigos Liamara Perin e Michel Habib, aos companheiros de laboratório César, Kelly, Luis e Beatriz pela alegria da convivência e trabalho em grupo.

Aos funcionários do Projeto Sanidade Animal: Luís Jorge, Adevaldo e Jôse pelo incentivo e suporte técnico.

Ao Edson Souchie, amigo e professor do Centro Federal de Educação Tecnológica de Rio Verde pela compreensão e apoio para que eu pudesse concluir esta etapa tão importante para a carreira docente.

Enfim, a todos que de alguma forma apoiaram e contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigada!

BIOGRAFIA

Jéssika Mara Martins Ribeiro, filha de Péricles Ferreira Martins Ribeiro e Raquel Carvalho Martins Ribeiro, nasceu no dia 29 de agosto de 1977 no bairro de Boa Vista, em Recife, Pernambuco.

Ingressou no Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em março de 1995. Estagiou no Hospital de Pequenos Animais desta Universidade e nos laboratórios do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas. Neste último, foi bolsista de Iniciação Científica pelo programa PIBIC/CNPq no período de agosto de 1997 a janeiro de 2000, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Alberto da Rocha Rosa. Colou grau em abril de 2000, mesmo ano em que concluiu o Curso de Especialização em Controle de Qualidade de Alimentos pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Trabalhou em clínica de pequenos animais entre 2000 e 2002. No período de 2001 a 2002 fez o curso de especialização em Homeopatia para Médicos Veterinários, oferecido pelo Instituto Hanenmaniano do Brasil (IHB).

Em março de 2002, iniciou o Mestrado em Microbiologia Veterinária da UFRRJ, onde defendeu a dissertação intitulada: Produção de aflatoxina B₁ e ocratoxina A em radícula de cevada utilizada na alimentação animal, em fevereiro de 2004. Neste mesmo ano, ingressou no doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, área Sanidade Animal.

No período de 2004 a 2006, atuou na orientação e fiscalização da produção e comercialização de alimentos no município de Duque de Caxias, RJ, como funcionária da Vigilância Sanitária Municipal.

Casou-se em janeiro de 2006 com Adriano Perin, no município de Rio Verde, GO. Lecionou Microbiologia para a Medicina Veterinária da Universidade de Rio Verde (FESURV) no 1º semestre de 2006. Desde fevereiro de 2006, é professora do Centro Federal de Educação Tecnológica de Rio Verde (CEFET RV), onde lecionou produção de pequenos ruminantes no Curso Técnico em Zootecnia e, atualmente, leciona Microbiologia Geral e Aplicada e Anatomia Animal para o Curso de Graduação em Zootecnia.

RESUMO

RIBEIRO, Jéssika Mara Martins. **Influência da radiação gama sobre a microbiota natural de ração avícola e seu efeito sobre a morfologia, fisiologia e genética de cepas de referência de *Aspergillus* spp.** 2008. 81p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Irradiação é um processo físico eficazmente utilizado na preservação de alimentos. Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da exposição à radiação gama sobre a microbiota natural de rações avícolas e cepas de *Aspergillus* spp. Amostras de fubá, farelo de soja e ração foram coletadas diretamente da linha de produção de uma granja avícola, no município de Avelar, RJ e, submetidas às doses de 0; 3,5; 8 e 15 kGy de radiação gama. Foram realizados: contagem, isolamento e identificação da microbiota contaminante antes e após a irradiação. A radiosensibilidade de cepas de referência do gênero *Aspergillus* spp. foi estudada em meio CYA e em milho, com doses de 0 a 8 kGy. Foi comparada a morfologia de cepas controle e irradiadas por macroscopia, microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão. Estudou-se o perfil toxígeno e realizou-se uma avaliação genética pela técnica de polimorfismo de ADN amplificado ao acaso. Observou-se redução na contagem com o aumento da dose, tendo sido verificada a eliminação da microbiota com 8 kGy. Constatou-se também uma maior radiosensibilidade de leveduras, em relação aos fungos filamentosos. Ocorreu efeito do tempo de armazenamento, sendo que as contagens após 45 dias foram inferiores às encontradas aos 7 dias após a irradiação. A dose 3,5 kGy proporcionou significativa redução da contagem fúngica, a nível abaixo do limite estipulado para a garantia da qualidade higiênica de ingredientes e ração avícola. No entanto, há uma microbiota residual, formada principalmente pelos gêneros: *Cladosporium* spp., *Curvularia* spp., *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp., esses últimos após serem repicados, apresentaram apenas o desenvolvimento de micélio estéril, o que não permitiu a identificação da espécie. Diferenças em radiosensibilidade foram observadas entre as cepas de referência de *Aspergillus* avaliadas, sendo *A. parasiticus* o mais radiorresistente em ambos os substratos avaliados: meio CYA e milho. Observou-se menor conidiogênese e aumento de estruturas de resistência, como os esclerócios. As alterações morfológicas foram mais intensas no isolamento inicial após irradiação sendo que, gradualmente, os isolados irradiados voltaram a apresentar crescimento semelhante ao padrão nos repiques sucessivos. Alterações ultraestruturais nas cepas irradiadas foram observadas principalmente em nível de membrana plasmática e de organelas, em especial núcleo e mitocôndrias. Essas cepas tiveram aumentada sua produção de toxinas. Por outro lado, não foram observadas alterações significativas no genótipo, ao menos com os três marcadores utilizados. Esses relatos reforçam a hipótese de que situações de estresse induzem uma maior produção de toxina pelos fungos. A irradiação produz um estresse, afetando metabolicamente o fungo. Contudo, ao serem fornecidos nutrientes e condições adequadas de crescimento, essa alteração fisiológica é superada. Esses achados sugerem que cepas sobreviventes à irradiação podem voltar a se desenvolver, deteriorando o substrato, desde que sejam fornecidas condições favoráveis ao para seu crescimento.

Palavras-chave: Radiosensibilidade, RAPD, alterações ultraestruturais.

ABSTRACT

RIBEIRO, Jéssika Mara Martins. **Influence of gamma irradiation on natural mycoflora of poultry feed and effect on morphology, fisiology and genetic of strains *Aspergillus* spp.** 2008. 81p. Tesis (Doctor Science in Veterinary Science, Animal Health). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Irradiation is a physical process efficiently used in the conservation of foods. The purpose of this study was to investigate the effects of irradiation on the natural mycoflora of poultry feeds and on strains of *Aspergillus* spp. Maize flour samples, soy crumb and feed were collected directly from the production line of a poultry farm in Avelar, RJ, and exposed to doses of 0, 3.5, 8 and 15 kGy of gamma radiation. Counting, isolation and identification of the contaminant mycoflora were performed before and after irradiation. The radiosensitivity of strains of reference of *Aspergillus* spp. was determined in CYA medium and in corn for doses ranging from 0 to 8 kGy. Comparisons between the morphologies of control and irradiated strains were performed by using macroscopy, optical microscopy and transmission electron microscopy. Toxigenic profile determination and genetic evaluation by RAPD were also carried out. Higher doses have been found to reduce the number of active colonies, causing elimination of the mycoflora at 8 kGy. A larger radiosensitivity of yeasts was observed in comparison with filamentous fungi. A significant reduction in fungi population occurred at 3.5 kGy to levels below the limit that ensures the hygienic quality of ingredients and poultry feeds. The residual mycoflora was found to decrease with post-irradiation time and included mostly *Cladosporium* spp., *Curvularia* spp., *Fusarium* spp. and *Aspergillus* spp. and sterility of mycelium prevented further identification of the surviving species of *Aspergillus* spp. Differences in radioresistance were found among species of *Aspergillus* and the highest tolerance to radiation was observed for *A. parasiticus*. Initial morphologic changes were found to be more severe during the first isolation after irradiation than in later ones, with the fungi gradually recovering their normal growth rate. Ultrastructural changes in the irradiated strains were observed mostly in the plasmatic membrane and membranous organelles of nuclei and mitochondria. An increase in the rate of production of toxins by the irradiated strains has been found, however no significant alterations have been observed in their genotypes. Such findings apparently indicate that irradiation stress affected the metabolic response of the fungi, leading to a larger production of toxins. In addition, when appropriate conditions of feeding and growth were restored, the physiologic damages were gradually repaired. Therefore, under such circumstances, irradiated strains may resume growing, thus further deteriorating the substratum.

Key words: Radiosensitivity, RAPD, ultrastructural changes.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Avaliação comparativa do risco agudo e crônico de diversos contaminantes alimentares.....	09
Tabela 2.	Espectro eletromagnético de radiação.....	13
Tabela 3.	Níveis de garantia do milho picado degerminado.....	20
Tabela 4.	Valores de atividade de água para as amostras de ingredientes e ração avícola.....	25
Tabela 5.	Influência da dose de radiação gama sobre a micobiota natural de fubá, 1º ensaio.....	27
Tabela 6.	Influência da dose de radiação gama sobre a micobiota natural de farelo de soja, 1º ensaio.....	28
Tabela 7.	Influência da dose de radiação gama sobre a micobiota natural de ração, 1º ensaio.....	28
Tabela 8.	Avaliação do tempo de armazenamento sobre a contagem fúngica de fubá submetido a doses de radiação gama.....	29
Tabela 9.	Avaliação do tempo de armazenamento sobre a contagem fúngica de farelo de soja submetido a doses de radiação gama.....	30
Tabela 10.	Avaliação do tempo de armazenamento sobre a contagem fúngica de ração submetida a doses de radiação gama.....	30
Tabela 11.	Influência da dose de radiação gama sobre a micobiota natural de fubá, 2º ensaio.....	31
Tabela 12.	Influência da dose de radiação gama sobre a micobiota natural de farelo de soja, 2º ensaio.....	32
Tabela 13.	Análise de variância da influência da dose de radiação gama sobre a micobiota natural de ração, 2º ensaio.....	32
Tabela 14.	Doses para inativação de 50% das colônias de <i>Aspergillus</i> spp. em meio CYA.....	35
Tabela 15.	Efeito de doses de radiação gama sobre <i>Aspergillus</i> spp. em milho.....	36
Tabela 16.	Características morfológicas sobre MEA de <i>Aspergillus flavus</i> , cepa controle e submetida à radiação gama, comparadas ao padrão descrito na literatura.....	76
Tabela 17.	Características morfológicas sobre MEA de <i>Aspergillus parasiticus</i> , cepa controle e submetida à radiação gama, comparadas ao padrão descrito na literatura.....	77
Tabela 18.	Características morfológicas sobre MEA de <i>Aspergillus niger</i> , cepa controle e submetida à radiação gama, comparadas ao padrão descrito na literatura.....	78
Tabela 19.	Características morfológicas sobre MEA de <i>Aspergillus carbonarius</i> , cepa controle e submetida à radiação gama, comparadas ao padrão descrito na literatura (continua).....	79
Tabela 20.	Características morfológicas sobre MEA de <i>Aspergillus ochraceus</i> , cepa controle e submetida à radiação gama, comparadas ao padrão descrito na literatura.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química das principais aflatoxinas. Fonte: Diaz e Boermans, 1994.....	07
Figura 2.	Estrutura da Ocratoxina A (OTA). Fonte: Groene et al., 1996.....	08
Figura 3.	Manejo integrado no controle de micotoxinas (LÓPEZ-GARCÍA; PARK, 1998).....	12
Figura 4.	Esquema de Incubação de cepa de <i>Aspergillus</i> spp, inoculada em três pontos equidistantes, a ser identificada nos meios MEA, CY20S, ambos a 25°C, e CYA em dois regimes de temperatura: 25 e 37°C, segundo Klich (2002).....	17
Figura 5.	Esquema de identificação simultânea de duas cepas de <i>Penicillium</i> spp. nos meios MEA, G25N e CYA em três regimes de temperatura (5, 25 e 37°C), segundo Pitt e Hocking, 1997.....	18
Figura 6.	Irradiador Gama com fonte de césio-137 – DDQBN/CTEx, RJ.....	19
Figura 7.	Cromatograma de uma solução padrão de ocratoxina A de 3 ng ml ⁻¹	22
Figura 8.	<i>A. ochraceus</i> submetido a 2 kGy de radiação gama, em milho picado. Micélio estéril após 10 dias de incubação a 28° C, aumento de 100x.....	37
Figura 9.	Crescimento de cepas padrão submetidas a 5,5 kGy sobre milho picado (granulometria média 2mm). A. <i>A. ochraceus</i> , observação direto do Erlenmeyer; B. <i>A. flavus</i> em meio DG18.....	37
Figura 10.	<i>Aspergillus flavus</i> submetido a 6,5 kGy de radiação gama, em milho picado. A. Visão da placa (diluição 10 ⁻¹) com meio DG18, após incubação por sete dias a 28°C; B. Conídios germinados, com aumento de 100x.....	38
Figura 11.	Desenvolvimento esperado de um <i>Aspergillus</i> , representado por <i>A. nidulans</i> , a partir do crescimento de uma hifa (GRIFFIN, 1994).....	39
Figura 12.	Características morfológicas de <i>Aspergillus parasiticus</i> sobre G25N e CY20S incubados sete dias a 25° C e CYA incubado por sete dias a 37° C. A- controle; B- mesmo fungo após irradiação com 2,5 kGy.....	39
Figura 13.	Características morfológicas de <i>Aspergillus carbonarius</i> sobre G25N e CY20S incubados sete dias a 25° C e CYA incubado por sete dias a 37° C. A- irradiado com 1 kGy; B- mesmo fungo após irradiação com 2,0 kGy.....	40
Figura 14.	Fotomicrografia por microscopia eletrônica de transmissão de <i>Aspergillus ochraceus</i> controle (0 kGy), aumento (x 16700). CW: corpos Woronin; GE: grânulos eletrondensos; N: núcleo; NO: nucléolo; M: mitocôndria; MP: membrana plasmática; P: parede celular; S: septo; V: vacúolo.....	42
Figura 15.	Fotomicrografia por microscopia eletrônica de transmissão de <i>Aspergillus ochraceus</i> irradiado com 2,0 kGy, isolado por diluição seriada do milho. Aumentos: A (x 5800); B (x 20700); C (x 13100); D (x 34600). CW: corpos Woronin; N: núcleo; M: mitocôndria; MP: membrana plasmática; P: parede celular; S:	

	septo; V: vacúolo; VF: fusão de vacúolo; VMP: vesícula.....	43
Figura 16.	Produtos de amplificação por RAPD obtidos a partir de espécies de <i>Aspergillus</i> spp. É mostrada a amplificação com o primer R 108.....	48
Figura 17.	Produtos de amplificação por RAPD obtidos a partir de espécies de <i>Aspergillus</i> spp. É mostrada a amplificação com o primer R 151.....	49
Figura 18.	Produtos de amplificação por RAPD obtidos a partir de espécies de <i>Aspergillus</i> spp. É mostrada a amplificação com o primer UBC90.....	50
Figura 19.	Dendograma de similaridade genética, obtido a partir dos produtos de amplificação por RAPD com os primers R108, R151 e UBC90 para isolados de <i>Aspergillus</i> spp. controles e irradiados. A escala superior representa a distância taxonômica.....	51
Figura 20.	romatografia em camada delgada de AFB ₁ na concentração de 500ppb (0,5 µg ml ⁻¹) submetido a 0, 4 e 8 kGy de radiação gama. Foi injetado 15 µl das amostras, três aplicações cada, e 5 µl do padrão de AFB ₁ com 18,0645 µg ml ⁻¹	52

LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SÍMBOLOS

A _a	Atividade de gua
ADN	cido desoxirribonucleico
AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ e AFG ₂	Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂
ANOVA	Análise de variância
ARNm	cido ribonucleico mensageiro
AOAC	Association of Official Analytical Chemist's
g	Gramma
Gy	Gray é a unidade padrão de dose absorvida de energia ionizante, e é equivalente a 1 Joule/kg. O Gy substituiu o rad (1 Gy = 100 rads).
kCi	kCurie - 1 kCi corresponde a 3,7 x 10 ¹⁰ desintegrações/ segundo.
kGy	kilogray - medida também usada para dose de radiação absorvida (1 kGy = 1000 Gy)
LSD	Teste de mínima diferença significativa de Fisher
MeV	Megaeletrovolt
mg	Miligrama
ml	Mililitro
OTA	Ocratoxina A
PCR	Reação em cadeia de polimerase
ppb	partes por bilhão
RAPD	Polimorfismo de ADN amplificado ao acaso
ufc	Unidade formadora de colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Hipóteses	3
1.2 Objetivos Gerais	3
1.3 Objetivos Específicos	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Micobiota e Micotoxinas em Ingredientes e Rações Avícolas.....	4
2.1.1 Principais ingredientes: milho e soja.....	4
2.1.2 Rações avícolas	5
2.2 Os Fungos.....	5
2.2.1 Atividade de água e o crescimento fúngico.....	6
2.2.2 O gênero <i>Aspergillus</i> spp.....	6
2.3 Micotoxinas na Produção Animal	7
2.3.1 Micotoxinas: definição e hipóteses	7
2.3.2 Aflatoxinas	7
2.3.3 Ocratoxina A	9
2.4 Implicações das Micotoxinas para a Saúde Humana.....	10
2.5 Processos Empregados no Controle do Crescimento Fúngico e Contaminação por Micotoxinas	11
2.6 Radiação Gama.....	14
2.6.1 Irradiação de rações.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Micobiota Natural de Ingredientes e Ração Avícola e Irradiação.....	17
3.1.1 Amostras.....	17
3.1.2 Determinação da atividade de água.....	17
3.1.3 Contagem, isolamento e identificação da micobiota contaminante	17
3.1.4 Irradiação	19
3.2 Radiossensibilidade de Cepas Fúngicas de Referência.....	20
3.2.1 Cepas de referência.....	20
3.2.2 Irradiação em meio de cultura	20
3.2.3 Irradiação em milho.....	21
3.2.4 Avaliação morfológica por macroscopia e microscopia óptica.....	21
3.2.5 Microscopia eletrônica de transmissão.....	21
3.2.6 Avaliação da capacidade toxígena de <i>Aspergillus</i> spp.....	22
3.2.7 Avaliação genética pela técnica de polimorfismo de ADN amplificado ao acaso.....	23
3.3 Irradiação de Aflatoxina B ₁ em Solução	24
3.4 Análise Estatística	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Micobiota Natural de Ingredientes e Ração Avícola.....	26
4.2 Irradiação de Ingredientes e Ração Avícola.....	28
4.3 Radiossensibilidade de Cepas Fúngicas de Referência de <i>Aspergillus</i> spp.	35
4.3.1 Irradiação das cepas em CYA	35
4.3.2 Irradiação em milho.....	36
4.3.3 Avaliação morfológica de cepas de <i>Aspergillus</i> controle e irradiadas	40
4.3.4 Estudo da ultraestrutura	41
4.3.5 Perfil toxígeno	45
4.3.6 Avaliação genética de <i>Aspergillus</i> por polimorfismo de ADN amplificado ao acaso ...	46
4.4 Irradiação de Aflatoxina B ₁	53

5 CONCLUSÕES	55
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
7 ANEXOS	69
ANEXO A - Cálculo do tempo de irradiação.....	70
ANEXO B - Cálculo de produção de toxina	71
ANEXO C – Fórmulas dos meios de cultura	72
ANEXO D – Análises Estatísticas	75
ANEXO E – Características morfológicas de cepas de <i>Aspergillus</i> spp. controles e submetidas à radiação gama.	77

1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva da avicultura brasileira modernizou-se devido à necessidade de redução de custos e aumento de produtividade. Considerada uma das mais organizadas do mundo, tem contribuído de forma significativa para a economia do país. O Brasil é o terceiro maior produtor e líder mundial nas exportações de carne de frango (IBGE, 2006). Este fato foi alcançado em função de sua estrutura e condição sanitária competitivas. A avicultura é uma atividade dinâmica, porém dependente do agronegócio de grãos, especialmente milho e soja, por serem a base da dieta das aves, as quais se alimentam exclusivamente de ração.

O cultivo de grãos apresenta todo um ecossistema próprio, onde pode ser observada uma rica micobiota. Durante o desenvolvimento das plantas, pode-se encontrar espécies fitopatogênicas, endofíticas ou não, com destaque para fungos dos gêneros *Fusarium* spp. e *Alternaria* spp. Após a colheita, com o processo de secagem e armazenamento, produz-se uma intensa mudança nos fatores ecológicos, a qual tem repercussão sobre a micobiota que provém do campo. Dessa forma, passam a predominar fungos como *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., os quais se desenvolvem em alimentos com atividade de água mais baixa e são mais competitivos em sistemas de armazenamento.

Os fungos são heterotróficos, se utilizam de enzimas extracelulares que degradam o alimento para que possam nutrir-se por absorção. Há a utilização de reservas de carboidratos, proteínas e lipídios, com conseqüente redução do valor nutricional e da digestibilidade do grão, motivo de grande preocupação na fabricação de rações. Ademais, os fungos podem ocasionar danos à saúde dos animais através de processos infecciosos, porém, de maior importância estão os casos de intoxicação, chamados de micotoxicose, que podem se apresentar de forma aguda, subaguda ou, mais comumente, crônica. Dentre os gêneros fúngicos isolados com maior frequência, a partir de rações avícolas, destacam-se *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp., considerados os principais produtores de micotoxinas.

A produção de grãos no Brasil apresenta deficiências nos processos de colheita e pós-colheita. Durante o período de safra, observa-se carência na rede de armazenamento, que implica na permanência de grãos no campo, fora dos silos, sujeitos as intempéries ambientais. Em relação ao transporte, em sua maioria é realizado através de precária malha rodoviária. Os grãos são sujeitos a períodos prolongados sob condições de alta temperatura, aumento de umidade, fatores determinantes para a perda de qualidade, seja pelo crescimento fúngico como também pela produção de micotoxinas. O Brasil, com seu clima tropical, é propício a freqüentes contaminações por micotoxinas. Essa situação é preocupante para o agronegócio, além de se tratar de uma questão de saúde pública, pois as micotoxinas são metabólitos secundários fúngicos que apresentam vários graus de toxidez, tanto para os animais domésticos, quanto para o homem.

Com o intuito de assegurar a qualidade de um alimento, vários são os métodos utilizados pela indústria. A secagem e adição de conservantes previnem ou inibem o crescimento de microrganismos. Por outro lado, existem processos que os eliminam, como ocorre com a pasteurização, a esterilização comercial e a irradiação.

Medidas de controle da micobiota em ração têm sido baseadas principalmente nos tratamentos térmicos, como a peletização, além da vigilância da qualidade das matérias-primas. Por outro lado, existe o interesse no uso de irradiação para impedir o crescimento de microrganismos em diferentes matérias-primas vegetais e rações animais. Inicialmente, pensou-se no controle de *Salmonella* sp. na produção avícola, por serem, tanto a carne de frango como o ovo, os alimentos mais incriminados em toxinfecções causadas por essa bactéria em humanos. Porém, seu uso também tem sido proposto como um processo

apropriado para eliminar fungos. Ao controlar a contaminação fúngica, pretende-se também reduzir a ocorrência de micotoxinas.

O processo de irradiação mais versátil é o que aplica a radiação ionizante. As fontes de radiação ionizante mais frequentemente empregadas no tratamento de alimentos são: o isótopo radioativo Cobalto-60, emissor de radiação gama, e os feixes de elétrons.

Controlar o desenvolvimento de fungos nos alimentos significa fornecer aos animais melhor condição nutricional e segurança sanitária, as quais são fundamentais para a viabilidade econômica da criação. Vale lembrar que preservar a saúde animal é crucial para garantir o fornecimento de alimento inócuo à saúde humana.

Estudos sobre a exposição de diferentes substratos vegetais à radiação ionizante vêm sendo desenvolvidos. Trabalhos relatam significativa redução na microbiota de rações para animais de laboratório, em doses que não comprometem o valor nutricional nem digestivo do alimento. Em rações avícolas, várias doses de radiação já foram avaliadas quanto à redução de patógenos bacterianos. No entanto, é escassa a informação quanto aos efeitos da radiação gama sobre a microbiota natural de ração avícola e, são necessários mais estudos sobre os efeitos deste tratamento físico sobre fungos toxígenos do gênero *Aspergillus* spp.

1.1 Hipóteses

A exposição de ingredientes e ração avícola à radiação gama pode reduzir significativamente a contaminação por fungos.

O processo físico de irradiação pode alterar a morfologia, fisiologia e genética de fungos toxígenos do gênero *Aspergillus* spp.

1.2 Objetivos Gerais

- ✓ Avaliar a influência da radiação gama sobre a microbiota natural de ingredientes e ração avícola.
- ✓ Estudar as possíveis alterações morfológicas, fisiológicas e genéticas em cepas de referência do gênero *Aspergillus* induzidas por radiação gama.

1.3 Objetivos Específicos

- ✓ Isolar e quantificar a microbiota contaminante de ingredientes e ração avícola.
- ✓ Identificar em nível de espécie, os isolados pertencentes aos gêneros: *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp.
- ✓ Avaliar os efeitos de doses de radiação gama sobre a microbiota natural de ingredientes e ração avícola.
- ✓ Estudar a radiosensibilidade de cepas fúngicas de referência do gênero *Aspergillus* spp.
- ✓ Avaliar a alteração morfológica em cepas de referência irradiadas, por macroscopia e microscopia óptica.
- ✓ Estudar a ultraestrutura de cepas controle e irradiadas por microscopia eletrônica de transmissão.
- ✓ Analisar o efeito da radiação gama sobre a capacidade toxígena de cepas fúngicas de referência do gênero *Aspergillus*.
- ✓ Estudar o perfil molecular pela técnica de polimorfismo de ADN amplificado ao acaso de cepas controle e irradiadas.
- ✓ Observar o efeito da irradiação sobre a aflatoxina B₁ em solução.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Micobiota e Micotoxinas em Ingredientes e Rações Avícolas

Fungos e insetos são responsáveis pela maioria dos danos em ingredientes de rações durante a estocagem. Tal informação é divulgada desde meados do século XX, como ressaltado por Weeb et al. (1959). A ocorrência de fungos e suas micotoxinas em grãos e rações são influenciadas por fatores ambientais, em especial a umidade do substrato e a temperatura ambiente, como também, sofre interferência dos métodos de processamento. Outro fator a considerar é a composição do alimento, pois alguns grãos são substratos mais aptos que outros para o crescimento de determinados fungos (SANTÚRIO, 2000).

2.1.1 Principais ingredientes: milho e soja

O milho (*Zea mays* L.) é um cereal com grande contribuição na alimentação animal, devido principalmente às suas características nutricionais. Trata-se de uma excelente fonte energética, em função do alto teor de amido, lipídios; tem também proteínas e vitaminas (PATERNIANI, 1978). Os números sobre a produção de milho no Brasil evidenciam a importância desse produto e seus derivados na economia nacional. A produção brasileira de milho na safra 2006/2007 foi de 51,07 milhões de toneladas (CONAB, set./2007)¹. Em safras anteriores, foi constatado que em torno de 65% da produção são destinados ao consumo animal, seja *in natura*, ou como ração animal (SALAY; MERCADANTE, 2002).

A cultura do milho é muito vulnerável às pragas e doenças, que provocam danos na plantação, nos grãos recém-colhidos e também nos grãos armazenados. O processo de infecção pelos fungos nos grãos pode ocorrer ainda no campo, durante a fase de maturação, e prosseguir nas etapas seguintes, quando da colheita, secagem, armazenamento, transporte e processamento (LAZZARI, 1997). A presença de insetos deve ser considerada, por serem responsáveis por danos físicos aos grãos e, conseqüentemente, por facilitarem a penetração fúngica (D'MELLO; MACDONALD, 1997). Nos grãos infectados por fungos, para que ocorra a produção de micotoxinas, é necessário que estejam presentes cepas toxígenas, pois dentro de uma mesma espécie, existem microorganismos produtores e não produtores de micotoxinas (SMITH; MOSS, 1985).

As propriedades nutritivas do milho o elegeram como constituinte principal de ração animal com cerca de 60% da sua composição. Não obstante, este fator torna-o também alvo vulnerável à deterioração por fungos toxígenos. Como exemplos têm o *Fusarium verticillioides*, espécie predominante na fitopatologia do milho e produtora de fumonisina, ainda no campo (FIGUEIRA et al., 2003) e *Aspergillus flavus*, produtor de aflatoxinas (KAWASHIMA; VALENTE SOARES, 2006), predominante no armazenamento, principalmente em climas tropicais (PITT; HOCKING, 1997).

Dilkin et al. (2000), ao avaliarem milho recém-colhido em Santa Maria, RS, encontraram uma contaminação por *Fusarium* sp. (57,1%) seguida de *Aspergillus* sp. (23,6%) e *Penicillium* sp. (14,3%). Rodriguez-Amaya (2001) também obteve os gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* como os fungos toxígenos mais freqüentes em milho, com destaque para as espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *F. verticillioides*. Mesmo grãos de milho aparentemente sadios podem apresentar contaminação por fungos toxígenos, Farias et al. (2000) isolaram 169 cepas de *Aspergillus* a partir de milho no Estado do Paraná, das quais *A. flavus* foi prevalente (64%), seguido por *Eurotium amstelodami* (19%), *E. chevalieri* (10%) e *A.*

¹ http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/boletim12_safra.pdf, acesso em: 04-10-2007.

parasiticus (7%). A avaliação do perfil toxígeno permitiu constatar que 91 % dos isolados de *A. flavus* eram produtores de aflatoxinas do grupo B e todos os 11 isolados de *A. parasiticus* foram capazes de produzir simultaneamente AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂.

A soja (*Glycine max* L.) é uma oleaginosa muito utilizada em rações animais, na forma de farelo, e corresponde ao aporte protéico à ração. Gonçalves et al. (2001) avaliaram 12 amostras de farelo e quatro de grãos de soja, destas em apenas uma do farelo foi detectada a presença de aflatoxinas, na concentração de 23,2 ppb. Pontes Netto et al. (2002) encontraram três amostras contaminadas com aflatoxinas e uma com ocratoxina, de um total de 21 amostras de soja analisadas.

2.1.2 Rações avícolas

A micobiota e a contaminação de rações avícolas por micotoxinas vêm sendo estudadas no Brasil. Aflatoxinas foram detectadas em 56,9% e ocratoxina A (OTA) em 100 % das amostras de matérias-primas e rações avícolas coletadas em fábricas do Estado do Rio de Janeiro, no período de um ano. Os níveis variaram de 1 a 32 µg kg⁻¹ para aflatoxinas e de 1,2 a 77 µg kg⁻¹ para OTA (RIBEIRO et al., 2000). Níveis altos de contagem fúngica foram observados por Rosa et al. (2006) ao avaliarem matérias-primas e rações avícolas procedentes do mesmo Estado, onde a maioria das amostras excedeu o limite para qualidade higiênica, que é de 1 x 10⁴ ufc g⁻¹ (GMP, 2005). Rosa et al. (2006) encontraram o gênero *Aspergillus* como o mais freqüente, sendo *A. flavus* a espécie prevalente. Em outro estudo, *Penicillium* foi encontrado como o mais prevalente seguido por *Aspergillus* e *A. flavus* foi isolado a partir de 25 % das amostras analisadas. Ademais, 64,5 % das amostras continham níveis de AFB₁ que variaram de 1,2 a 17,5 µg kg⁻¹ (OLIVEIRA et al., 2006). Fraga et al. (2007) verificaram uma contaminação fúngica na ração de 4 x 10³ a 3,2 x 10⁴ ufc g⁻¹. No entanto, 100 % das amostras de ração estavam contaminadas com OTA (98 ± 22 µg kg⁻¹) e aflatoxinas (65 ± 19 µg kg⁻¹).

Rações avícolas são freqüentemente contaminadas por micotoxinas, por esta razão as aves estão sujeitas à ocorrência de micotoxicoses (DALCERO et al., 1997). As micotoxinas são compostos orgânicos de baixo peso molecular e não possuem imunogenicidade (DILKIN, 2002). Desta forma representam um perigo potencial à saúde dos animais, pois não induzem reação do sistema de defesa e provocam diversos efeitos tóxicos. As aflatoxinas têm grande importância na avicultura e, dentre elas a aflatoxina B₁ (AFB₁) é a mais freqüente e mais tóxica, sendo conhecida como o mais potente hepatocarcinógeno de origem biológica para os animais (SMITH; MOSS, 1985).

A deterioração fúngica traz perigos potenciais ocultos, as micotoxinas, aliados às perdas na qualidade sanitária e valor nutricional, estendendo o prejuízo econômico no percurso de toda cadeia alimentar. Salienta-se a importância de micotoxinas em barreiras sanitárias imprescindíveis na comercialização de produtos agropecuários no mundo globalizado (FIGUEIRA et al., 2003).

2.2 Os Fungos

Os fungos são microrganismos ubíquos, presentes em diferentes climas. No entanto, sua maior biodiversidade ocorre em climas tropicais, onde se deve ter maior cuidado com a contaminação e o crescimento de espécies toxígenas nos produtos agrícolas, devido ao maior risco de produção de micotoxinas (ALMEIDA et al, 2000).

Os fungos toxígenos podem ser divididos, a princípio, em três grupos: 1) os que produzem micotoxinas no campo, como *Fusarium* spp, geralmente resultante a uma infecção; 2) os que prevalecem após a colheita, durante o armazenamento, tais como: *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp.; e 3) os que causam infecções no campo e durante o armazenamento, como *Alternaria* spp. e *Aspergillus* spp. (ELLNER, 2000).

2.2.1 Atividade de água e o crescimento fúngico

A água existente nos alimentos nem sempre encontra-se disponível para o fungo, pois alguns substratos a retêm fortemente, dificultando sua absorção. A água disponível no substrato pode ser medida, sendo denominada atividade de água (A_a) (SCUSSEL, 1998; MALLOZZI; CORRÊA, 1998). A A_a é a relação entre a pressão de vapor da água no alimento e a pressão de vapor da água pura. Microrganismos requerem um ambiente aquoso no qual efetuem mudanças nos solutos que acompanhem os seus processos de crescimento e reprodução. Um microrganismo que não tenha contato com um sistema aquoso de razoável extensão é efetivamente isolado de seu ambiente natural (SIMÃO, 1985). Todo microrganismo, incluindo os fungos toxígenos, possuem uma atividade de água e temperatura máxima, ótima e mínima para o crescimento, sendo estes valores normalmente diferentes para produção de suas toxinas (PITT; HOCKING, 1997).

2.2.2 O gênero *Aspergillus* spp.

Aspergillus é um gênero de fungos anamórficos, que se reproduzem pela produção de fialoconídios, conídios sobre fiálides (KLICH, 2002). Possuem grande versatilidade metabólica e habilidade para dispersar seus conídios no ambiente. Podem se manter em desenvolvimento sob condições adversas, tais como baixas umidade e atividade de água (DIONELLO et al., 2000). Possui espécies encontradas como contaminantes em todos os lugares da Terra. Predominam especialmente em áreas mais quentes e são mais comuns nos trópicos (PITT; HOCKING, 1997; SANSON; PITT, 2000).

Patógenas para o homem e animais, algumas espécies são também indutoras de alergias. O gênero é considerado a maior causa de degradação de produtos agrícolas, tanto antes, como após a colheita. Além da deteriora do alimento, preocupa a variedade de micotoxinas que podem ser produzidas. Configura como o toxígeno mais comum afetando a cadeia alimentar, podendo contaminar vários produtos, como milho, amendoim, nozes, sorgo, soja e outras oleaginosas (KLICH, 2002). O *A. flavus* é de particular importância devido ao seu impacto sobre a agropecuária e saúde humana (DURAN et al., 2007).

O *A. flavus* Link de acordo com Klich e Pitt (1988), pertence ao subgênero Circundatti, seção Flavi. É de distribuição mundial, predominando em áreas tropicais e subtropicais, sendo aparentemente mais comum em solos cultivados do que em não cultivados. Esta espécie é capaz de colonizar vegetais em decomposição, grãos, sementes e muitos outros substratos, incluindo alimentos e rações animais (PITT; HOCKING, 1997; ROSA, 2002). Tem sido descrito ainda como patógeno para insetos e animais e, cerca de 50% dos isolados mostram-se aflatoxígenos (DOMSCH et al., 1980; CHRISTENSEN, 1981; PITT; HOCKING, 1997).

O *A. flavus* apresenta variações no crescimento quando há alteração nas temperaturas de incubação, isto é, crescimento mínimo ao redor de 10-12° C, máximo entre 43-48 °C e ótimo perto de 33 °C (DOMSCH et al., 1980). As variações de A_a que permitem o crescimento de *A. flavus* têm sido avaliadas desde baixas como 0,78 a 33 °C a moderadas como 0,84 a 25 °C (PITT; HOCKING, 1997). Pitt e Micamble (1995) estabeleceram A_a mínimas em função da temperatura para o crescimento de *A. flavus* da ordem de 0,82 a 25°C, 0,81 a 30°C e de 0,80 a 37°C.

A. parasiticus também pertence ao subgênero Circundati, seção Flavi (KLICH; PITT, 1988). Juntamente com *A. flavus* e *A. nomius*, configuram como os principais produtores das aflatoxinas (SAMAPUNDO et al, 2007).

A temperatura ótima para produção de aflatoxinas está entre 25 e 30°C (PITT; HOCKING, 1997). Utilizando a incubação de 30°C, Montani et al. (1988) verificaram que a

melhor A_a para a produção de aflatoxinas em milho foi 0,90, quando comparada a 0,87 e 0,97 no mesmo substrato.

A. ochraceus Wilhelm, pertence ao subgênero Circundati, seção Circundati e é freqüentemente isolado de solos cultivados, de vegetais e de sua rizosfera, de grãos armazenados e de uma ampla variedade de alimentos e rações animais (DOMSCH et al., 1980; PITT; HOCKING, 1997; ROSA, 2002). Seu crescimento ocorre entre 8 e 37°C, sendo ótimo a 24-31°C. A A_a mínima para o crescimento é 0,77 a 25°C, sendo ótimo a 0,95-0,99 (PITT; HOCKING, 1997). Possui isolados capazes de produzir ocratoxinas, das quais a ocratoxina A é de maior importância na produção animal.

O *A. niger* Tieghem var. niger, pertence ao subgênero Circundati, seção Nigri e é considerada uma espécie ubíqua, comumente isolada do solo, plantas, sementes, frutas secas e nozes (DOMSCH et al., 1980; PITT; HOCKING, 1997). É também um dos fungos mais freqüentemente isolados a partir de alimentos e rações animais (ROSA, 2002). A temperatura mínima de crescimento varia de 6-8°C, a máxima de 45-47°C com um ótimo a 35-37°C. É considerado um fungo xerofílico, sendo descrita a germinação em A_a de 0,77 a 35°C (PITT; HOCKING, 1997). Abarca et al. (2001) relatam a ocorrência de cepas ocratoxígenas numa incidência que varia de 1,7 a 18,5% dos isolados de *A. niger*.

A. carbonarius pertence ao subgênero Circundati, seção Nigri. Tem sido mostrado que esta espécie é importante fonte de contaminação por OTA em produtos como vinho, sucos, uvas passas e café (ABARCA et al., 2004), e também tem sido isolado de ingredientes e rações (ROSA, 2002). É capaz de crescer e produzir OTA em uma grande faixa de A_a e tanto em altas, como em baixas temperaturas (ESTEBAN et al., 2006).

2.3 Micotoxinas na Produção Animal

2.3.1 Micotoxinas: definição e hipóteses

Micotoxinas são produtos do metabolismo secundário, indicando que sua produção não é necessária para a sobrevivência dos fungos (KLICH, 2002). Porém, existe um grande debate entre pesquisadores sobre a natureza desse metabolismo e seu papel na biologia dos organismos produtores. Acredita-se que possam favorecer o processo invasivo e atuar no processo patológico, por causarem alterações bioquímicas, metabólicas e funcionais no organismo humano e animal (FAO, 1990). Muitos desses compostos também podem ser tóxicos para microrganismos (antibióticos) e plantas (fitotoxinas) (VINING, 1992).

O metabolismo secundário ocorre otimamente após a fase de crescimento balanceado, podendo estar associado a mudanças morfogenéticas, tais como a esporulação (SMITH; MOSS, 1985).

A produção de micotoxinas não está restringida a apenas um grupo de espécies fúngicas, os fungos produtores podem pertencer a várias classes e ordens dentro do reino. Assim, encontramos fungos toxígenos dentro das classes Oomycetes, Zygomycetes, Deuteromycetes, Ascomycetes e Basidiomycetes (SMITH; MOSS, 1985; ALEXOPOLUS et al., 1996). No entanto, as principais micotoxinas tem sido reconhecidas como produtos metabólicos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Destes, destaca-se o primeiro em climas tropicais (PITT, 2000).

2.3.2 Aflatoxinas

As aflatoxinas são bisfuranocumarinas derivadas de um decacetídeo, pela via biossintética dos policetídeos, na qual a unidade C2 é perdida durante a formação dos anéis bisfuranos (SMITH; MOSS, 1985). As aflatoxinas contêm um núcleo cumarínico acoplado a um bisfurano e estes a uma pentanona (AFB₁ e AFB₂) ou a uma lactona (AFG₁ e AFG₂)

(HUSSEIN; BRASEL, 2001) (Figura 1). As aflatoxinas B₁ e G₁ foram primeiramente descritas por Nesbitt et al. (1962) e Hartley et al. (1963), sendo as B₂ e G₂ compostos dihidro derivados de B₁ e G₁, respectivamente, descritas por Asao et al. em 1963 e 1965.

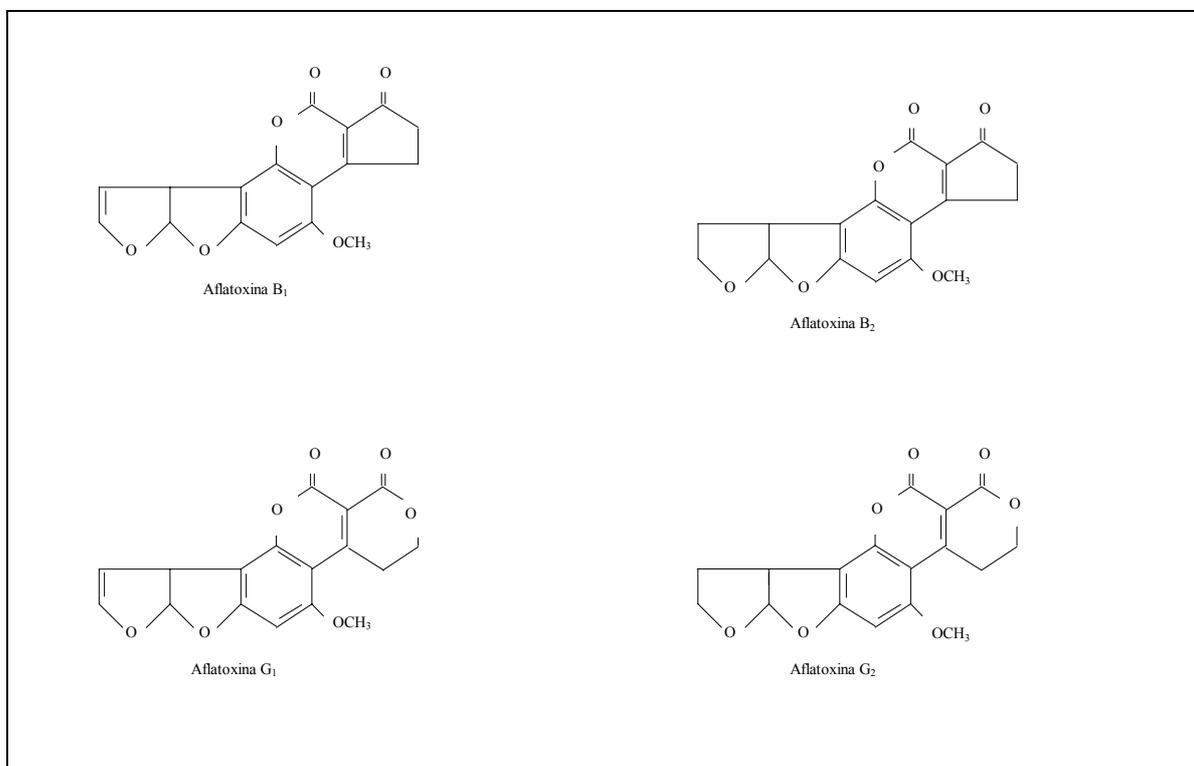


Figura 1- Estrutura química das principais aflatoxinas. Fonte: Diaz e Boermans, 1994.

Os efeitos tóxicos das aflatoxinas são dependentes da dose e do tempo de exposição, determinando, assim, intoxicações agudas e crônicas. A síndrome tóxica aguda ocorre pela ingestão de alimento com alta concentração de aflatoxina, sendo os efeitos observados em curto espaço de tempo. Caracteriza-se principalmente pela rápida deterioração do estado geral do animal, perda de apetite, hepatite aguda, icterícia, hemorragias e morte (OSWEILER, 1990).

Na aflatoxicose crônica, o sinal clínico mais evidente é a diminuição da taxa de crescimento dos animais jovens (LEESON et al., 1995). Ocorre através da ingestão de alimentos contaminados com baixos níveis de aflatoxinas por um longo período de tempo, podendo a exposição ao contaminante ser contínua ou intermitente. Esta patologia é de difícil diagnóstico, apesar de constituir a principal forma de intoxicação em condições naturais, o que ocasiona perdas econômicas consideráveis às criações animais (PIER, 1992).

A absorção das aflatoxinas ocorre no trato gastrointestinal do animal, e a sua biotransformação ocorre primariamente no fígado, por enzimas microsossomiais do sistema de funções oxidases mistas, associadas ao citocromo P-450 (BIEHL; BUCK, 1987). A AFB₁ é considerada uma das substâncias mais tóxicas para o fígado, sendo este o principal órgão atingido (OSWEILER, 1990).

Os mecanismos de toxidez aguda das aflatoxinas estão ligados aos adutos formados pela ligação entre o ADN e proteínas à AFB₁-epóxido, o que provoca a diminuição da síntese de ARN e inibe o ARNm. Isto leva a um bloqueio da síntese de proteína, com inibição da mitose e posterior morte celular. A inibição da síntese protéica no fígado e a diminuição das proteínas plasmáticas durante a aflatoxicose, são amplamente descritas na literatura (TUNG et al., 1975; KUBENA et al., 1991; QUEZADA et al., 2000). A interferência na síntese de

proteína é considerada como responsável direta pela imunodeficiência, má digestão devida à síntese inadequada de enzimas, coagulopatias causadas pela diminuição da produção de fatores específicos e, alterações a nível de certas membranas como resultado de defeitos na síntese de proteínas estruturais (WYATT, 1987).

As aflatoxinas formam o grupo de micotoxinas mais investigado (OLIVEIRA et al., 2006) e de maior importância econômica no mundo (KLICH, 2002). Em função das alterações supracitadas, os efeitos mais notados na produção são: a diminuição da velocidade de crescimento; da eficiência alimentar e produção de ovos; a imunossupressão, que é percebida pela ocorrência de falhas vacinais e aumento da susceptibilidade às doenças infecciosas e parasitárias; e ainda a hepatocarcinogênese (CRUZ, 1996).

Considerando a toxidez das aflatoxinas, recomenda-se o controle do nível da contaminação por AFB₁ em ração. No caso das aves, esse limite é de 20 µg kg⁻¹, sendo que para animais jovens o limite é ainda mais rigoroso, ou seja, de 10 µg kg⁻¹ (GMP, 2005). Na legislação brasileira, o nível máximo de tolerância é de 50 µg kg⁻¹ de aflatoxinas, sendo válido para qualquer matéria-prima a ser utilizada diretamente ou como ingrediente para rações destinadas ao consumo animal (BRASIL, 1988).

2.3.3 Ocratoxina A

A ocratoxina A (OTA) é a mais tóxica do grupo das ocratoxinas descobertas e tem como principal característica a nefrotoxicidade. Sua ocorrência em climas temperados está associada ao fungo *Penicillium verrucosum*, enquanto que em climas tropicais é produzida, principalmente, por espécies de *Aspergillus*, tais como: *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. carbonarius* (ROSA, 2002).

A OTA (Figura 2) é um pentacetídeo de fórmula C₂₀H₁₈ClNO₆, que consiste em uma dihidroisocumarina ligada através de uma carboxila a um grupo β-fenilalanina (GROENE et al., 1996). A OTA é uma potente nefrotoxina, que tem o fígado como alvo secundário. Está correlacionada com a Nefropatia Micotóxica Suína, Aviária e ainda possivelmente, com a Nefropatia Endêmica dos Balcãs, caracterizada por progressiva redução das funções renais, frequentemente é fatal. Dentre os animais de produção, os suínos são os mais atingidos, seguidos pelas aves (SCUSSEL, 1998). Segundo Crepy et al. (1995), os principais mecanismos de ação seriam: a inibição da síntese protéica e as modificações das vias oxidativas devidas à produção de radicais livres.

A contaminação por OTA é geralmente um problema de armazenamento inadequado, sendo sintetizada a uma temperatura média de 12 a 37° C por fungos do gênero *Aspergillus* spp. e entre 0 e 31° C por fungos do gênero *Penicillium* spp. (ROSA, 2002).

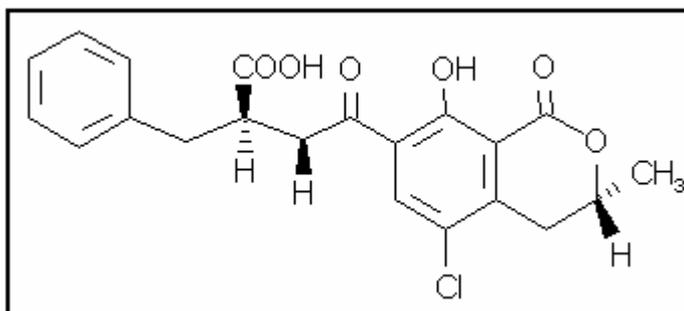


Figura 2. Estrutura da Ocratoxina A (OTA). Fonte: Groene et al., 1996.

Ademais da intoxicação pela rota alimentar, pelo fato dos conídios de fungos produtores poderem conter quantidades elevadas de OTA, a inalação desses conídios pelos animais pode ser uma via adicional à oral como rota de intoxicação (GILBERT; FREMY, 1995).

2.4 Implicações das Micotoxinas para a Saúde Humana

A exposição humana às micotoxinas pode ocorrer pela ingestão de grãos contaminados (micotoxicose primária) ou através do consumo de produtos originários de animais expostos às toxinas (micotoxicose secundária) (SHARMA, 1998).

As micotoxicoses em geral têm caráter crônico e resultam da exposição a doses baixas por longos períodos, podendo induzir o desenvolvimento de câncer (PITTET, 1998). Em relação a esse risco, as micotoxinas são consideradas as mais perigosas (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação comparativa do risco agudo e crônico de diversos contaminantes alimentares.

Agudo	Crônico
Elevado	
Microbiológicos	Micotoxinas
Ficotoxinas	Contaminantes antropogênicos
Algumas fitotoxinas	Algumas fitotoxinas
Micotoxinas	Dietas desequilibradas
Contaminantes antropogênicos	Ficotoxinas
Aditivos alimentares	Microbiológicos
Resíduos de pesticidas	Aditivos alimentares
Baixo	

Fonte: Kuiper-Goodman (1998).

Recomenda-se que os produtos à base de milho sejam objetos de estudos de prevenção da ocorrência de aflatoxinas, como também, alvos de inspeção pelos órgãos de vigilância sanitária (KAWASHIMA; VALENTE SOARES, 2006). Ao avaliar derivados de milho comercializados na cidade de Recife, PE, essas mesmas autoras encontraram aflatoxinas em apenas 3,7% das amostras. Entretanto, em 1,48% dessas, a concentração foi superior ao limite imposto pela legislação brasileira, que é de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o somatório das aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ (BRASIL, RDC n° 274, 2002).

Amaral et al. (2006) também encontraram uma baixa ocorrência de aflatoxinas em produtos alimentícios à base de milho (8,61% das amostras, com concentração de 3,3 a 23,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$), comercializados em Maringá e Martalva, PR. No entanto, baseados na concentração média encontrada para AFB₁ em fubá (1,08 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e no consumo *per capita* desse derivado pela população brasileira, os autores ressaltam a preocupação com a Ingestão Diária Média de AFB₁ calculada em 0,14 ng kg^{-1} p.c./dia no Brasil, variando de 0,21 ng kg^{-1} p.c./dia para famílias de menor renda a 0,04 ng kg^{-1} p.c./dia para aquelas com a maior renda. A Ingestão Diária Tolerável de AFB₁ é de 0,15 ng kg^{-1} p.c./dia, de acordo com Kuiper-Goodman (1998). A AFB₁ é classificada como carcinógeno humano classe 1 pela Agência Internacional de Investigação Sobre o Câncer (IARC) (BINDER, 2007).

A intensificação da produção animal, como ocorrido com a avicultura, suinocultura e bovinocultura de leite, aumenta os riscos de micotoxicose, pois quanto mais intensiva a produção, maior é o fornecimento de concentrados à base de cereais. Disso resulta a preocupação do consumo humano de resíduos de micotoxinas em produtos cárneos, ovos e leite. Produtos de origem animal podem apresentar teores residuais de aflatoxinas, ativadas metabolicamente através do sistema misto oxidase (MFO) hepático do animal que as ingeriu, tais como o aflatoxicol (AFL), a aflatoxina M₁ (AFM₁), além da própria aflatoxina B₁ (AFB₁) (SMITH; MOSS, 1985; Council For Agriculture Science And Technology, 2003).

Em relação à OTA, foi constatado que 50 % ou mais de sua ingestão nos países participantes da União Européia provêm de cereais, que apresentam níveis de contaminação entre 0,2 e 1,6 µg kg⁻¹ (BATTAGLIA et al., 1996). Van Egmond (2000) também considera a ingestão de produtos vegetais contaminados a principal via de exposição humana (> 90 %). A OTA já foi detectada em soro sanguíneo de homens e mulheres (ZIMMERLI; DICK, 1995, UENO et al., 1998) e em leite humano (MIRAGLIA et al., 1998). No entanto, a relativa estabilidade molecular da OTA lhe permite passar através da cadeia alimentar, ou seja, os produtos cárneos que contêm a toxina são oriundos de animais alimentados com ração contaminada (MOSS, 1998).

Em animais monogástricos, resíduos têm sido detectados em vários tecidos, havendo uma alta correlação entre nível de OTA na ração e nível de resíduo nos rins, fígado, músculo e tecido adiposo. No sangue, a OTA encontra-se livre ou ligada à albumina. Esta ligação é particularmente forte em suínos e humanos. Parece que a concentração no sangue é mais alta que em qualquer outro tecido (KROGH, 1992). Em aves de corte, a OTA tem sido detectada em carcaças de frangos e galinhas que apresentam nefropatias. Os níveis encontrados em ovos são baixos (WHO, 1992).

Segundo a IARC, a OTA é classificada como pertencente à categoria 2b, isto é, um possível carcinógeno para o homem com evidências para animais (LEGARDA; BURDASPAL, 1998). Baseada na sua carcinogenicidade, a Organização Mundial de Saúde (WHO) propôs um limite máximo de OTA de 5 ng g⁻¹ (ppb) em cereais (ABARCA et al., 2001).

2.5 Processos Empregados no Controle do Crescimento Fúngico e Contaminação por Micotoxinas

O estabelecimento de limites regulatórios para micotoxinas varia entre os países, em função do nível de exposição, fatores políticos, sociais e econômicos. Devido à globalização, com conseqüente aumento das exportações de alimentos, fez-se necessário estabelecer limites nacionais e internacionais.

A severidade da contaminação dos produtos agrícolas por fungos pode variar anualmente. Em geral, é influenciada por fatores que provoquem um estresse nas plantas assim como, variações nas práticas de colheitas, uso de biocidas, infestação por insetos e danos por aves e roedores. O excesso de umidade nos campos e durante o armazenamento, secagem e temperaturas extremas também são fatores predisponentes (ZAPATA, 2000). Mesmo quando o microrganismo dispõe de todos os requerimentos nutricionais, seu crescimento e a biossíntese de micotoxinas são afetados por parâmetros ambientais, dos quais os mais importantes são a temperatura e a atividade de água. Estes parâmetros interatuam e, quando da ocorrência de valores desfavoráveis de um destes, é reduzida a faixa de variação para o outro, dentro do qual o fungo pode crescer e produzir toxinas. Em geral, as faixas de atividade de água e temperatura que permitem a biossíntese de micotoxinas são mais estreitas que aquelas que possibilitam o crescimento fúngico (CUERO et al., 1987; FRISVAD; THRANE, 1996).

Baseado na literatura disponível, pode-se dizer que o melhor método para controlar a contaminação de micotoxinas em alimentos é prevenir o crescimento de fungos. (SANTÚRIO, 2000).

O manejo do risco associado à contaminação por fungos e micotoxinas deve envolver um sistema integrado (Figura 3). As estratégias para minimizar a contaminação devem considerar as fases de pré-colheita, colheita e pós-colheita. No período pré-colheita, um dos métodos para reduzir a infecção fúngica é a eleição de variedades resistentes ou menos susceptíveis associada a uma boa nutrição mineral das plantas. Ainda, em se tratando de resistência da planta, o controle de insetos é imprescindível, pois estes são responsáveis por facilitar a penetração fúngica. A rotação de culturas e o controle de resíduos da última colheita agem reduzindo o tamanho do inóculo para a próxima safra, em função dos fungos apresentarem uma menor sobrevivência na superfície do solo. O controle na colheita inclui otimizar o tempo, respeitando a maturação do grão e o teor de umidade. A remoção das partes visivelmente contaminadas por limpeza e segregação é uma opção efetiva e de baixo custo (SANTÚRIO, 2000; TANAKA, 2001).

No período pós-colheita, o principal problema é enfrentado durante o armazenamento. Os principais fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos no armazenamento são: a umidade, atividade de água, temperatura, período de armazenamento, nível de contaminação, interações microbianas, matérias estranhas, insetos, nível de oxigênio, condições físicas e sanitárias do grão ou das rações (ANDERSEN et al., 1996; LEE; MAGAN, 2000; DIONELLO et al., 2000; MARTINS; MARTINS, 2002; BUENO et al., 2004).

Quando se conhecem os níveis de contaminação em um alimento, deve-se avaliar se este é apto ao consumo humano ou animal, após a aplicação de algum tratamento, ou se é totalmente inadequado a qualquer ponto da cadeia alimentar. Vários métodos de preservação para controle de fungos em alimentos vêm sendo utilizados, tais como a fumigação e o tratamento térmico, mas ainda não se conseguiu com esses processos completo controle de fungos toxígenos. Processos como o aquecimento ou fumigação de químicos não são muito efetivos, por não eliminarem totalmente a contaminação fúngica do alimento (AZIZ et al., 2002). Além disso, esses processos alteram as propriedades físico-químicas dos grãos (MAITY et al., 2003). A exposição à radiação ionizante é um processo físico aplicado para eliminar microrganismos patogênicos de diferentes commodities (AZIZ et al., 2007).

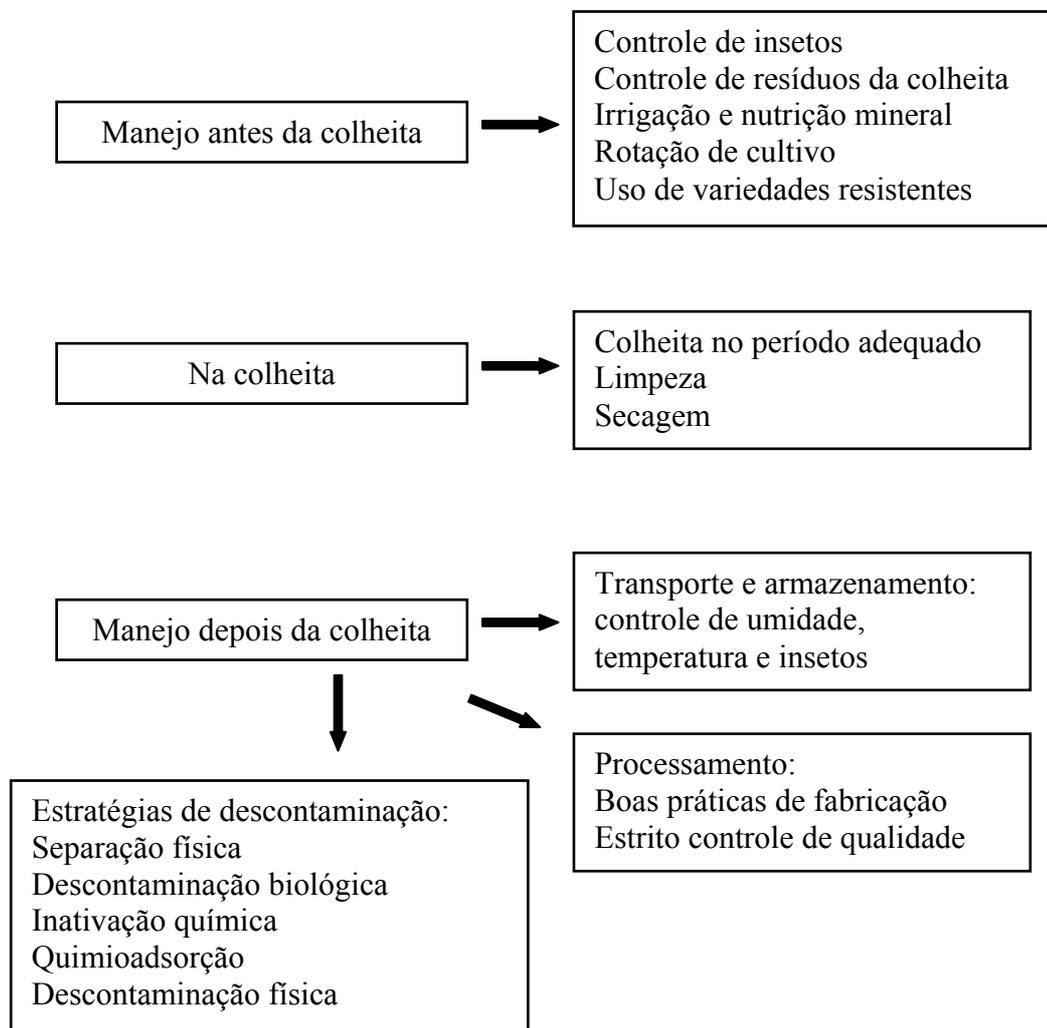


Figura 3. Manejo integrado no controle de micotoxinas (LÓPEZ-GARCÍA; PARK, 1998).

2.6 Radiação Gama

O poder de penetração da radiação em um substrato é proporcional ao seu comprimento de onda, quanto menor ele for maior é a penetração (GRIFFIN, 1994). O comprimento de onda das fontes de radiação conhecidas é colocado na Tabela 2. Raios gama, ondas eletromagnéticas com alto poder de penetração, passam através dos materiais sem deixarem resíduo, uma vantagem comparada a outros tratamentos de desinfecção (ADAMO et al., 1998, 2001).

Tabela 2. Espectro eletromagnético de radiação.

Radiação	Comprimento de onda (nm)
Gama	0,0001 – 0,14
Raios X	0,005 – 20
Ultravioleta	15 – 390
Visível	390 – 780
Infravermelha	780 – 4×10^5

Fonte: Griffin, 1994.

A irradiação é a exposição controlada de um material a um campo de radiação ionizante. O material é exposto 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 (HERNANDES et al., 2003). A irradiação como processo de esterilização de produtos biomédicos, tem sido satisfatoriamente utilizada há longo tempo (LOMBARDO et al., 1995).

A radiação gama transfere energia para a amostra, causando a ionização. Trata-se de um processo físico a partir de uma radiação nuclear que promove efeitos químicos, ou seja, a radiação interage com o meio, ionizando átomos e dissociando moléculas. Nesse mecanismo, são produzidos compostos altamente reativos, os radicais livres, denominados produtos radiolíticos, que rapidamente se combinam e se neutralizam (VITAL, 2007)². Dentre os parâmetros da irradiação, o mais importante é a dose absorvida, isto é, a quantidade de energia ionizante absorvida pelo material. A unidade de medida usada é o Gray ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J kg}^{-1}$). A dose empregada é dependente da contaminação inicial, sensibilidade dos organismos e proposta do tratamento. É importante que o alimento receba a menor dose que alcance o efeito desejado e que se busque a maior uniformidade possível, o que requer um minucioso mapeamento de dose (ICGFI, 1995).

As fontes de radiação ionizante empregadas em alimentos são isótopos radioativos emissores de radiação gama, como o Cobalto-60 (^{60}Co) e Césio-137 (^{137}Cs), os raios X gerados por máquinas que trabalham com energia de até 5 MeV e elétrons gerados por máquinas que trabalham com energia de até 10 MeV (SANTOS et al., 2003). 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 deste fornecer a mesma dose em tempo sete vezes menor que o ^{137}Cs (HERNANDES et al., 2003).

Assim como ocorre com outros processos empregados na indústria, para a irradiação as características nutricionais e sensoriais do alimento precisam sempre ser avaliadas. Doses moderadas de radiação podem provocar uma redução na concentração de vitaminas

² VITAL, H.C. **Comunicação pessoal**. 2007. (Centro Tecnológico do Exército – CTEEx, Guaratiba, Rio de Janeiro).

hidrossolúveis e alguns aminoácidos, fato que precisa ser considerado ao elaborar o alimento, o qual deve ser suplementado (FDA, 1995)³.

A irradiação tem sido utilizada no Brasil para reduzir ou eliminar a microbiota de diferentes substratos, tais como milho (AQUINO et al., 2005); livros e documentos antigos (SILVA et al., 2006); amendoim (PRADO et al., 2006) e guaraná em pó usado como estimulante (AQUINO et al., 2007).

2.6.1 Irradiação de rações

O uso da radiação em ingredientes e rações avícolas foi inicialmente proposto em função de sua capacidade em tornar esses materiais livres de *Salmonella* sp., importante patógeno para os animais e para o homem (FDA, 1995). Outros métodos são utilizados com o mesmo fim, tais como: a retirada de matérias primas de origem animal das formulações de rações, a peletização e o uso de tratamentos químicos. Porém, convém salientar que esses outros processos reduzem, mas não eliminam a contaminação das rações (SILVA; DUARTE, 2002).

O tratamento por irradiação, além de eliminar ou reduzir o número de certos microrganismos patogênicos presentes na ração, tem por proposta melhorar a qualidade higiênica por redução de agentes deteriorantes, especialmente fungos e eliminar insetos em estágio de reprodução (ICGFI, 1995; ITO et al., 1981). As doses de radiação requeridas para inibir o crescimento fúngico são superiores às necessárias para o controle de insetos. Em geral, quanto mais complexo (maior) o ADN do organismo, menor é a dose letal (HERNANDES et al, 2003).

A absorção da radiação ionizante causa alterações químicas nos componentes celulares dos microrganismos, com conseqüente mudança em sua atividade. De todos os mecanismos que estão envolvidos na ação da radiação sobre as células, a alteração no seu ADN é considerada a mais importante (URBAIN, 1986). A radiação gama tem também um efeito indireto, resultado da radiólise da água celular e formação de oxigênio ativo, radicais livres e peróxido, que causam quebra simples e dupla do ADN, o que pode induzir mutação e morte da célula (MACNAMARA et al, 2003). O dano mais sério ao ADN causado pela radiação ionizante é a dupla quebra, que leva à perda de informação local e, por descontinuidade estrutural perda de material genético em grande escala (FLETCHER, 1981).

Radiação ionizante induz perda de muitos constituintes celulares (íons orgânicos, aminoácidos, nucleotídeos, vitaminas e outros). Os efeitos da radiação que não resultam em morte ou dano genético permanente podem ser chamados de efeitos metabólicos, como alteração na permeabilidade de membranas e pode refletir na habilidade do organismo para se adaptar as condições adversas. Efeitos genéticos são danos permanentes, que incluem ambas as mutações e morte (GRIFFIN, 1994). A morte, a perda da habilidade em formar colônias, ocorre quando todas as cópias do cromossomo são danificadas em alguma região homóloga, o que torna o reparo impossível (FLETCHER, 1981).

Chen et al. (2000), ao analisarem o uso da irradiação com ⁶⁰Co de rações para animais SPF (Specific Pathogen Free), verificaram que uma dose de 8 kGy foi eficiente para eliminar os microrganismos sem modificar a composição nutricional. Em experimento com farinha de carne irradiada com doses de até 50 kGy, adicionada à ração para frangos de corte, Al-Masri (2003) não encontrou efeitos negativos sobre os valores da energia metabolizável da dieta, e tampouco sobre os aspectos biológicos dos órgãos digestivos.

A legislação brasileira (ANVISA, RDC n. 21, 26/01/2001) aprovou o “Regulamento Técnico para a Irradiação de Alimentos” que permite a irradiação de qualquer alimento, desde

³ Food Additive Petition for Radiation of Poultry Feed, FDA/Center for Veterinary Medicine, 1995.

que sejam respeitados os seguintes critérios: a dose máxima absorvida precisa ser inferior àquela que comprometa as propriedades funcionais e/ou os atributos sensoriais do alimento; a dose mínima absorvida tem que ser suficiente para alcançar o objetivo pretendido.

O projeto de Instrução Normativa SDA de janeiro de 2007 do MAPA (Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento), submetido à consulta pública pela Portaria nº 4 de 10 de janeiro de 2007, regulamenta o uso de radiação ionizante como tratamento fitossanitário com fins quarentenários. Tal medida foi adotada para impedir a introdução e a disseminação de pragas, nas modalidades de importação e exportação de plantas, parte de vegetais ou produtos de origem vegetal cujas doses são direcionadas a insetos e variam de 50 a 300 Gy (0,05 a 0,3 kGy). Não há legislação específica para irradiação de rações animais no Brasil.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As análises micológicas e micotoxicológicas foram realizadas nos laboratórios do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas (NPMM) do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. O processo de irradiação foi realizado na Divisão de Defesa Química, Biológica e Nuclear do Centro Tecnológico do Exército (CTEx), Guaratiba, Rio de Janeiro, RJ. As observações de Microscopia Eletrônica de Transmissão foram feitas no Departamento de Microscopia da Faculdade de Ciências Exatas, Físico-químicas e Naturais da Universidade Nacional de Rio Cuarto, Córdoba, Argentina.

3.1. Micobiota Natural de Ingredientes e Ração Avícola e Irradiação

3.1.1 Amostras

Amostras de fubá, farelo de soja e ração foram coletadas diretamente da linha de produção de uma granja avícola no município de Avelar, RJ. Foram realizados dois ensaios, provenientes de duas coletas distintas. Em cada ensaio, foram avaliados quatro grupos: controle (0 kGy), Grupo 1 (3,5 kGy), Grupo 2 (8 kGy) e Grupo 3 (15 kGy). Seis réplicas de 500g foram usadas para cada grupo, acondicionadas em sacos de polietileno e seladas. As amostras foram analisadas para determinar a contaminação fúngica inicial e logo em seguida, armazenadas a 4° C, para análises posteriores.

3.1.2 Determinação da atividade de água

A verificação da atividade de água (A_a) foi realizada através do equipamento AquaLab® modelo CX 2, de acordo com o procedimento descrito a seguir:

Após estabilizar o equipamento por uma hora, realizou-se a calibração com uma solução de NaCl 6M, cuja A_a é 0,760 e água destilada, a qual tem A_a igual a 1. A solução de NaCl foi selecionada por possuir A_a próxima ao esperado para ração avícola. Cada amostra foi colocada em recipiente próprio preenchendo cerca de 1/3 de sua capacidade e foram efetuadas três leituras. Calculou-se a média aritmética das leituras, obtendo-se a A_a média da amostra.

3.1.3 Contagem, isolamento e identificação da micobiota contaminante

As amostras foram levadas ao laboratório e analisadas quanto à micobiota contaminante, antes de serem fracionadas para o processo de irradiação. A enumeração quantitativa dos propágulos de fungos filamentosos e leveduras foi realizada segundo metodologia de diluição seriada em placas (PITT; HOCKING, 1997), com água peptonada estéril a 0,1%, sendo expressa por unidades formadoras de colônia por grama de amostra ($ufc\ g^{-1}$). Foram utilizados os seguintes meios de cultivo: dichloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) para contagem geral (KING et al. 1979, modificado por PITT; HOCKING, 1997); agar dichloran com 18% de glicerol (DG18) um meio seletivo para fungos xerofílicos (HOCKING; PITT, 1980) e agar dichloran cloranfenicol peptona (DCPA) para isolamento de *Fusarium*. As placas foram incubadas a 28°C por 5 a 7 dias em estufa BOD Ética. Procedeu-se à contagem das placas contendo de 10 a 100 colônias (DALCERO et al., 1997).

Feita a contagem, os gêneros fúngicos foram identificados por avaliação das características macroscópicas da colônia e através de microscopia óptica. Fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram repicados em tubos com agar extrato de malte (MEA) inclinado, enquanto representantes de *Fusarium* foram isolados em agar folhas de cravo (AFC), para posterior identificação das espécies.

3.1.3.1 Identificação das espécies do gênero *Aspergillus*

Foram usadas as chaves taxonômicas de Pitt e Hocking (1997) e Klich (2002) para o gênero *Aspergillus* baseadas na sementeira padrão, a partir do isolado em agar semi-sólido, em três meios básicos: agar Czapek extrato de levedura (CYA); agar Czapek extrato de levedura com 20% de sacarose (CY20S) e agar extrato de malte (MEA), os quais foram incubados por sete dias, conforme a Figura 4.

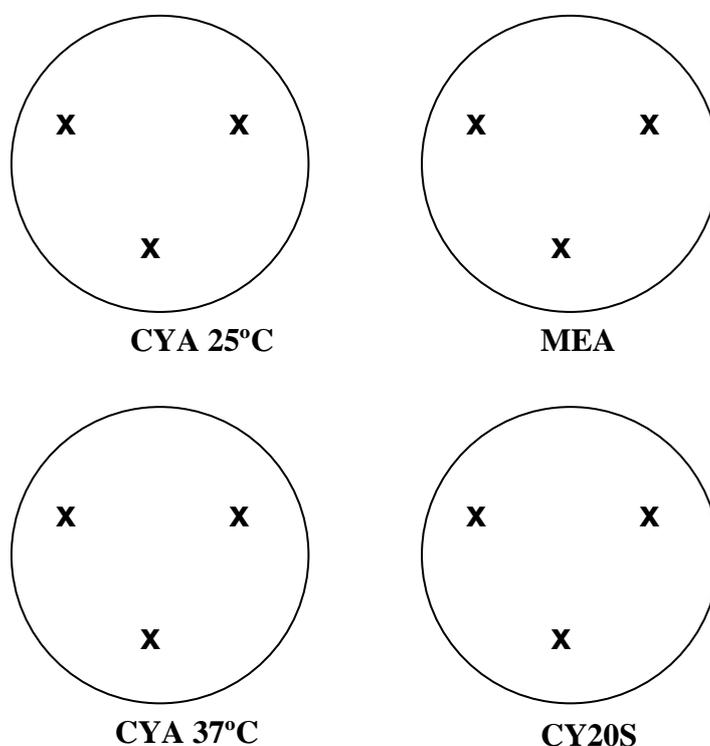


Figura 4. Esquema de incubação de cepa de *Aspergillus* spp, inoculada em três pontos equidistantes, a ser identificada nos meios MEA, CY20S, ambos a 25°C, e CYA em dois regimes de temperatura: 25 e 37°C, segundo Klich (2002).

3.1.3.2 Identificação das espécies do gênero *Penicillium*

As chaves propostas por Pitt e Hocking (1997) foram utilizadas, baseadas na sementeira em três meios básicos: agar Czapek extrato de levedura (CYA); agar extrato de malte (MEA) e agar nitrato com 25% de glicerol (G25N), sendo estes meios incubados de acordo com o seguinte regime: a) As placas de CYA foram incubadas por sete dias em três temperaturas diferentes (5, 25 e 37°C); b) Duas placas de MEA e uma de G25N foram incubadas a 25°C; c) Para maior eficiência e aproveitamento do sistema, foram inoculadas nas placas de Petri duas cepas diferentes a serem testadas, conforme o esquema da Figura 5.

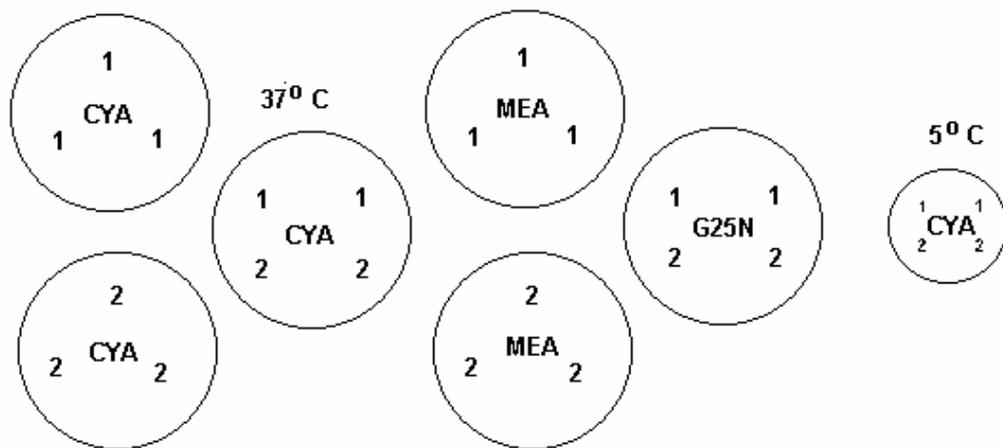


Figura 5. Esquema de identificação simultânea de duas cepas de *Penicillium* spp. nos meios: MEA, G25N e CYA em três regimes de temperatura (5, 25 e 37°C), segundo Pitt e Hocking (1997).

3.1.3.3 Identificação das espécies do gênero *Fusarium*

A partir do meio de cultivo AFC, realizaram-se isolamentos monospóricos em placas de Petri com agar água. Destes retirou-se conídios germinados que foram repicados para outra placa com AFC e para tubo de ensaio com agar batata dextrose (ABD). Os cultivos foram incubados por duas semanas sob ciclo alternado de 12 horas de luz branca / luz negra a 25° C. A identificação das cepas se realizou segundo chave taxonômica proposta por Nelson et al. (1983).

3.1.4 Irradiação

O irradiador utilizado pertence ao tipo *cavidade blindada*, com fonte movimentada por sistema pneumático (Figura 6). A atividade atual de sua fonte de ^{137}Cs é de 56 kCi (2×10^{15} desintegrações /segundo) e gera uma taxa de dose máxima de $2,0 \text{ kGy h}^{-1}$. O volume útil total é distribuído em duas câmaras, de aproximadamente 80 litros. Os tempos de irradiação foram calculados para cada dose, usando-se um programa especialmente desenvolvido para esta finalidade, que leva em conta o decaimento natural da fonte, a altura, geometria e densidade das amostras e baseia-se no mapeamento dosimétrico do Irradiador Gama do CTEX (VITAL, 2000a,b). A incerteza total nas doses foi de $\pm 8\%$, levando em consideração a distribuição de taxa de dose e a alocação das amostras na gaveta do irradiador.

As amostras dos grupos 1, 2 e 3 receberam doses de 3,5 kGy, 8 kGy e 15 kGy, respectivamente. O grupo controle não foi irradiado. Terminado o processo de irradiação, as amostras retornaram ao laboratório do NPMM, onde foram armazenadas à temperatura de 25-30°C. Após sete dias e, sob condições assépticas, foram submetidas à avaliação da micobiota, como descrito no item 3.1.3. Entretanto, a contagem foi realizada respeitando-se o critério de sobrevivência, ou seja, contaram-se todas as colônias.

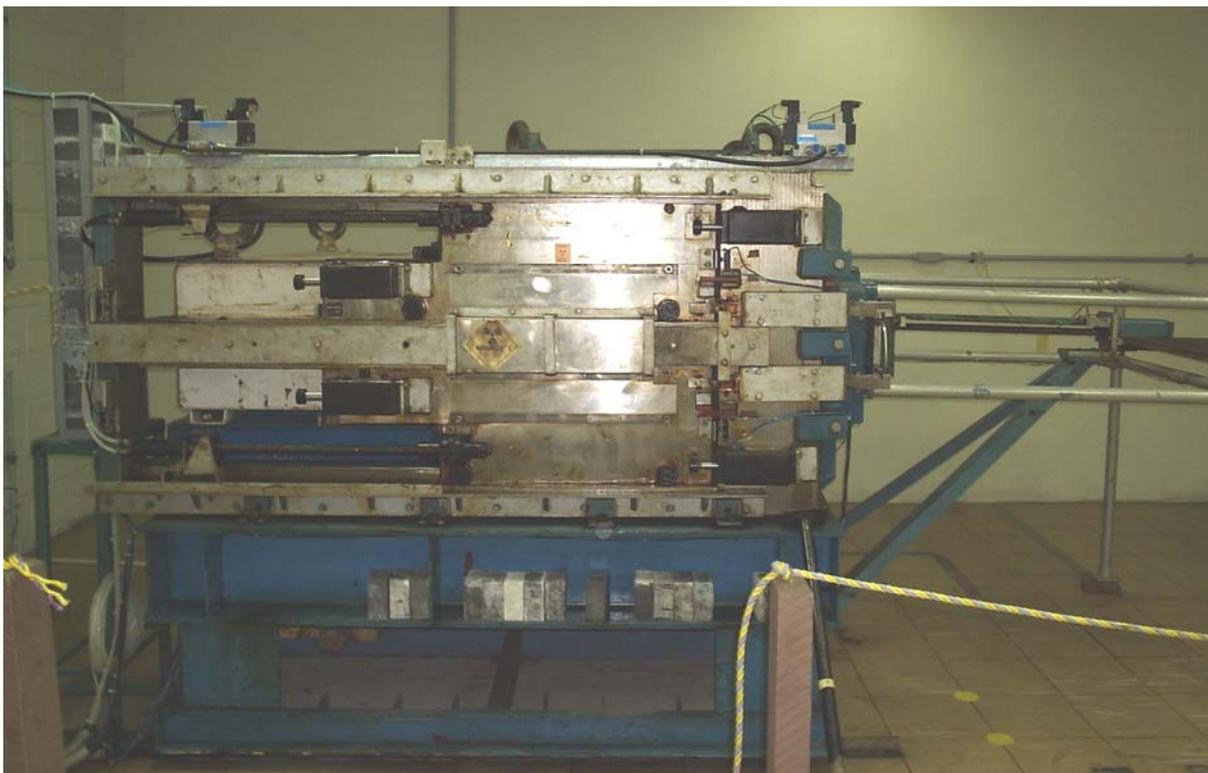


Figura 6. Irradiador Gama com fonte de céσιο-137 – DDQBN/CTEx, RJ.

Para o 1º ensaio, triplicatas foram armazenadas à temperatura ambiente (25-30°C) até completar 45 dias. Findo o período, foram também submetidas à avaliação quanto à micobiota.

3.2 Radiossensibilidade de Cepas Fúngicas de Referência

3.2.1 Cepas de referência

As cepas de *Aspergillus* spp. foram cedidas pelo departamento de Biologia da Fundação Oswaldo Cruz, originalmente obtidas da American Type Culture Collection (ATCC), Marassas, USA e do Agriculture Research Service Culture Collection (Peoria, USA), antigo National Center for Agricultural Utilization Research (NRRL). Foram usadas as seguintes cepas: *A. niger* (ATCC 1004), *A. ochraceus* (NRRL 3174), *A. flavus* (NRRL 5520) e *A. parasiticus* (NRRL 2999). Foi usada também a cepa de *A. carbonarius* (UFPE 1546), isolada pela Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

3.2.2 Irradiação em meio de cultura

As cepas foram inoculadas em um ponto central de placas de Petri descartáveis com o meio CYA e irradiadas após cinco dias de incubação a 28°C. Foram utilizadas as doses de 0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5 kGy. A dose 0 kGy refere-se ao grupo controle, ou seja, testemunha não irradiada, o qual foi mantido sob as mesmas condições das placas tratadas por irradiação. Um total de 30 placas foi utilizado para cada cepa fúngica, sendo três placas por dose. A verificação da viabilidade das cepas, após 24 horas do processo de irradiação, deu-se por suspensão de toda a colônia em 1 ml de salina estéril. A partir das suspensões foram retiradas alíquotas de 0,1 ml, distribuídas em placas de Petri com meio CYA e incubadas a 28 °C por seis dias.

3.2.3 Irradiação em milho

Foi utilizado milho picado degerminado, com granulometria média de 2 mm usado na alimentação animal, o valor nutricional se encontra na Tabela 3. Todo o substrato necessário ao experimento foi hidratado com água destilada e armazenado por 24 horas a 4° C, submetido à homogeneização periódica para a estabilização e uniformização da A_a. A A_a foi verificada ao final desse período através do procedimento descrito no item 3.1.2. Frascos Erlenmeyer com capacidade de 125 ml, contendo 50 g de milho cada, foram autoclavados a 120°C por 20 minutos, para garantir eliminação da microbiota inicial. Para o controle do processo de esterilização realizado anterior à inoculação, frascos sem inóculo foram submetidos às mesmas condições de incubação.

Tabela 3. Níveis de garantia do milho picado degerminado.

Composição		Nível (%)
Umidade	máx.	12
Proteína bruta	mín.	8
Extrato etéreo	mín.	1
Matéria fibrosa	máx.	1
Matéria mineral	máx.	1

Os inóculos fúngicos utilizados foram provenientes do crescimento das cepas sobre milho por sete dias a 28°C. Desse crescimento inicial, foram feitas suspensões em salina estéril e inoculado 100µl em cada frasco (10^4 a 10^5 ufc ml⁻¹), os quais foram incubados por cinco dias a 28° C.

Foram avaliadas 10 doses de radiação gama (2,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 8,0) além do controle 0 kGy, para cada uma das cepas de referência, todos em triplicata. Um dia após a irradiação, o milho picado foi submetido à contagem fúngica. Para tal, foi realizada a técnica de diluição seriada, onde se pesou, asépticamente, 10 g do milho picado contaminado e adicionou-o em 90 ml de água peptonada a 0,1% estéril. Submeteu-se a diluição 10^{-1} à agitação por 3 minutos, anterior a diluição seriada. A partir das diluições, inoculou-se nas placas com meio DG18 0,1ml e, fez-se o espalhamento de superfície com o auxílio da alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 28° C por até 10 dias. A enumeração fúngica foi realizada respeitando-se o critério de sobrevivência, ou seja, contaram-se todas as colônias. A resistência fúngica à irradiação também foi estudada pelo plaqueamento direto do milho em placa com o meio DG18 de acordo com Pitt e Hocking (1997).

Foram feitos isolamentos das cepas que tornaram a crescer após serem irradiadas. Ao apresentarem diferenças na morfologia, essas cepas foram encaminhadas para avaliação fisiológica, morfológica e molecular, em conjunto com as cepas originais, não irradiadas.

3.2.4 Avaliação morfológica por macroscopia e microscopia óptica

As cepas irradiadas e os controles foram comparados macroscopicamente e por microscopia óptica, de acordo com a chave taxonômica de Klich (2002).

3.2.5 Microscopia eletrônica de transmissão

As amostras fúngicas avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foram obtidas a partir de cultivos de sete dias em MEA. As amostras foram pré-fixadas em glutaraldeído 2,5 % em “sodium phosphate buffer” (PBS, pH 7,4), durante 24 horas a

temperatura de 4° C, seguida por dupla lavagem com PBS. Foram então, fixadas em tetróxido de ósmio 2% em PBS (pH 7,4) por cerca de oito horas à temperatura ambiente (esperou-se até o enegrecimento das amostras), seguiu-se dupla lavagem com PBS. A desidratação das amostras foi realizada pela passagem por uma série de concentrações de acetona-água (30 min. em 50%, 30 min. em 70%, 30 min. em 90 % e 90 min. a 100%). O material desidratado foi submetido à pré-inclusão com Epon 812. Para tal, utilizou-se a mescla de duas soluções (A - EMBED 812: 5 ml + DDAS: 8ml; B - EMBED 812: 8 ml + DDAS: 7ml) diluída 1:1 com acetona absoluta. As amostras foram incubadas por 24 horas, à temperatura ambiente nesta solução. Para a inclusão foi usada a mescla das soluções A e B, agregadas de 16 gotas do catalizador DMP-30, e incubação por 48 horas a 56° C, para a polimerização da resina. Os cortes foram obtidos a partir de um ultramicrotomo (Sorvall MT 1 A). A fim de encontrar uma zona de interesse dentro do taco de inclusão, talhou-se uma pirâmide truca. Primeiramente, foram obtidos cortes de aproximadamente 1 µm com uma lâmina de vidro, corados com azul de toluidina e observados ao microscópio óptico. Uma vez eleita a zona a estudar, retalhou-se a pirâmide e realizaram-se os cortes ultrafinos (20 a 60 nm) com lâmina de diamante (Pelco®). Os cortes foram montados em pequenas lâminas de cobre (grillas de 200-250 mesh), submetidos a contraste por dupla coloração com acetato de uranilo e citrato de chumbo. Observou-se ao microscópio eletrônico (Elmiskop 101 – Siemens).

3.2.6 Avaliação da capacidade toxígena de *Aspergillus* spp.

Utilizou-se a metodologia descrita por Téren et al. (1996), com algumas modificações, para avaliar a capacidade toxígena das cepas controle e irradiadas. Cada cepa se desenvolveu em 20 ml de caldo extrato de levedura sacarose (YES), a 30°C durante 10 dias, sob escuridade. O cultivo foi filtrado através de papel de filtro Whatman N°1 para separar o micélio e os conídios fúngicos do cultivo líquido. A extração de AFB₁ e OTA se realizou mesclando 1 ml de cultivo com 1 ml de clorofórmio e centrifugando a 4000 rpm, durante 10 min. A fase clorofórmica foi transferida a um tubo Eppendorf limpo e se evaporou até *secura* com nitrogênio. O extrato seco foi conservado a 4° C até o momento de análise.

Para AFB₁, ressuspendeu-se o extrato seco com 200 µl de clorofórmio. Foi realizada a cromatografia em camada delgada (CCD) de cada amostra, a fase móvel empregada foi composta de clorofórmio: acetona (9:1 v/v). A determinação da concentração da toxina foi alcançada por comparação da fluorescência sob luz UV entre amostras e o padrão (AFB₁ com 2 µg ml⁻¹).

A detecção e quantificação da OTA se realizaram utilizando um sistema de detecção com fluorescência por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em cromatógrafo Hewlett Packard Serie 1100, seguindo a metodologia proposta por Scudamore e McDonald (1998). O extrato seco foi ressuspendido em 200 µl de fase móvel (acetonitrila: água: ácido acético, 57: 41: 2 v/v/v). As separações cromatográficas foram desenvolvidas em uma coluna de fase reversa C₁₈ (150 x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula; Phenomenex, Luna), conectada a uma pré-columna Supelguard LC-ABZ (20 x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula, Supelco). O fluxo da fase móvel foi de 1 ml min⁻¹. O comprimento de onda de excitação e emissão usados foi de 330 e 460 nm, respectivamente. As soluções padrão foram preparadas dissolvendo OTA pura (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO USA, pureza >99%) em metanol. O limite mais baixo de detecção da técnica utilizada foi de 1 ng g⁻¹. A quantificação de OTA se realizou por medição dos picos e sua extrapolação a uma curva de calibração obtida mediante o uso de três soluções padrão de OTA (Figura 7).

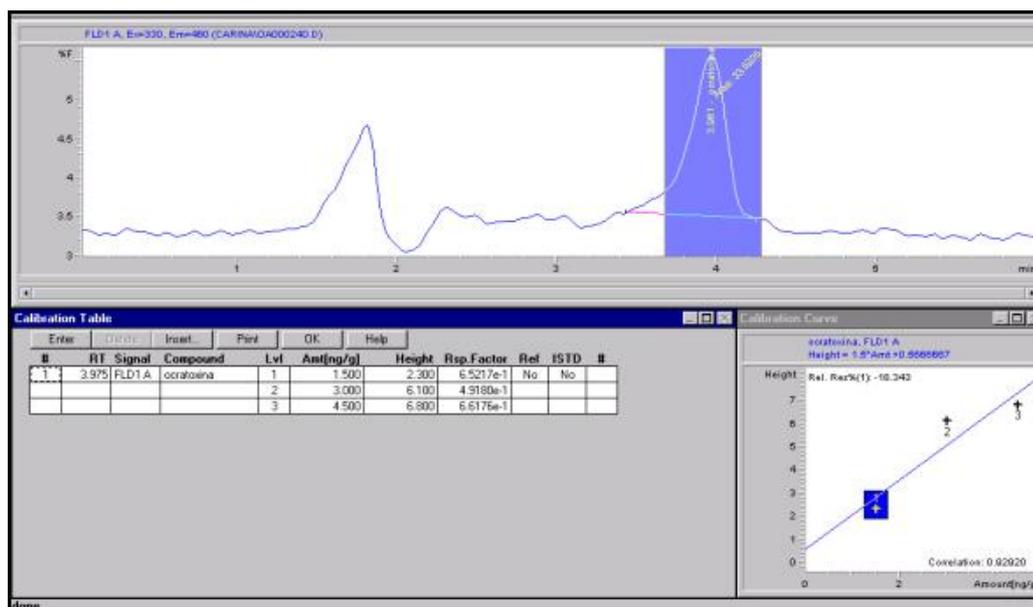


Figura 7. Cromatograma de uma solução padrão de ocratoxina A de 3 ng ml⁻¹.

3.2.7 Avaliação genética pela técnica de polimorfismo de ADN amplificado ao acaso

Utilizou-se a técnica de polimorfismo de ADN amplificado ao acaso (RAPD) com o objetivo de avaliar a variabilidade genética entre cepas de *Aspergillus* spp. antes e após serem submetidas ao processo de irradiação. Foram analisadas as mesmas cepas padrão (dose 0 kGy) e, os isolados irradiados, repicados a partir do milho por diluição seriada e através de plaqueamento direto.

3.2.7.1 Produção de biomassa fúngica

Uma suspensão de esporos em Tween 20 de cada cepa foi transferida para 50 ml de meio (Sacarose 1,5%, Vogel 50X 2ml 100ml⁻¹), em frascos Erlenmeyer de 250 ml. A incubação ocorreu a 25° C por 2 a 4 dias, em um agitador rotatório (150 rpm). O micélio foi filtrado (filtros Ken AG, Ashland, Ohio, USA), lavado com água destilada estéril e seco com nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas a -20° C, em tubos Eppendorf, até a extração do ADN.

3.2.7.2 Extração e purificação do ADN

O ADN genômico foi purificado a partir de lise com tampão (2% tritón, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA). A 100 µl de micélio juntou-se 100 µl de pérolas e 600 µl de tampão, agitou-se em Vortex por 10 min. Centrifugou-se a 8000 rpm por 1 min. O sobrenadante foi coletado e a extração feita com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1 v/v/v). Após homogeneização, centrifugou-se a 13000 rpm por 10 min e recuperou-se a fase superior. Nova extração foi realizada com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v), com homogeneização e posterior centrifugação a 13000 rpm por 10 min, recuperando-se a fase superior. Foi feita a precipitação em 2 volumes de etanol absoluto frio e 1/10 de acetato de sódio 3M a -20° C O/N. Uma nova centrifugação a 13000 rpm foi realizada por 20 min. Ressuspendeu-se em 50 µl de tampão TAE.

A integridade do ADN genômico extraído e purificado verificou-se por eletroforese a 100 V durante 30 min em gel de agarose (Invitrogen) a 0,8 % em tampão TAE 1X (Tris-acetato 40 mM e EDTA 1 mM) com 1 µg ml⁻¹ de brometo de etídio e se visualizou mediante luz

ultravioleta. O ADN foi quantificado usando o programa Kodak Digital Science ID contra o marcador de peso molecular λ -HindIII (Invitrogen) e se conservou em TAE a -20°C .

3.2.7.3 Amplificação por reação em cadeia de polimerase

Para a amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR) ao azar dos genomas fúngicos mediante a técnica de RAPD se usaram os partidores R108 (5'-GTATTGCCCT), R151 (5'-GCTGTAGTGT) e UBC90 (5'-GGGGGTTAGG), utilizados previamente para distinguir isolados de *A. fumigatus* (LIN et al. 1995). Na amplificação, se usou entre 10-50 ng de DNA genômico. A solução de reação se preparou em um volume de 25 μl com um dos partidores a uma concentração de 400 nM, 100 μM de cada dNTP e 2,5 U de Taq Polimerase (Invitrogen) em tampão de PCR 1X, suplementado com MgCl_2 2 mM e BSA a 120 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Em todos os casos, foram preparados controles negativos (reações idênticas, mas sem ADN). Os produtos de amplificação foram corridos em eletroforese a 100 V durante 30 minutos em gel de agarose (Invitrogen) a 1,2% com tampão TAE 1X e visualizados com brometo de etídio (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Para determinar o tamanho do fragmento foi utilizado o marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen). O programa de amplificação por PCR consta de uma etapa de desnaturação inicial de 5 min a 94°C seguida por 40 ciclos de três passos cada um: desnaturação de 1 min a 94°C , hibridização de 1 min a 36°C e uma extensão de 2 min a 72°C . Finalmente, se analisou uma extensão de 5 min a 72°C . Todas as amplificações se desenvolveram em um termociclador PTC-150 Minicycler (MJ Research, Inc.).

3.2.7.4 Análise dos perfis

Os perfis RAPD foram comparados visualmente e as bandas obtidas na amplificação mediante PCR se traduziram a uma matriz binária de presença/ausência. As distâncias genéticas entre as amostras foram calculadas usando o índice de coincidência simples e a topologia do árbol foi determinada mediante análises de UPGMA (LI, 1981) com o programa Treecon (VAN DE PEER; DE WATCHER, 1994). A robustez do agrupamento se validou mediante análises de bootstrap com 1000 interações.

3.3 Irradiação de Aflatoxina B₁ em Solução

Padrão de AFB₁ em metanol, foi diluído para a concentração de 500 ng ml^{-1} (ppb) em água ultra pura, perfazendo um volume total de 500 μl . Foram utilizados tubos Eppendorf de 1,5 ml de capacidade, revestidos com papel laminado para proteger a micotoxina da luz direta e submetidos às doses 0, 4 e 8 kGy, em triplicata.

A incerteza total na dose de radiação gama foi de $\pm 8\%$, levando em consideração a distribuição de taxa de dose e a distribuição das amostras na gaveta do irradiador. A dose máxima viável do irradiador foi calculada em 1,75 kGy h^{-1} .

A avaliação quanto à concentração de AFB₁ após a irradiação foi feita por cromatografia em camada delgada (CCD), como se segue:

Para a fase estacionária foram empregadas cromatofolhas de sílica gel 60 de 20 x 20 cm com 0,2mm de espessura (Merck), previamente ativadas a 120°C por uma hora. Os tratamentos foram aplicados com o uso de microseringa de 5 μl , a uma distância de 1,5 cm entre cada aplicação e 2,0 cm acima do bordo inferior da cromatofolha. Foi usada a fase móvel composta por tolueno: acetato de etila: clorofórmio: ácido acético (70:50:50:10), como proposta por Gimeno (1980). Procedeu-se à leitura em cromatovisor (Prodicil®, Curitiba, PR, Brasil) equipado com lâmpada UV de comprimento de onda de 365nm.

3.4 Análise Estatística

Para avaliar o efeito de doses crescentes de radiação gama sobre a microbiota natural de ingredientes e ração avícola, assim como para as cepas irradiadas sobre milho, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As contagens fúngicas de unidades formadoras de colônias por grama (ufc g^{-1}) foram transformadas a $\log_{10}(x + 1)$ para obter homogeneidade de variância. As médias dos tratamentos foram comparadas usando o teste de mínima diferença significativa de Fisher (LSD) (QUINN; KEOUGH, 2002). A análise foi conduzida através do procedimento PROC GLM do *software* estatístico SAS (SAS Institute, Cary, NC).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Micobiota Natural de Ingredientes e Ração Avícola

As A_a das amostras de farelo de soja, fubá e ração são listadas na Tabela 4. O conhecimento desses valores é necessário em função da proporção de água no alimento ter um papel importante na destruição microbiana por energia gama, desde que a radiólise da água leva a formação de radicais livres altamente reativos (BLANK; CORRIGAN, 1995).

Tabela 4. Valores de atividade de água para as amostras de ingredientes e ração avícola.

Substrato	A_a (média \pm s)	
	1º ensaio	2º ensaio
Farelo de soja	0,625 \pm 0,002	0,651 \pm 0,001
Fubá	0,676 \pm 0,002	0,697 \pm 0,002
Ração	0,659 \pm 0,002	0,754 \pm 0,002

Os valores encontrados para A_a estão dentro da faixa esperada para estes substratos. A ração apresentou um valor mais alto no segundo ensaio, para o qual foi coletada do silo que alimenta diretamente o comedouro das aves, enquanto que para o primeiro ensaio foi retirada da fábrica, assim como as demais amostras.

As rações animais, compostas de misturas de farelos, têm sua micobiota avaliada principalmente por plaqueamento mediante diluição seriada (MAGNOLI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; ROSA et al., 2006). No presente trabalho, a contagem foi realizada considerando fungos filamentosos e leveduras em separado e como contagem total.

A contagem total da micobiota das amostras anterior à radiação, em geral, esteve próxima ao limite estipulado para a qualidade higiênica que é de 1×10^4 ufc g^{-1} (GMP, 2005). O meio DRBC foi utilizado por ser considerado de eleição para contagem fúngica geral (PITT; HOCKING, 1997). Os valores encontrados neste trabalho são inferiores ao observado por Rosa et al. (2006), os quais ao avaliarem rações avícolas no Estado do Rio de Janeiro entre os anos de 1998 e 2000, encontraram níveis superiores a 1×10^5 ufc g^{-1} , em grande parte das amostras. Entretanto, níveis moderados de contaminação fúngica da ordem de 10^3 ufc g^{-1} foram observados por Oliveira et al. (2006), ao estudarem a micobiota de rações avícolas também provenientes do Rio de Janeiro, cujas amostras avaliadas foram coletadas nos anos de 2003 e 2004. O nível de contaminação pode variar em função das condições climáticas do período de coleta, como também sofre grande influência das condições de processamento do alimento. Percebe-se, após vários estudos desenvolvidos com rações avícolas desta região (RIBEIRO et al., 2000; ROSA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006; FRAGA, et al., 2007), que as fábricas têm melhorado seu controle de qualidade, o qual reflete em uma diminuição da contaminação fúngica. Fraga et al. (2007) analisaram milho e ração acabada para aves, a partir de uma fábrica, mensalmente durante um ano. Esses autores relatam uma expressiva redução da contaminação fúngica nos últimos seis meses de análise, em função de melhorias implantadas no processamento da ração, tais como a eliminação de resíduos do processo anterior.

A análise dos propágulos fúngicos viáveis de rações pode ser usada como um indicador útil da contaminação fúngica. No entanto, é importante considerar, além do encontro total da micobiota contaminante, o número de colônias de espécies potencialmente toxígenas. As espécies toxígenas do gênero *Aspergillus* spp. frequentemente isoladas de ração: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus* e *A. niger* são conhecidamente

xerofílicas (PITT; HOCHKING, 1997), por esse motivo foi realizada a contagem em meio DG18, o qual possui baixa A_a . A partir deste meio, foram obtidas contagens médias da ordem de $8,7 \times 10^3 \pm 1,5 \times 10^3$ e $4,5 \times 10^4 \pm 8,7 \times 10^3$ ufc g^{-1} de fungos filamentosos em fubá, no 1º e 2º ensaios respectivamente. Para o farelo de soja o encontro foi de $3,0 \times 10^3 \pm 7,5 \times 10^2$ e $4,1 \times 10^3 \pm 6,5 \times 10^2$ ufc g^{-1} . Na ração, foram encontrados fungos filamentosos na ordem de $3,6 \times 10^4 \pm 4,6 \times 10^3$ e $8,1 \times 10^4 \pm 7,2 \times 10^3$ ufc g^{-1} . Esses valores observados são próximos aos da contagem total de filamentosos no meio DRBC, fato que reforça a importância das espécies xerofílicas como contaminantes de ingredientes e ração.

O isolamento de leveduras em meio DRBC foi de $3,0 \times 10^3 \pm 1,0 \times 10^3$ e $1,1 \times 10^3 \pm 1,2 \times 10^2$ ufc g^{-1} para o fubá; $3,0 \times 10^2 \pm 1,0 \times 10^2$ e não foi detectada no 2º ensaio no farelo de soja; $3,9 \times 10^4 \pm 8,1 \times 10^3$ e $4,3 \times 10^4 \pm 3,6 \times 10^3$ ufc g^{-1} para a ração. A quantidade de leveduras isoladas indica sua relevante participação no processo de deterioração de ingredientes e ração, em função de seu metabolismo fermentativo (MAGNOLI et al., 2005).

Em relação à diversidade encontrada na microbiota, a partir das amostras de farelo de soja, foram isolados os gêneros *Aspergillus* spp. (*A. flavus*, *A. candidus*, *A. clavatus*, *A. fumigatus*, *A. niger* var. *niger*, *A. restrictus*, *A. versicolor*), *Cladosporium* spp., *Eurotium* spp. (*E. amstelodami*), *Fusarium* spp. (*F. verticillioides*), *Penicillium* spp. e fungos da ordem Mucorales (*Mucor* spp.). Nas amostras de fubá, houve predominância de isolados do gênero *Fusarium* spp., com destaque para *F. verticillioides*, seguido por isolados de *F. solani*. Isolou-se também *Aspergillus* spp. (*A. flavus*, *A. candidus*, *A. melleus*), *Eurotium* spp., *Penicillium* spp. (*P. rugulosum*, *P. viridicatum*) e *Cladosporium* spp. A avaliação da ração mostrou o crescimento de *Aspergillus* spp. (*A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. tamari*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. versicolor*, *A. flavipes*, *A. fumigatus*), *Eurotium* spp. (*E. amstelodami*), *Penicillium* spp. (*P. janthinellum*, *P. verruculosum*, *P. funiculosum*, *P. citrinum*, *P. purpurogenum*), *Curvularia* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., este último com predominância de *F. verticillioides*.

Muitas das espécies fúngicas isoladas destes substratos estão associadas com a deterioração e são potenciais produtoras de micotoxinas. Seu isolamento em rações animais tem sido informado por outros pesquisadores (DALCERO et al, 1998; DALCERO et al, 2002; ROSA et al., 2006). A presença de espécies xerofílicas como o *E. amstelodami* é relevante em substratos cujo teor de umidade é crítico para a manutenção da qualidade. Pois esses microrganismos, em suas reações metabólicas, produzem água, o que ocasiona um aumento de umidade do substrato, favorecendo o desenvolvimento de outras espécies fúngicas.

A. fumigatus é considerado o principal agente causal de aspergilose invasiva em humanos e animais, em especial as aves, com predileção pelo aparelho respiratório. O seu isolamento a partir da ração é preocupante, pois além de patógeno, produz vários metabólitos tóxicos. Dentre estes, destaca-se a gliotoxina, potente imunossupressora, genotóxica, citotóxica e com efeitos apoptóticos. Tem sido encontrada uma alta frequência de cepas toxígenas, Boudra e Morgavi (2005) avaliaram 40 isolados e todos produziram duas ou mais toxinas, ao monitorarem gliotoxina, verruculogem, fumagilina e ácido helvólico.

O isolamento de espécies fúngicas toxígenas da ração pode ser um indicativo de sua possível contaminação por micotoxinas (OLIVEIRA et al., 2006). A espécie micotoxígena dominante é estreitamente relacionada às condições meteorológicas da região de cultivo. Para o milho, tem crescido a preocupação com *F. verticillioides* e fumonisinas, cuja condição ótima varia de 25 a 30°C, sendo a A_a para crescimento e produção de toxina respectivamente de: >0,90 e >0,93. No entanto, em condições mais quentes e mais secas, *A. flavus* é de maior importância, cresce bem de 19 a 35°C e A_a 0,73, produz aflatoxinas com 0,85. *A. flavus* pode produzir, além das aflatoxinas, as micotoxinas ácido ciclopiazônico (ACP) e aflatrem, o que contribui para a toxicidade de alimentos infestados por esse fungo. O ACP é um inibidor específico da ATPase cálcio-dependente no retículo sarcoplasmático, que resulta em alteração nos níveis de Ca^{++} celular. Frangos alimentados com ração contendo 100 ppm de ACP

apresentaram proventriculite, necrose de mucosas, hepatite e inflamação de miocárdio, com significativa taxa de mortalidade. Aflatrem tem uma potente ação tremorgênica e pode ocasionar distúrbios neurológicos (DURAN et al., 2007).

Toxinas produzidas por *Aspergillus* são de grande preocupação para a saúde animal. No entanto, a alta frequência observada, neste trabalho, de *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp, em especial *F. verticillioides*, constitui mais um potencial fator de risco. Uma grande variedade de compostos tóxicos tais como: citrinina, patulina, penitrem A e fumonisinas podem ser produzidos e sua toxidez tem sido verificada em animais de laboratório e domésticos.

4.2 Irradiação de Ingredientes e Ração Avícola

Fubá, farelo de soja e ração avícola acabada foram submetidos ao processo físico de descontaminação por exposição à radiação gama. Os dois primeiros substratos foram selecionados por corresponderem aos principais aportes energético e protéico em rações avícolas, respectivamente. As doses de radiação utilizadas conseguiram reduzir a microbiota dos ingredientes e da ração, cuja redução foi intensificada com o aumento da dose. Nas Tabelas 5, 6 e 7, coloca-se o efeito de diferentes doses de radiação sobre a contagem das amostras do primeiro ensaio de fubá, farelo de soja e ração, respectivamente, avaliados por contagem em meio DRBC.

Tabela 5. Influência da dose de radiação gama sobre a microbiota natural de fubá, 1º ensaio.

Fonte	GL	QM	F	Pr>F
Dose	3	32.07736124	232.94*	0.0001
Fungo	2	0.54176705	3.93**	0.0333
Dose x fungo	6	0.18485938	1.34	0.2775
Erro	24	0.13770811		

Nota: GL, grau de liberdade; QM, quadrado médio; F-Snedecor; *significativo P<0,001; ** P<0,05.

Dose (kGy)	Unidades formadoras de colônias por grama (ufc g ⁻¹) ± s		
	Filamentosos	Leveduras	Total
0	1,5 x 10 ⁴ ± 1,5 x 10 ³ a	3,0 x 10 ³ ± 1,0 x 10 ³ b	1,8 x 10 ⁴ ± 1,5 x 10 ³ a
3,5	1,0 x 10 ² ± 0 cd	1,0 x 10 ² ± 1,0 x 10 ² d	2,0 x 10 ² ± 1,0 x 10 ² c
8,0	Nd e	Nd e	Nd e
15	Nd e	Nd e	Nd e

Os dados foram apresentados como média ± s. As contagens foram transformadas a log₁₀ (x+1) e analisadas pelo teste de mínima diferença significativa de Fisher (LSD). Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente (p<0,001).

Nd: não detectado.

Limite de detecção: 1 x 10² ufc g⁻¹.

Na Tabela 5, é possível verificar uma redução significativa (p<0,001) entre as contagens fúngicas do grupo controle e irradiado com 3,5 kGy. Essa redução foi da ordem de 2 ciclos log para filamentosos e contagem total e, de 1 ciclo log para leveduras. Verificou-se que o efeito fungo também foi significativo (p<0,05). Vale ressaltar que a contagem de leveduras na dose 0 kGy também foi inferior à de filamentosos. Houve diferença significativa entre as doses 3,5 kGy e 8 kGy, sendo que esta última eliminou completamente a microbiota contaminante do fubá.

Tabela 6. Influência da dose de radiação gama sobre a microbiota natural de farelo de soja, 1º ensaio.

Fonte	GL	QM	F	Pr>F
Dose	3	20.43328666	8622.99*	0.0001
Fungo	2	2.38166582	1005.08*	0.0001
Dose x fungo	6	0.93583818	394.93*	0.0001
Erro	24			

Nota: GL, grau de liberdade; QM, quadrado médio; F-Snedecor; *significativo P<0,001.

Dose (kGy)	Unidades formadoras de colônias por grama (ufc g ⁻¹) ± s		
	Filamentosos	Leveduras	Total
0	3,4 x 10 ³ ± 4,5 x 10 ² a	3,0 x 10 ² ± 1,0 x 10 ² b	3,7 x 10 ³ ± 4,0 x 10 ² a
3,5	1,0 x 10 ² ± 0 c	Nd	1,0 x 10 ² ± 0 c
8,0	Nd	Nd	Nd
15	Nd	Nd	Nd

Os dados foram apresentados como média ± s. As contagens foram transformadas a log₁₀ (x+1) e analisadas pelo teste de mínima diferença significativa de Fisher (LSD). Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente (p<0,001). Nd: não detectado.

Limite de detecção: 1 x 10² ufc g⁻¹.

Assim como ocorreu com o fubá, para o farelo de soja a dose de 3,5 kGy reduziu significativamente as contagens e, neste substrato, com esta dose, não foi mais detectado o crescimento de leveduras. A redução foi da ordem de 1 ciclo log para os fungos filamentosos. A menor redução, em termos de ciclos log, em comparação com o fubá, deve-se a menor contaminação inicial do farelo de soja. Após submeter o farelo de soja a 8 kGy de radiação gama, nenhum crescimento foi observado.

Tabela 7. Influência da dose de radiação gama sobre a microbiota natural de ração, 1º ensaio.

Fonte	GL	QM	F	Pr>F
Dose	3	47.68091050	1990.88*	0.0001
Fungo	2	0.19030069	7.95**	0.0022
Dose x fungo	6	0.12478117	5.21**	0.0015
Erro	24			

Nota: GL, grau de liberdade; QM, quadrado médio; F-Snedecor; *significativo P<0,001; ** P<0,05.

Dose (kGy)	Unidades formadoras de colônias por grama (ufc g ⁻¹) ± s		
	Filamentosos	Leveduras	Total
0	3,4 x 10 ⁴ ± 4,0 x 10 ³ b	3,9 x 10 ⁴ ± 8,1 x 10 ³ b	7,3 x 10 ⁴ ± 7,0 x 10 ³ a
3,5	1,3 x 10 ³ ± 3,6 x 10 ² c	4,3 x 10 ² ± 4,2 x 10 ² d	1,7 x 10 ³ ± 7,7 x 10 ² c
8,0	Nd	Nd	Nd
15	Nd	Nd	Nd

Os dados foram apresentados como média ± s. As contagens foram transformadas a log₁₀ (x+1) e analisadas pelo teste de mínima diferença significativa de Fisher (LSD). Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente (p<0,001). Nd: não detectado.

Limite de detecção: 1 x 10² ufc g⁻¹.

Na ração, foi possível verificar diferença de intensidade na redução das contagens de viáveis entre os tipos fúngicos avaliados. Apesar da contaminação na dose 0 kGy ser bem próxima entre os fungos filamentosos e as leveduras, na ordem de 10⁴, a redução destes foi de 1 ciclo log e de 2 ciclos log, respectivamente, para a dose 3,5 kGy. Fato que sugere uma maior sensibilidade das leveduras, organismos unicelulares, quando comparadas aos fungos filamentosos.

Os resultados de redução da micobiota encontrados neste trabalho estão de acordo com a literatura. Refai et al. (1996), ao avaliarem o efeito sobre *A. ochraceus*, previamente inoculado (10^6 ufc g^{-1}) em ração, verificaram decréscimo na contagem com o aumento da dose e o fungo foi completamente inibido a 4 kGy. Irradiação com dose de 4 a 6 kGy foi reportada como capaz de inibir completamente a micobiota contaminante de alimentos e ração (AZIZ et al., 1990). E uma redução significativa na infecção fúngica em sementes de arroz foi observada com doses de até 3 kGy de radiação gama e, a depleção no crescimento foi dose dependente (MAITY et al., 2008). No entanto, a contaminação fúngica do guaraná em pó foi completamente eliminada apenas com 10 kGy (AQUINO et al., 2007), em função de ser um substrato com baixa A_a .

O efeito do tempo de armazenamento dos substratos após irradiação sobre a contagem fúngica foi avaliado por comparação do encontro de propágulos fúngicos aos 7 dias e 45 dias. Aos 45 dias as amostras do primeiro ensaio foram submetidas à nova avaliação quanto a A_a e a micobiota contaminante. O armazenamento foi realizado mantendo as amostras em sacos de polietileno selados, os mesmos usados para a irradiação, à temperatura ambiente (de 25 a 30° C). Os valores de A_a das amostras foram 0,705; 0,634 e 0,678 para fubá, farelo de soja e ração respectivamente.

A contagem fúngica comparada entre os dois períodos de armazenamento é expressa nas Tabelas 8, 9 e 10 para o fubá, farelo de soja e ração, respectivamente.

Tabela 8. Avaliação do tempo de armazenamento sobre a contagem fúngica de fubá submetido a doses de radiação gama.

Dose (kGy)	Tempo (dias)	Unidades formadoras de colônias por grama (ufc g^{-1}) \pm s					
		Filamentosos		Leveduras		Total	
0	7	$1,5 \times 10^4 \pm 1,5 \times 10^3$	a	$3,0 \times 10^3 \pm 1,0 \times 10^3$	a	$1,8 \times 10^4 \pm 1,5 \times 10^3$	a
	45	$3,8 \times 10^3 \pm 6,5 \times 10^2$	a	$2,3 \times 10^2 \pm 5,8 \times 10^1$	b	$4,1 \times 10^3 \pm 7,0 \times 10^2$	a
3,5	7	$1,0 \times 10^2 \pm 0$	bc	$1,0 \times 10^2 \pm 1,0 \times 10^2$	cd	$2,0 \times 10^2 \pm 1,0 \times 10^2$	bc
	45	Nd	e	$\leq 1,0 \times 10^2$	de	$<1,0 \times 10^2$	de
8,0	7	Nd	e	Nd	e	Nd	e
	45	$<1,0 \times 10^2$	de	Nd	e	$<1,0 \times 10^2$	de
15	7	Nd	e	Nd	e	Nd	e
	45	Nd	e	Nd	e	Nd	e

Os dados foram apresentados como média \pm s. As contagens foram transformadas a $\log_{10}(x+1)$ e analisadas pelo teste de mínima diferença significativa de Fisher (LSD). Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente ($p < 0,001$).

Nd: não detectado.

Limite de detecção: 1×10^2 ufc g^{-1} .

Ao realizar a comparação entre a contagem obtida do fubá aos sete dias após a irradiação com aquela realizada após 45 dias de armazenamento, verifica-se que para a dose 3,5 kGy, houve redução significativa da contaminação após o período mais prolongado de armazenamento. A partir da dose 8 kGy foram encontrados filamentosos apenas na 2ª avaliação, embora sua ocorrência tenha sido verificada abaixo do limite de detecção da técnica empregada. O substrato submetido a 15 kGy não apresentou nenhum crescimento em ambos períodos de armazenagem.

Tabela 9. Avaliação do tempo de armazenamento sobre a contagem fúngica de farelo de soja submetido a doses de radiação gama.

Dose (kGy)	Tempo (dias)	Unidades formadoras de colônias por grama (ufc g ⁻¹) ± s					
		Filamentosos		Leveduras		Total	
0	7	3,4 x 10 ³ ± 4,5 x 10 ²	a	3,0 x 10 ² ± 1,0 x 10 ²	c	3,7 x 10 ³ ± 4,0 x 10 ²	a
	45	1,6 x 10 ³ ± 7,5 x 10 ²	b	1,7 x 10 ² ± 1,2 x 10 ²	d	1,8 x 10 ³ ± 7,0 x 10 ²	b
3,5	7	1,0 x 10 ² ± 0	e	Nd	f	1,0 x 10 ² ± 0	e
	45	Nd	f	Nd	f	Nd	f
8,0	7	Nd	f	Nd	f	Nd	f
	45	Nd	f	Nd	f	Nd	f
15	7	Nd	f	Nd	f	Nd	f
	45	Nd	f	Nd	f	Nd	f

Os dados foram apresentados como média ± s. As contagens foram transformadas a log₁₀ (x+1) e analisadas pelo teste de mínima diferença significativa de Fisher (LSD). Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente (p<0,001).

Nd: não detectado.

Limite de detecção: 1 x 10² ufc g⁻¹.

A partir do substrato farelo de soja, nota-se redução significativa na contagem da microbiota mesmo para o controle não irradiado. A dose 3,5 kGy permitiu a sobrevivência de filamentosos no limite inferior de detecção da técnica, porém perceptível apenas no tempo 7 dias. E para as doses 8 e 15 kGy nenhum crescimento foi observado nos períodos avaliados.

Tabela 10. Avaliação do tempo de armazenamento sobre a contagem fúngica de ração submetida a doses de radiação gama.

Dose (kGy)	Tempo (dias)	Unidades formadoras de colônias por grama (ufc g ⁻¹) ± s					
		Filamentosos		Leveduras		Total	
0	7	3,4 x 10 ⁴ ± 4,0 x 10 ³	abc	3,9 x 10 ⁴ ± 8,1 x 10 ³	ab	7,3 x 10 ⁴ ± 7,0 x 10 ³	a
	45	1,4 x 10 ⁴ ± 4,0 x 10 ³	c	2,1 x 10 ⁴ ± 7,1 x 10 ³	bc	3,5 x 10 ⁴ ± 6,1 x 10 ³	abc
3,5	7	1,3 x 10 ³ ± 3,6 x 10 ²	d	4,3 x 10 ² ± 4,2 x 10 ²	e	1,7 x 10 ³ ± 7,7 x 10 ²	d
	45	<1,0 x 10 ²	f	2,3 x 10 ³ ± 5,8 x 10 ²	d	2,4 x 10 ³ ± 5,5 x 10 ²	d
8,0	7	Nd	g	Nd	g	Nd	g
	45	Nd	g	Nd	g	Nd	g
15	7	Nd	g	Nd	g	Nd	g
	45	Nd	g	Nd	g	Nd	g

Os dados foram apresentados como média ± s. As contagens foram transformadas a log₁₀ (x+1) e analisadas pelo teste de mínima diferença significativa de Fisher (LSD). Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente (p<0,001).

Nd: não detectado.

Limite de detecção: 1 x 10² ufc g⁻¹.

No caso da ração, não houve diferença significativa entre as contagens para o grupo controle nos distintos tempos de armazenamento. Para a dose 3,5 kGy, as contagens de filamentosos foram inferiores ao limite de detecção após 45 dias. E nas doses de 8,0 e 15 kGy, não foi observado nenhum crescimento.

A estabilidade microbiológica de um alimento é alcançada mediante a manipulação de fatores necessários ao desenvolvimento dos microrganismos (A_a, composição química, pH, temperatura), o que implica em expô-los a um ambiente adverso e desta maneira inibir seu crescimento ao interferir em sua homeostase. A homeostase é a tendência dos microrganismos a estabilizarem seu ambiente interno em resposta a fatores externos. Se o equilíbrio interno é afetado pelos fatores de preservação utilizados no alimento, então o microrganismo deixa de

se multiplicar ou reduz sua velocidade de reprodução, canalizando sua energia a restabelecer o equilíbrio, quando este não ocorre pode produzir-se a morte do microrganismo (LÓPEZ, 2006).

A radiação ionizante tem um efeito metabólico por induzir a perda de muitos constituintes celulares (íons orgânicos, aminoácidos, nucleotídeos, vitaminas e outros), que influencia na habilidade do organismo para se adaptar as condições adversas (GRIFFIN, 1994). No presente trabalho, os danos causados durante a irradiação repercutiram ao longo do tempo de armazenamento, como um decréscimo na vitalidade dos fungos. Aos sete dias, os fungos ainda tentavam recuperar-se da injúria sofrida, sendo possível recuperar um maior número de células viáveis a partir dos substratos testados. No entanto, aos 45 dias esse número mostrou-se significativamente reduzido. Isso pode ter ocorrido por uma perda de eficiência dos mecanismos de reparo aos danos causados pela irradiação, principalmente em nível de ADN.

Deve-se ter o cuidado com o armazenamento, subsequente ao processo de irradiação. Após a irradiação, o contato do substrato com o oxigênio pode permitir o crescimento das unidades fúngicas sobreviventes. Tal fato pode ser agravado, em condições inadequadas de temperatura e umidade, as quais também favorecem o desenvolvimento fúngico. É recomendável também, precauções contra recontaminações.

No segundo ensaio, prevaleceu a contaminação de fungos filamentosos em relação à de leveduras em todas as amostras. Os dados de redução em função da dose de radiação empregada são mostrados nas Tabelas 11, 12 e 13 para o fubá, farelo de soja e ração avícola, respectivamente.

Tabela 11. Influência da dose de radiação gama sobre a microbiota natural de fubá, 2º ensaio.

Fonte	GL	QM	F	Pr>F
Dose	3	19.09493785	541.34*	0.0001
Fungo	2	7.73012956	219.15*	0.0001
Dose x fungo	6	1.44146274	40.87*	0.0001
erro	24			

Nota: GL, grau de liberdade; QM, quadrado médio; F-Snedecor; *significativo P<0,001.

Dose (kGy)	Unidades formadoras de colônias por grama (ufc g ⁻¹) ± s				
	Filamentosos		Leveduras	Total	
0	6,1 x 10 ³ ± 1,1 x 10 ³	a	1,1 x 10 ³ ± 1,2 x 10 ²	b 7,2 x 10 ³ ± 1,2 x 10 ³	a
3,5	3,7 x 10 ² ± 1,5 x 10 ²	c	Nd	d 3,7 x 10 ² ± 1,5 x 10 ²	c
8,0	2,3 x 10 ² ± 2,3 x 10 ²	c	Nd	d 2,3 x 10 ² ± 2,3 x 10 ²	c
15	Nd	d	Nd	d Nd	d

Os dados foram apresentados como média ± s. As contagens foram transformadas a log₁₀ (x+1) e analisadas pelo teste de mínima diferença significativa de Fisher (LSD). Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente (p<0,001).

Nd: não detectado.

Limite de detecção: 1 x 10² ufc g⁻¹.

Observa-se que para o fubá a contagem de fungos filamentosos e leveduras reduziu significativamente quando aplicada a dose 3,5 kGy em relação ao controle não irradiado. Apesar de não ter sido observada diferença significativa entre essa dose e 8 kGy, para esta última foi encontrada grande variação na contagem, a qual esteve muito próxima ao limite de detecção da técnica. Nota-se, mais uma vez, maior sensibilidade das leveduras quando comparadas aos fungos filamentosos.

Tabela 12. Influência da dose de radiação gama sobre a micobiota natural de farelo de soja, 2º ensaio.

Fonte	GL	QM	F	Pr>F
Dose	3	15.23965119	20.33*	0.0001
Fungo	2	19.72716256	26.32*	0.0001
Dose x fungo	6	3.80991280	5.08**	0.0017
erro	24			

Nota: GL, grau de liberdade; QM, quadrado médio; F-Snedecor; *significativo P<0,001; ** P<0,05.

Dose (kGy)	Unidades formadoras de colônias por grama (ufc g ⁻¹) ± s					
	Filamentosos		Leveduras		Total	
0	1,7 x 10 ⁴ ± 3,1 x 10 ³	a	Nd	b	1,7 x 10 ⁴ ± 3,1 x 10 ³	a
3,5	3,0 x 10 ³ ± 1,5 x 10 ³	a	Nd	b	3,0 x 10 ³ ± 1,5 x 10 ³	a
8,0	<1,0 x 10 ²	b	Nd	b	Nd	b
15	Nd	b	Nd	b	Nd	b

Os dados foram apresentados como média ± s. As contagens foram transformadas a log₁₀ (x+1) e analisadas pelo teste de mínima diferença significativa de Fisher (LSD). Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente (p<0,001). Nd: não detectado.

Limite de detecção: 1 x 10² ufc g⁻¹.

Ao avaliar a radiação sobre o farelo de soja, apesar de ainda ser possível o isolamento de fungo sobrevivente depois de submetido a 8 kGy, esse foi encontrado abaixo do limite de detecção. Não houve diferença significativa entre o controle e a dose 3,5 kGy, sendo a micobiota eliminada com 8 kGy. Leveduras não foram isoladas, nem mesmo no farelo de soja não irradiado.

Tabela 13. Análise de variância da influência da dose de radiação gama sobre a micobiota natural de ração, 2º ensaio.

Fonte	GL	QM	F	Pr>F
Dose	3	41.13491776	181.92*	0.0001
Fungo	2	2.55853578	11.32*	0.0003
Dose x fungo	6	1.18551862	5.24**	0.0014
erro	24			

Nota: GL, grau de liberdade; QM, quadrado médio; F-Snedecor; *significativo P<0,001; ** P<0,05.

Dose (kGy)	Unidades formadoras de colônias por grama (ufc g ⁻¹) ± s					
	Filamentosos		Leveduras		Total	
0	4,5 x 10 ⁴ ± 9,3 x 10 ³	a	4,3 x 10 ⁴ ± 3,6 x 10 ³	a	8,8 x 10 ⁴ ± 1,2 x 10 ⁴	a
3,5	2,3 x 10 ² ± 5,8 x 10 ¹	b	Nd	c	2,3 x 10 ² ± 5,8 x 10 ¹	b
8,0	<1,0 x 10 ²	c	Nd	c	<1,0 x 10 ²	c
15	Nd	c	Nd	c	Nd	c

Os dados foram apresentados como média ± s. As contagens foram transformadas a log₁₀ (x+1) e analisadas pelo teste de mínima diferença significativa de Fisher (LSD). Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente (p<0,001). Nd: não detectado.

Limite de detecção: 1 x 10² ufc g⁻¹.

A redução da micobiota observada neste trabalho está de acordo com a literatura, a qual relata que a dose de radiação necessária é dependente da contaminação inicial, quanto menos contaminado o substrato menor é a dose necessária para se alcançar a esterilização (ICGFI, 1995).

O encontro fúngico inicial no segundo ensaio foi maior e a A_a também. A A_a é um dos principais fatores ambientais para controle do desenvolvimento fúngico e sua atividade

metabólica (BRESLER et al., 1998), sendo considerado junto com a temperatura, os mais críticos durante a estocagem (MONTANI et al., 1988).

Em relação à classificação e estado morfológico dos fungos sobreviventes à irradiação em ambos os ensaios, temos que o substrato farelo de soja submetido a 3,5 kGy apresentou o crescimento de *Aspergillus* com apenas hifas e clestotécio, *Cladosporium* sp. e *Fusarium* spp. em meio DRBC, este último apresentou micélio estéril quando submetido a bateria de identificação da espécie. Clestotécios produzidos por *Aspergillus* são estruturas resistentes onde esporos sexuais (ascosporos) são formados, servem ao papel de sobrevivência em condições ambientais extremas (DURAN et al., 2007). O mesmo substrato irradiado com 8 kGy apresentou crescimento de *Cladosporium* spp., *Curvularia* spp. e *Fusarium* spp. em meio DCPA, porém após feito o repique deste último para a identificação da espécie, houve apenas a formação de micélio estéril, ou seja, sem a presença de estruturas reprodutivas que servissem a identificação. Este fato faz suspeitar da ocorrência de mutante auxotrófico, o qual requer suplementação nutricional para se desenvolver.

O fubá quando submetido a 3,5 kGy, permitiu o crescimento de fungos dos gêneros *Aspergillus* spp., *Eurotium* spp. e *Penicillium* spp. no meio de contagem geral DRBC. No entanto, ao serem repicados para identificação da espécie, esses fungos evidenciaram o crescimento apenas de micélio estéril. Em relação à razão, na amostra com 3,5 kGy houve o crescimento de *Cladosporium* spp. e *Fusarium verticillioides*.

Aziz et al. (2007) verificaram que a contagem fúngica em sementes decresceu com o aumento da dose de radiação e o crescimento de *Fusarium* spp. foi inibido a 4 kGy em cevada e 6 kGy em trigo e milho. No presente trabalho, foi observado o crescimento de *Fusarium* spp. a partir de farelo de soja irradiado com 8 kGy, apesar deste não ser capaz de produzir conídios, ao menos após o primeiro repique posterior ao isolamento.

Em geral, foi observado que os fungos que resistiram à dose de 3,5 kGy pertencem principalmente aos gêneros *Cladosporium* spp., *Curvularia* spp. *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. Este último, quando submetido à bateria de identificação teve alguns representantes que apresentaram apenas o crescimento de micélio estéril, o que não permitiu a identificação em nível de espécie, com exceção dos isolados de razão submetida a 3,5 kGy, para os quais foi verificado tratar-se de *F. verticillioides*.

Diferenças na radiosensibilidade entre gêneros fúngicos são discutidas na literatura. Blank e Corrigan (1995) verificaram que os esporos de *Alternaria*, *Curvularia* e *Cladosporium* foram pelo menos três vezes mais resistentes à radiação, quando comparados aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Maity et al. (2003), ao irradiar sementes, verificaram que *Aspergillus* submetido a 4 kGy não sobreviveu, enquanto *Alternaria* persistiu. A resposta diferencial destes fungos à radiação pode ser em função da presença de macroconídio de parede espessa, o qual pode conferir uma proteção a esses fungos (SALEH et al., 1988). Entretanto, recentemente, Maity et al (2008) verificaram diferença na radiosensibilidade entre gêneros fúngicos e, em ordem crescente de sensibilidade relata: *Aspergillus* sp < *Alternaria* sp < *Curvularia* sp < *Trichoderma* sp. A completa inibição do crescimento de *Aspergillus* sp e *Trichoderma* sp foi observada a 3 kGy e 2 kGy respectivamente, enquanto que para *Alternaria* sp e *Curvularia* sp foi a 2.5 kGy.

Fungos altamente radiorresistentes foram observados por Silva et al (2006), os quais descrevem a dose de 16 kGy como necessária para inativar diferentes espécies fúngicas contaminantes de documentos e livros antigos. Esses fungos foram previamente isolados de livros tratados quimicamente. Dentre os fungos mais resistentes, relatam o gênero *Cladosporium* spp.

Uma redução significativa da microbiota de guaraná (em pó e em grão) foi alcançada com a dose 5 kGy, mas essa dose permitiu o reisolamento de *Cladosporium* e *Rhizopus* a partir de 20 % das amostras e *Penicillium* de 10% (AQUINO et al., 2007).

A dose de radiação necessária para reduzir a contaminação microbiana é dependente do microrganismo envolvido, do tipo de alimento e condições do teste tais como a temperatura no momento da irradiação (Food Safety). Como observado, quanto mais contaminado estiver um substrato, maior é a dose de radiação necessária para eliminar a micobiota. Por isso sempre é muito importante a prevenção da contaminação e o controle de qualidade de matéria-prima. A irradiação, assim como outros métodos de controle, deve ser utilizada de forma complementar e não como medida isolada. Um avanço para a sanidade animal no Brasil, pode ser proporcionado pela Instrução Normativa nº 4 (de 23 de fevereiro de 2007), a qual aprova o Regulamento Técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos fabricantes ou fracionadores de produtos destinados à alimentação animal. Esse regulamento define os requisitos higiênico-sanitários das instalações, equipamentos e utensílios, do pessoal e da produção, além de tornar obrigatória a implantação de procedimentos operacionais padrões.

Acredita-se que os alimentos secos podem ser submetidos a doses mais altas de radiação, pois a umidade é responsável por intensificar os efeitos sobre o valor nutricional do alimento. Trabalhos relatam que substratos considerados secos, como as rações, podem ser submetidos a altas doses de radiação com menor comprometimento nutricional (CHEN et al., 2000; AL-MASRI, 2003). Apesar dessa vantagem, de acordo com os resultados encontrados no presente trabalho, uma dose de 3,5 kGy já seria suficiente para garantir uma qualidade higiênica das rações. Vale lembrar que a contaminação inicial encontrada para os ingredientes e ração avícola foi relativamente baixa. Entretanto, para o uso de tal dose, o efeito da irradiação sobre o valor nutricional, em especial a proporção de vitaminas, e sensorial da ração precisa ser verificado antes do início de um processo comercial. É conveniente salientar ainda que o processo de armazenagem pós-irradiação precisa ser controlado para permitir a manutenção da qualidade da ração, pois caso haja aumento da umidade e/ou temperatura, pode favorecer o crescimento da micobiota residual. Deve-se também precaver para que não ocorra recontaminação.

Chelack et al. (1991b) apresentam resultados consistentes com a hipótese de que a redução da micobiota competitiva por irradiação é responsável pelo aumento da produção de micotoxina, observada quando cevada com micobiota natural é inoculada com o fungo toxígeno *Aspergillus alutaceus* var. *alutaceus* posterior à irradiação. Esta deve ser uma preocupação ao se irradiarem cereais e rações.

A dose 3,5 kGy proporcionou significativa redução da contagem fúngica. No entanto, observou-se a existência de uma micobiota residual. É preciso conhecer o comportamento desses fungos sobreviventes. Sabe-se que a irradiação é usada há décadas como método indutor de mutação, seus efeitos sobre fungos vêm sendo estudados. De grande relevância, é sua influência sobre isolados fúngicos toxígenos. Para tal, valeu-se neste trabalho de cepas fúngicas de referência, como descrito mais adiante.

4.3 Radiossensibilidade de Cepas Fúngicas de Referência de *Aspergillus* spp.

4.3.1 Irradiação das cepas em CYA

As cepas de referência utilizadas neste trabalho representam espécies (*A. flavus*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. niger*) comumente encontradas em rações avícolas no Brasil (RIBEIRO et al., 2000; ROSA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006; FRAGA et al., 2007). São aeróbios e distinguem-se por tolerarem teores baixos de água nos alimentos (URBAIN, 1986; PITT; HOCKING, 1997).

Observou-se que a partir da dose de 1,5 kGy ocorre inativação de colônias, sendo que cerca de 50% delas foram inativadas com dose de 2 kGy, com exceção do *A. parasiticus*. A Tabela 14 lista, para cada espécie, a dose necessária para causar a inativação de 50% das

colônias. Considera-se como colônia inativada aquela que depois de irradiada e submetida à nova incubação não apresenta crescimento.

Tabela 14. Doses para inativação de 50% das colônias de *Aspergillus* spp. em meio CYA.

Espécie	D ₅₀ (kGy ± 0,5)
<i>Aspergillus flavus</i>	2,0
<i>A. carbonarius</i>	1,5
<i>A. ochraceus</i>	2,0
<i>A. parasiticus</i>	3,0
<i>A. niger</i>	2,0

Entre as cepas avaliadas, foi verificada variação na radiosensibilidade. *A. carbonarius* teve 50% de suas colônias inativadas com 1,5 kGy e 100 % com apenas 2 kGy. *A. ochraceus*, *A. niger* e *A. flavus* tiveram 50% de suas colônias inativadas com 2,0 kGy, a dose que alcançou 100% de inativação foi respectivamente 2,5; 3,0; e 4,0 kGy. *A. parasiticus* apresentou D₅₀ de 3,0 kGy e foi completamente inibido a 4,5 kGy. Norberg e Serrra-Freire (1993) citam a dose de 2,2 kGy como dose letal mínima (DLM) de radiação gama para *A. flavus*. Grande radiorresistência foi observada para outra espécie do gênero, *A. versicolor*, fungo inicialmente isolado de livros tratados quimicamente, foi resistente a 15 kGy, quando irradiado após crescimento sobre placas de Petri com o meio MEA 2%, sendo que a dose de 20 kGy foi necessária para a sua completa inativação (SILVA et al., 2006).

A radiorresistência de um organismo está relacionada com vários fatores tais como temperatura, meio em que o microrganismo encontra-se, atmosfera, tipos de células e sua idade fisiológica (SANTOS et al., 2003). Trabalhos sobre radiosensibilidade fúngica, efetuados a partir do crescimento em meios de cultivo, auxiliam na investigação das doses. Porém, de grande relevância é o estudo de diferentes doses de radiação gama sobre o próprio substrato ou em outro, cuja composição nutricional e o estado físico sejam os mais semelhantes possíveis.

4.3.2 Irradiação em milho

A importância de se realizar ensaios sobre substratos naturais, ademais dos meios artificiais, é que desta maneira os resultados podem revelar dados mais fidedignos de como estas espécies fúngicas se comportam em alimentos irradiados. O milho utilizado no experimento foi acrescido de água destilada e submetido a estabilização da A_a a 0,98.

Colônias sobreviventes foram repicadas para posterior avaliação. As placas onde nenhum crescimento foi observado receberam Nd (não detectado), como pode ser observado na Tabela 15.

Tabela 15. Efeito de doses de radiação gama sobre *Aspergillus* spp. em milho.

Dose (kGy)	Contagem (ufc g ⁻¹) de <i>Aspergillus</i> spp.				
	<i>A. flavus</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. parasiticus</i>
0	4,0 x 10 ⁸ ± 6,7 x 10 ⁷ a	6,4 x 10 ⁵ ± 7,1 x 10 ⁴ c	2,8x10 ⁷ ±7,0x10 ⁶ bc	8,6 x10 ⁴ ±8,1x10 ³ c	1,8 x10 ⁸ ±6,4x10 ⁶ ab
2,0	6,7 x 10 ³ ± 6,4 x 10 ³ d	3,3 x 10 ¹ ± 5,8 x 10 ¹ ef	6,7x10 ¹ ±5,8x10 ¹ e	1 x 10 ² ± 1 x 10 ² e	1,4 x10 ³ ±1,0x10 ² d
3,5	3,7 x 10 ² ± 5,5 x 10 ² e	Nd f	Nd f	Nd f	3,7 x10 ² ±5,5x10 ² e
4,0 - 8,0	Nd f	Nd f	Nd f	Nd f	Nd f

Os dados foram apresentados como média ± s. As contagens foram transformadas a log₁₀ (x+1) e analisadas pelo teste de mínima diferença significativa de Fisher (LSD). Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente (p<0,001). Nd: não detectado.

Limite de detecção: 1 x 10² ufc g⁻¹.

Observa-se que houve significativa redução na contagem fúngica com a dose 2 kGy, a qual já reduziu a contagem das cepas analisadas a <1,0 x 10³, com exceção de *A. flavus* e *A. parasiticus*. Para tal, essas últimas espécies exigiram a dose 3,5 kGy. Nota-se que, semelhante ao ocorrido com o processo de irradiação a partir do crescimento dos fungos em meio CYA, *A. flavus* e *A. parasiticus* foram os mais radiorresistentes. A completa inibição da contaminação fúngica foi observada a partir de 4 kGy, o que está de acordo com o relatado na literatura. A dose 4 kGy é citada por Refai et al. (1996) como responsável por inibir completamente *A. ochraceus*, previamente inoculado (10⁶ ufc g⁻¹) em ração e doses entre 4 a 6 kGy foram reportadas como capazes de inibir completamente a micobiota contaminante de alimentos e ração (AZIZ et al., 1990). Esse intervalo de dose é citado para outros gêneros fúngicos, Aziz et al (2007) verificaram um decréscimo na contagem de viáveis de *Fusarium* com o aumento da dose de radiação e o crescimento foi completamente inibido com 4 kGy em grãos de cevada e 6 kGy para grãos de trigo e milho.

Diferença na radiosensibilidade entre espécies de *Aspergillus* é descrito na literatura. Borges (2004), ao submeter grãos de milho, amendoim, trigo e arroz à radiação gama, descreve *A. ochraceus* e *A. carbonarius* como as mais radiosensíveis, com D₅₀ (dose necessária para inativar 50% das colônias) e D₀ (dose necessária para inativar 100% das colônias) próximas a 2,2 kGy e 3,2 kGy, respectivamente. *A. niger* e *A. flavus* foram intermediários com D₅₀ 2,5 kGy e D₀ 4,1 kGy. *A. parasiticus* foi a mais radiorresistente das espécies estudadas, com D₅₀ e D₀ de 3,1 kGy e 4,7 kGy.

Observou-se a partir de fungos irradiados, obtidos por diluição seriada, o crescimento de colônias sem observação macroscópica de conídios. E, ao submeter as placas à microscopia óptica, confirmou-se a existência de micélio estéril (Figura 8). O fato da cepa irradiada não realizar conidiogênese no meio de cultivo pode indicar tratar-se de um mutante auxotrófico, o qual requer certos nutrientes para o seu desenvolvimento.

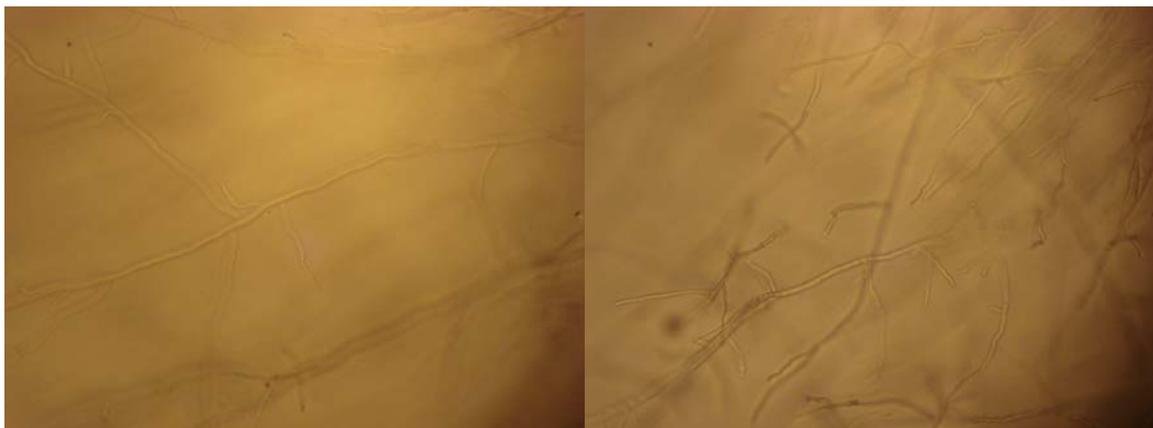


Figura 8. *A. ochraceus* submetido a 2 kGy de radiação gama, em milho picado. Micélio estéril após 10 dias de incubação a 28° C, aumento de 100x.

Em contrapartida, ao retornar o milho (dentro do Erlenmeyer) para incubação em estufa a 28° C e realizar posterior plaqueamento direto sobre DG18, houve crescimento para as amostras submetidas a doses de radiação até 5,5 kGy (Figura 9). É possível que esse crescimento tenha ocorrido por fungo presente no interior do grão picado. O crescimento de *Aspergillus* spp. endógeno é relatado na literatura, Farias et. al. (2000) obtiveram vários isolados a partir de grãos de milho aparentemente saudáveis.



Figura 9. Crescimento de cepas padrão submetidas a 5,5 kGy sobre milho picado (granulometria média 2mm). A. *A. ochraceus*, observação direto do Erlenmeyer; B. *A. flavus* em meio DG18.

O processo de diluição utilizado favorece o crescimento de fungo que se encontra na superfície do grão, enquanto o plaqueamento direto possibilita o crescimento também daquele armazenado dentro do grão. Borges (2004) ao utilizar diferentes tratamentos pós-radiação gama para avaliar a radiosensibilidade de espécies de *Aspergillus* spp., verificou que o número de amostras onde os fungos permaneceram viáveis foi 5% menor para as amostras

avaliadas por diluição seriada, em relação às submetidas ao teste de viabilidade por plaqueamento direto dos grãos de milho, trigo e amendoim.

No experimento realizado por Borges (2004), não houve diferença significativa entre os substratos (amendoim, arroz, aveia, trigo) com relação aos valores das doses de radiação gama necessárias para a inativação de espécies de *Aspergillus*. A autora então sugere que os efeitos observados foram ocasionados pela interação direta da radiação com o ADN do fungo e não por danos indiretos provocados a essa molécula por radicais livres produzidos pela radiação no substrato.

Em muitas placas com o meio CYA, nas quais fora colocado o inóculo a partir das diluições do milho picado, apesar de não ocorrerem colônias, foi verificado que havia no meio uma característica embaçada, que ao microscópio revelou se tratar de conídeos germinados (Figura 10). Foram encontrados até 6,5 kGy, conídeos germinados em todas as cepas, com exceção de *A. ochraceus*, para o qual a germinação foi observada até 5,5 kGy. Essa germinação provavelmente tenha ocorrido em função de reserva de nutrientes disponível no conídeo, mas não prosseguiu até formar micélio, talvez pela incapacidade do fungo irradiado sintetizar proteínas. Este fato é devido à lesão no ADN, umas das principais alterações relatadas em fungos e outros microrganismos irradiados.

A seqüência esperada do desenvolvimento de fungos do gênero *Aspergillus* é ilustrada na Figura 11. Avaliação genética permitiu verificar que mutantes podem ter sua conidiogênese afetada por não aquisição de competência para tal ou por não desenvolverem nem ao menos os conidióforos (GRIFFIN, 1994), o que pode ter ocorrido no presente trabalho. Um mutante desse tipo pode requerer uma condição nutritiva especial, além de ser mais sensível a situações de estresse.

As doses 7 e 8 kGy resultaram em completa inibição de germinação de conídios, situação parecida foi observada com amendoim em grão. Este quando submetido a 5 kGy teve redução na percentagem de infecção de 82% para 17,3% dos grãos e nenhuma contaminação foi observada com 10 kGy (PRADO et al., 2006).

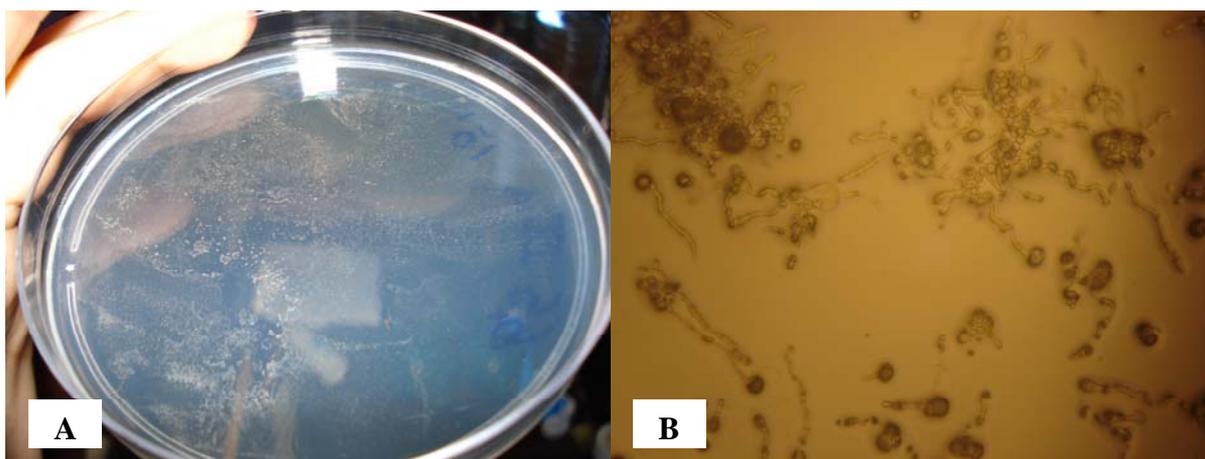


Figura 10. *Aspergillus flavus* submetido a 6,5 kGy de radiação gama, em milho picado. A. Visão da placa (diluição 10^{-1}) com meio DG18, após incubação por sete dias a 28°C; B. Conídios germinados, com aumento de 100x.

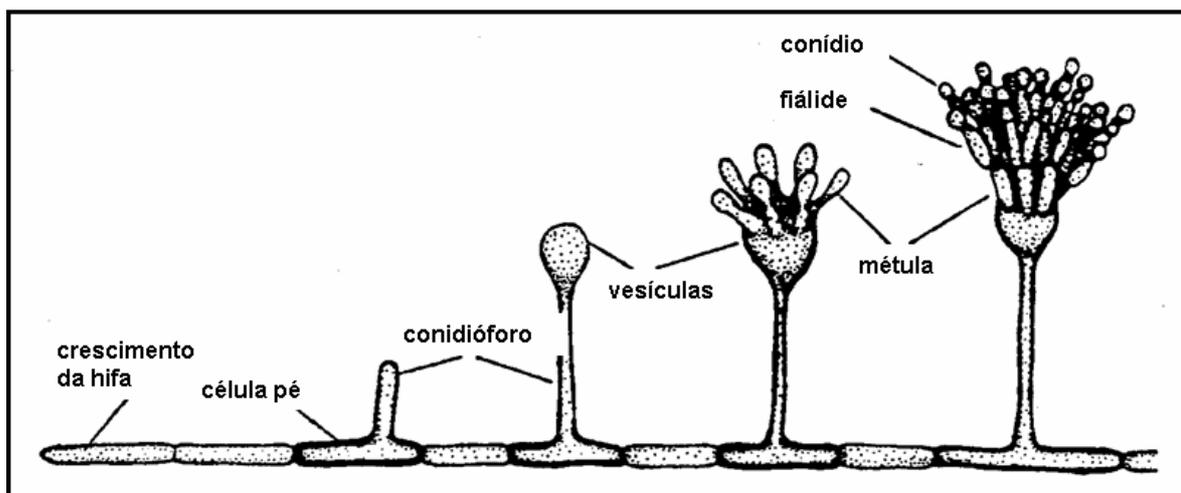


Figura 11. Desenvolvimento esperado de um *Aspergillus*, representado por *A. nidulans*, a partir do crescimento de uma hifa (GRIFFIN, 1994).

4.3.3 Avaliação morfológica de cepas de *Aspergillus* controle e irradiadas

Neste trabalho, foram observadas variações morfológicas entre cepas controle e irradiadas, tais como cor, textura e reverso das colônias (Figuras 12 e 13). As principais mudanças foram a menor produção de conídios nos isolados irradiados e a grande presença de esclerócios em alguns isolados, como observado em *A. ochraceus* irradiado com 2 kGy, isolado por diluição seriada do milho. As alterações microscópicas encontradas estão dentro das variações já observadas para as espécies, de acordo com Klich (2002). Nas tabelas 16, 17, 18, 19 e 20, são colocadas as características macro e microscópicas das cepas controle e irradiadas de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *A. carbonarius* e *A. ochraceus*, respectivamente e, seu padrão descrito na literatura (KLICH, 2002). Os dados de medidas microscópicas foram obtidos por média de dez medições. Essas tabelas podem ser observadas no Anexo E.

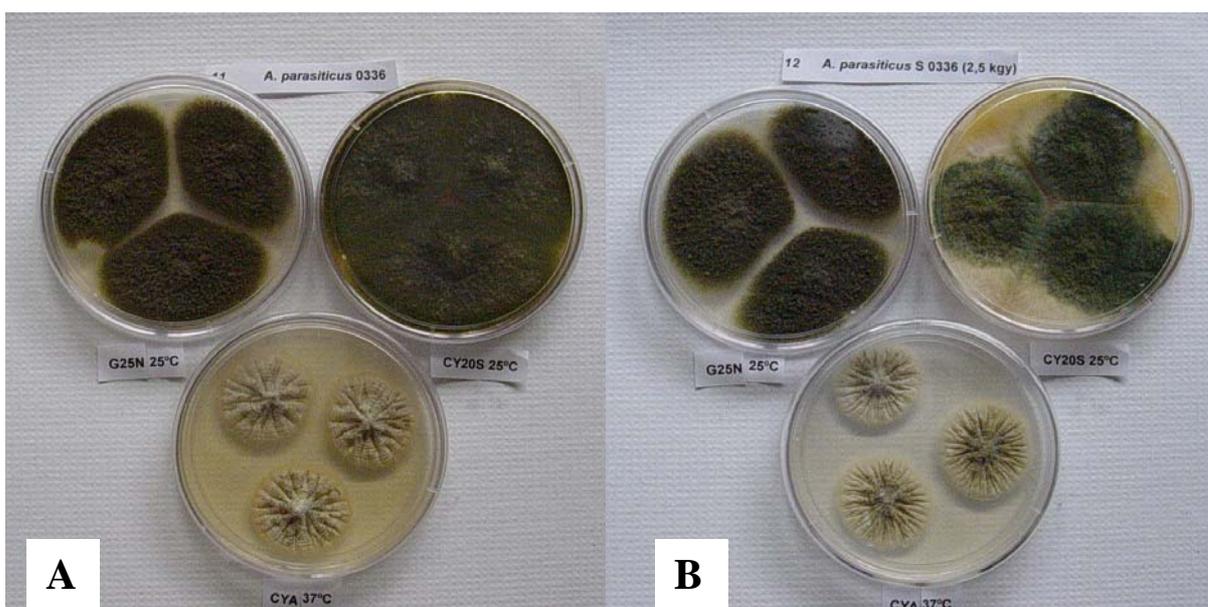


Figura 12. Características morfológicas de *Aspergillus parasiticus* sobre G25N e CY20S incubados sete dias a 25° C e CYA incubado por sete dias a 37° C. A- controle; B- mesmo fungo após irradiação com 2,5 kGy.

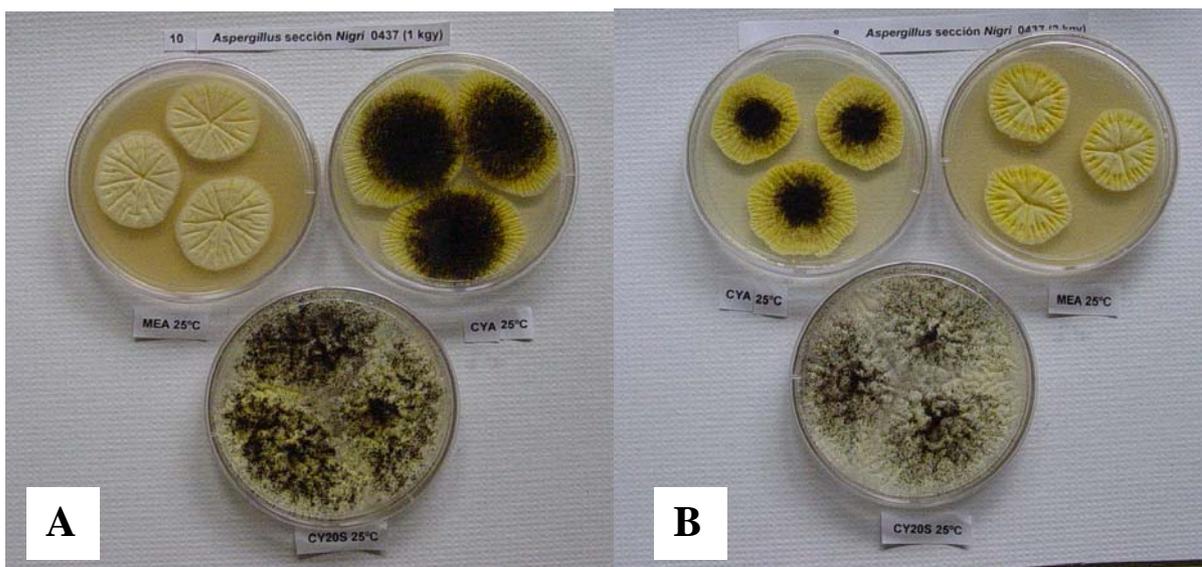


Figura 13. Características morfológicas de *Aspergillus carbonarius* sobre G25N e CY20S incubados sete dias a 25° C e CYA incubado por sete dias a 37° C. A- irradiado com 1 kGy; B- mesmo fungo após irradiação com 2,0 kGy.

Alguns trabalhos foram conduzidos para avaliar o potencial da radiação ionizante como agente mutagênico. Cordeiro et al. (1995) compararam a eficácia de três agentes mutagênicos sobre o fungo *Metarhizium anisopliae*, utilizado no Brasil para controle biológico de pragas de pastagens e de culturas de cana-de-açúcar. Foram selecionadas doses que proporcionassem de 1 a 5% de sobrevivência. Verificaram que a radiação gama foi o mutagênico mais eficiente com uma porcentagem de obtenção de mutantes auxotróficos de aproximadamente 0,2%, seguido pela luz ultravioleta (0,12%) e pelo ácido nitroso (0,06%).

Radiação gama produz principalmente mutações aleatórias no ADN; luz ultravioleta é uma radiação que produz principalmente danos nos pares de bases do ADN; ácido nitroso é um mutagênico químico que produz desaminação dos componentes do ADN (CORDEIRO et al. 1995).

Fungos mutantes morfológicos podem ser distinguidos visualmente, pelas alterações na cor, textura quando comparados aos representantes não irradiados (CORDEIRO et al, 1995). Ao longo do trabalho, foi observado que ao submeter os fungos irradiados a repiques sucessivos em meio de cultura, os mesmos tendem a voltar a apresentar características morfológicas muito próximas ao padrão não irradiado. Os nutrientes disponíveis no meio, associados às condições adequadas de temperatura favorecem o crescimento dos fungos. O retardo no crescimento e a menor produção de conídios (micélio reprodutivo) foram mais intensamente visualizados após o primeiro isolamento do fungo submetido à irradiação.

4.3.4 Estudo da ultraestrutura

No estudo por microscopia eletrônica de transmissão, foi observado que em isolados fúngicos não irradiados, a parede celular aparece uniforme e completamente rodeada por uma intacta camada fibrilar. A membrana plasmática também aparece com formato uniforme em todas as partes. Todas as organelas, tais como o núcleo, mitocôndrias, retículo endoplasmático, vacúolos, grânulos eletrodensos e septos exibiram aspecto normal (Figura 14).

Em isolados fúngicos tratados por radiação gama, alterações ultraestruturais são detectadas na parede celular, membrana plasmática e ao nível de citoplasma. A maior variação patológica foi verificada ocorrer sobre sistemas endomembranosos. A radiação gama afeta principalmente membrana plasmática e a membrana das organelas, em especial, do núcleo e mitocôndria. São notados sinais de início de depressão celular, incluindo alteração da forma e hifas dilatadas, aumento de vacualização do citoplasma, acompanhado de fusão de vacúolos, aumento de septo e precoce degradação de grânulos eletrondensos. No isolado de *A. ochraceus* submetido a 2 kGy de radiação gama e isolado por diluição seriada a partir do milho (Figura 15), foi observada completa autólise e desorganização do citoplasma da hifa, caracterizada por ruptura de membranas, acompanhada por destruição e ruptura da membrana plasmática com massiva fusão de vesículas.

Os efeitos da irradiação foram mais intensos no meio intracelular dos esporos fúngicos que na parede celular, como observados por Aquino et al. (2005) ao usarem teste de fluorescência (FDA-BE) para avaliar a viabilidade de fungos em amostras de milho irradiadas. Esses autores justificam tal encontro em função do maior conteúdo hídrico e, conseqüentemente, do maior efeito de compostos radiolíticos no interior celular.

Evidências ultraestruturais de alterações na membrana plasmática, com interrupções a intervalos variáveis e formação de pequenas vesículas dentro do citoplasma, já foram encontradas em conseqüência ao uso do biocida Akacid®^{plus} sobre *A. parasiticus*, verificado por microscopia eletrônica de transmissão (RAZZAGHI ABYANEH et al., 2006). A partir de micélio fúngico exposto a diferentes concentrações fungistáticas, verificou-se o efeito do biocida ao nível de membrana plasmática da hifa e não foram observados danos óbvios à parede celular. Foi observada também uma marcada depleção do conteúdo citoplasmático da hifa, com ruptura de membranas de organelas como núcleo, mitocôndria e retículo endoplasmático, demonstrando que o químico passa pela parede celular, mas também pela membrana plasmática.

A alteração em membranas de organelas e membrana plasmática observada no presente trabalho, quando o fungo foi submetido à radiação gama, também é relatada como uma propriedade antifúngica do óleo essencial de *Thymus* spp. avaliado sobre *A. niger* (RASOOLI et al, 2006). E, essas alterações são correlacionadas à interferência com reações enzimáticas necessárias à síntese de membranas e parede, o que afeta a morfologia e o crescimento fúngico (RASOOLI et al, 2005).

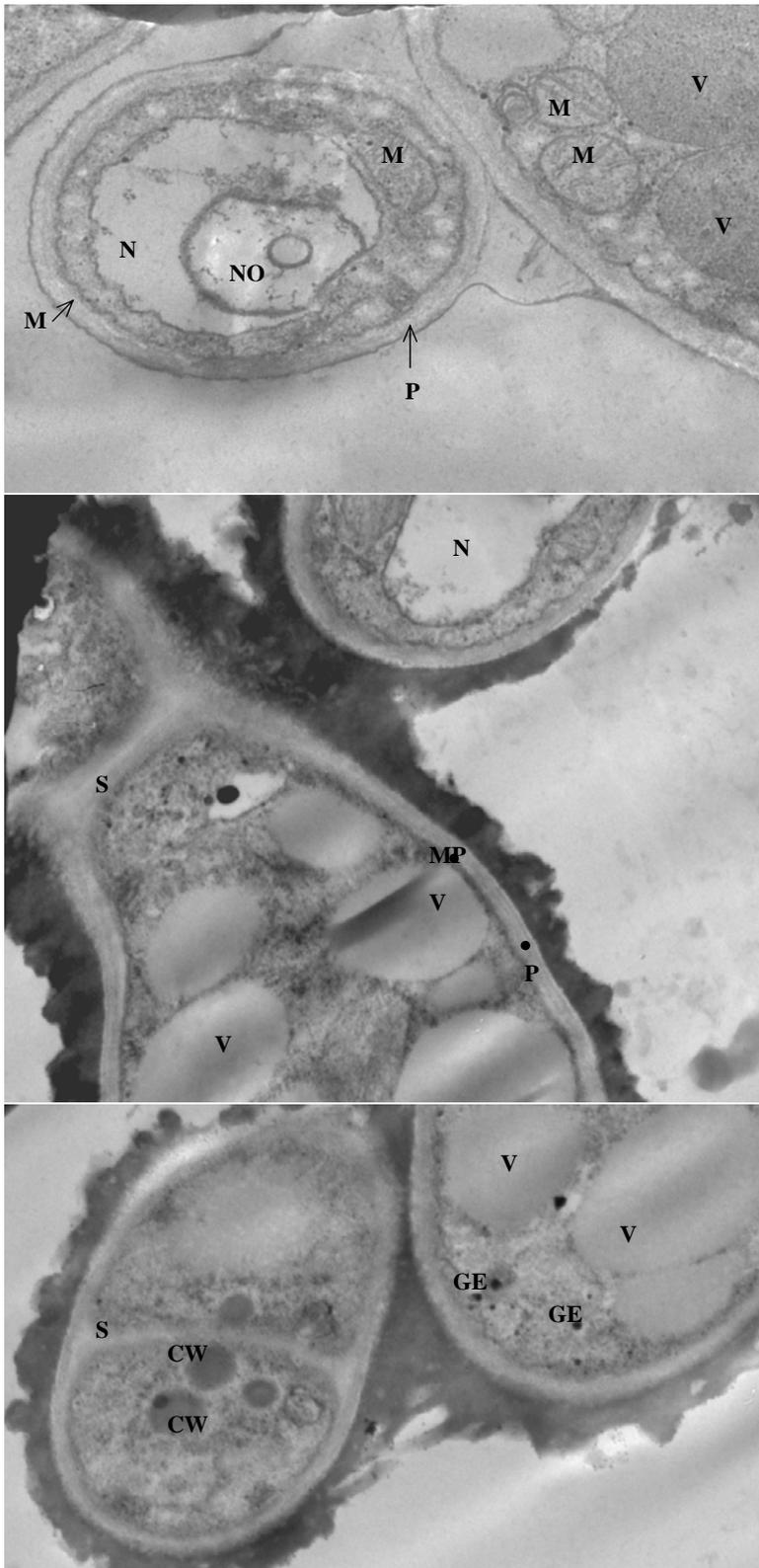


Figura 14. Fotomicrografia por microscopia eletrônica de transmissão de *Aspergillus ochraceus* controle (0 kGy), aumento (x 16700). CW: corpos Woronin; GE: grânulos eletrondensos; N: núcleo; NO: nucléolo; M: mitocôndria; MP: membrana plasmática; P: parede celular; S: septo; V: vacúolo.

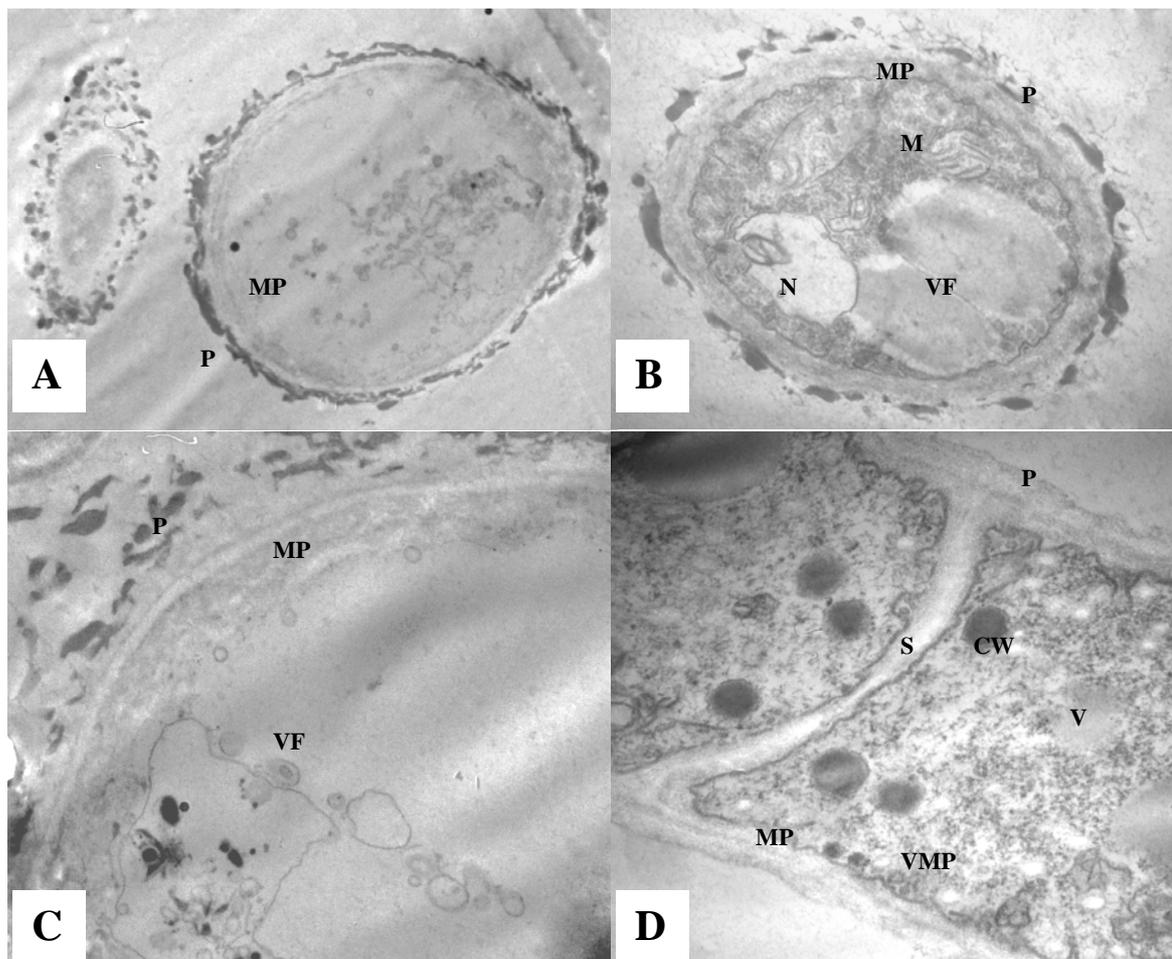


Figura 15. Fotomicrografia por microscopia eletrônica de transmissão de *Aspergillus ochraceus* irradiado com 2,0 kGy, isolado por diluição seriada do milho. Aumentos: A (x 5800); B (x 20700); C (x 13100); D (x 34600). CW: corpos Woronin; N: núcleo; M: mitocôndria; MP: membrana plasmática; P: parede celular; S: septo; V: vacúolo; VF: fusão de vacúolo; VMP: vesícula.

4.3.5 Perfil toxígeno

O uso da irradiação tem sido proposto como um processo apropriado para eliminar fungos toxígenos, antes da produção de micotoxinas (REFAI et al., 1996). Entretanto, a possibilidade de alimentos irradiados serem mais susceptíveis a subsequente infecção por fungos toxígenos ou que os fungos possam ser estimulados a produzirem mais toxina após exposição à radiação gama foi relatado por Paster e Bullerman (1988).

No campo da pesquisa com irradiação para a descontaminação fúngica, o ponto de maior conflito entre pesquisadores diz respeito à capacidade de diferentes fungos produzirem micotoxinas após terem sido irradiados, o que tem sido avaliado sob diferentes condições laboratoriais.

Neste trabalho, cepas depois de irradiadas e repicadas em meio de cultura para verificar produção de toxina, sob as mesmas condições, apresentaram perfil distinto. *Aspergillus parasiticus* (NRRL 2999) controle e dois isolados irradiados com 2,5 kGy produziram respectivamente, 8,5815 $\mu\text{g g}^{-1}$, 51,724 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 68,6406 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AFB₁. Esses resultados mostram que as condições de irradiação usadas para eliminar o crescimento fúngico no presente trabalho, induz aumento da capacidade toxígena com 2,5 kGy nesta espécie.

Para a cepa de *A. flavus* (NRRL 5520) controle não foi detectada a produção de aflatoxinas, enquanto a mesma cepa após 4 kGy de radiação gama produziu 0,8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de AFB₁.

Aspergillus niger (ATCC 1004) controle produz 5,344 ng ml^{-1} de OTA. O isolado submetido a 2 kGy de radiação gama obtido por diluição seriada produziu 1,7 ng ml^{-1} , enquanto outro isolado também submetido a 2 kGy, porém isolado a partir de plaqueamento direto do milho produziu 38,72 ng ml^{-1} de OTA.

Aspergillus ochraceus (NRRL 3174) controle mostrou-se grande produtor de OTA, com 51,108 $\mu\text{g ml}^{-1}$. OTA não foi produzida por isolado obtido por diluição seriada do milho após 2 kGy de radiação. Enquanto que outro isolado obtido por plaqueamento direto do milho, após 3,5 kGy, produziu 101,472 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de OTA.

A produção de toxina é aparentemente suprimida quando o número de esporos por volume de substrato excede a certo nível (KARUNARATNE; BULLERMAN, 1990). Ferreira-Castro et al. (2007) atribuem o aumento observado na produção de fumonisina por *F. verticillioides* em milho irradiado com 2 kGy, quando comparado ao controle não irradiado, ao menor tamanho do inóculo. Entretanto, esses mesmos autores, encontraram uma menor produção de fumonisina após a dose 5 kGy, que ainda apresentou uma contagem residual. O tamanho do inóculo também foi decisivo sobre amendoim, Gunterus et al. (2007) observaram que o acúmulo de aflatoxina aumentou com a redução do inóculo fúngico.

A cepa fúngica, as condições de estocagem, a umidade do substrato e a dose de radiação utilizada afetam o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas (AZIZ; MOUSSA, 2002). No presente trabalho, foram utilizadas cepas de referência e o perfil toxígeno foi avaliado antes e após a irradiação. Foi verificado que cepas irradiadas e isoladas do milho pelo método de diluição seriada mostraram-se menos produtoras que o padrão ou mesmo, não produziram toxina. Em contrapartida, o aumento do potencial toxígeno foi observado pelas cepas isoladas por plaqueamento direto do milho. Neste último caso, favoreceu-se a estrutura fúngica que estava no interior do grão de milho.

A resposta adaptativa de fungos toxígenos a condições ambientais desfavoráveis também já foi estudada para o uso de fungicidas, quando se verificou que o uso desses químicos pode estimular a produção de toxina pelos fungos resistentes e sobreviventes (D'MELLO; MACDONALD, 1997). Observou-se que o uso de aditivos (preservantes) em

alimentos estimula uma maior produção de toxina (Barbato, 2008)⁴. Fernandes (2008)⁴ verificou que cerca de 80 % das cepas de *A. flavus* isoladas de rações para cães são aflatoxígenas. Essas rações passam por peletização, processo que reduz a contaminação fúngica, porém as cepas isoladas apresentam grande potencial toxígeno. Esses relatos reforçam a hipótese de que situações de estresse induzem uma maior produção de toxina pelos fungos.

Ao somar a ocorrência de alterações morfológicas com mudanças na habilidade em produzir toxina de cepas irradiadas, supõe-se que a irradiação possa induzir alterações de características genéticas em fungos toxígenos. O que está de acordo com relatos anteriores, Chelack et al. (1991) observaram a ocorrência de variantes de *A. ochraceus*, a partir de irradiação em cevada com 1 kGy. A partir da cepa original com conídeos de cor ocre, isolaram cepas com conídeos de cor amarela, branca e com produção de pigmento vermelho que se difunde no meio. As cepas variantes tiveram aumentada sua capacidade de produzir ocratoxina A, permaneceram estáveis e após meses continuaram a exibir esse maior potencial ocratoxígeno. Esses mesmos autores consideram existir uma possível relação inversa entre intensidade (escuro) da coloração da colônia de cepas de *Aspergillus ochraceus* e sua produção de ocratoxina A. Em seu trabalho, cepas que apresentavam pigmento vermelho solúvel no meio de cultivo produziram bem menos que as cepas com conídeos amarelos, a qual teve produção inferior à cepa com conídeos de cor branca.

A produção de micotoxinas por *Aspergillus* está associada com morfogênese. O gene *veA* é requerido para a produção de intermediários de aflatoxinas por *A. parasiticus*, bem como para a formação de estruturas de resistência conhecidas por esclerócios (CALVO et al., 2004). Esse mesmo gene também controla a produção por *A. flavus* de aflatoxinas, ACP e aflatrem (DURAN et al., 2007). Essas conclusões foram atingidas ao verificar que a presença de gene *veA* mutante comprometeu, tanto as características morfológicas, como a produção de micotoxinas. Ao inibir a atividade desse gene, afeta-se a sobrevivência de *A. parasiticus* e *A. flavus*, tendo em vista que ele é necessário à formação de esclerócios (DURAN et al., 2007).

As mutações ocorrem de forma espontânea na natureza e constituem um recurso biológico necessário à evolução das espécies. A radiação ionizante tem sido avaliada por pesquisadores para a produção de mutantes, selecionados para a produção de determinadas substâncias. Um exemplo é a seleção de levedura mutante, produtora de maiores quantidades de carotenóide (SUN et al., 2004). No entanto, há de se preocupar com o tipo de alteração induzida em fungos potencialmente toxígenos contaminantes de cereais e rações.

As doses de radiação ionizante autorizadas para fins quarentenários no Brasil variam de 50 a 300 Gy (0,05 a 0,3 kGy) (MAPA, 2007), cujo objetivo é a desinfestação de insetos-praga. Aplicações inferiores a 1 kGy são consideradas doses baixas de radiação (SHARMA, 1998). Para a redução da microbiota são necessárias doses médias de radiação (1 a 10 kGy), usadas no tratamento de carnes bovinas, de frangos e para descontaminação de temperos (SHARMA, 1998). No presente trabalho, observou-se a ocorrência de alterações na morfologia e fisiologia fúngicas (produção de toxina) com doses médias de radiação gama (2 a 4 kGy).

4.3.6 Avaliação genética de *Aspergillus* por polimorfismo de ADN amplificado ao acaso

A técnica de RAPD baseia-se na repetição cíclica da extensão enzimática de iniciadores (pequenas seqüências complementares de ADN) que se anelam nos dois extremos opostos de uma fita de ADN que serve como molde. Nesta, utiliza-se apenas um único primer ao invés de um par, e esse primer tem sua seqüência arbitrária e, portanto, sua seqüência alvo

⁴ Dados submetidos à publicação.

é desconhecida (ARAUJO et al., 2003). Já foi utilizada com sucesso em *Aspergillus* spp., tais como em *A. fumigatus* (LIN et al. 1995), e *A. ustus* (RATH et al., 2002).

Os marcadores moleculares constituem regiões do genoma possíveis de serem detectadas e sua presença ou ausência pode caracterizar um organismo cuja seqüência e função, na maioria das vezes, são desconhecidas (GOSTIMSKY et al., 1999). Neste trabalho, utilizou-se três marcadores moleculares, cujos produtos de amplificação para as distintas cepas fúngicas são mostrados nas figuras 16, 17 e 18. Três isolados não se desenvolveram não sendo possível avaliá-los. Dentre esses, dois de *A. ochraceus* e como restou apenas uma cepa irradiada desta espécie, a mesma foi retirada da avaliação dos resultados genéticos.

Ao observar o dendograma de similaridade (Figura 19), verifica-se um bom agrupamento e observa-se que, apesar de apresentar algumas alterações, os fungos se agrupam de acordo com a espécie fúngica. Os números da linha superior do gráfico representam a distância, sendo que quanto mais próximos a zero se unam os fungos, maior a similaridade. Os números sobre as ramas do dendograma indicam a robustez do nodo obtido mediante 1000 interações dos agrupamentos possíveis (análise de bootstrap), considerando-se valores acima de 70 bons.

Os isolados de *A. carbonarius* (UFPE 1546) submetidos a 5 kGy e 2 kGy de radiação gama, respectivamente, obtidos a partir de plaqueamento direto do milho em meio DG18, apresentam alto grau de similaridade entre si (> 90 %). Uma pequena diferença foi observada em relação à cepa padrão de *A. carbonarius* não irradiada (0 kGy). No entanto, pode-se dizer que as cepas irradiadas não sofreram mudanças significativas no genoma, ao menos com os três marcadores moleculares utilizados, pois mantêm um grau de similaridade superior a 85 % em relação à cepa padrão original.

As cepas de *A. niger* (ATCC 1004) padrão e irradiada com 2 kGy (esta última obtida após diluição seriada do milho) possuem grau de similaridade superior a 90 %. Observa-se também que esses dois isolados formam um grupo com os isolados de *A. carbonarius*, anteriormente descritos, o que é justificável, pois pertencem à mesma seção (Subgênero Circundati – Seção Nigri).

Quando se observa os isolados de *A. parasiticus* (NRRL 2999) padrão e irradiado com 3,5 kGy e 5,0 kGy de radiação gama, nota-se similitude acima de 95 %, apesar de ser perceptível uma pequena alteração genômica para o isolado irradiado com 5 kGy.

Os isolados de *A. flavus* (NRRL 5520) submetidos a 3,5 e 5,0 kGy de radiação gama, respectivamente, apresentam similitude próxima aos padrões (não irradiados) e ao isolado por diluição do milho irradiado com 2 kGy. Esses cinco isolados formam um grupo com os pertencentes ao *A. parasiticus*. Essas espécies são fechadamente relacionadas, o que está de acordo com sua classificação taxonômica: *A. flavus* e *A. parasiticus* pertencem à seção Flavi do Subgênero Circundati.

O isolado de *A. parasiticus*, irradiado com 2,0 kGy, repicado a partir do processo de diluição seriada, encontra-se isolado dos outros grupos.

Os isolados irradiados de *A. ochraceus* não apresentaram crescimento, não sendo possível sua avaliação genética. Esta dificuldade de avaliação posterior à irradiação é relatada na literatura. Segundo Cordeiro et al. (1995) o não crescimento de fungos alterados morfológicamente em meio próprio indica possível mutação auxotrófica e, fungos submetidos à radiação gama podem apresentar alta frequência de aberrações cromossômicas, o que dificulta uma posterior análise genética.

A técnica RAPD usando o primer R108 mostrou ser de execução simples e eficiente em delimitar cepas para estudos epidemiológicos de *A. flavus*, *A. niger* e *A. fumigatus* isolados de pacientes humanos (RACLAVSKÝ et al., 2006). No entanto, não se conseguiu com esta técnica se isolar grupos toxígenos de atoxígenos. Tran-Dinh et al. (1999), ao usarem 17 primers através da técnica de RAPD sobre 20 isolados de *A. flavus* e 15 de *A. parasiticus*,

encontraram dois grupos em cada espécie, ambos com cepas toxígenas e não toxígenas. Nenhuma associação foi verificada entre RAPD genótipo e a habilidade para produzir toxina. Bau et al. (2005) utilizaram RAPD para caracterizar 53 cepas de *A. carbonarius* produtores e não produtores de OTA, através da qual, esses autores verificaram que 49 cepas toxígenas apresentavam o mesmo padrão, apesar de produzirem diferentes níveis de OTA. Isso significa que não foi encontrada correlação entre seqüência de bandas (clusters) e nível de produção de toxina. No entanto, quatro cepas que formaram um grupo distinto, não produziram OTA e foi considerada a possibilidade de fazerem parte de uma nova espécie de *Aspergillus* da seção Nigri.

A identificação por RAPD de diferentes espécies de *Aspergillus* pode ser usada para obter uma informação rápida e precisa sobre similaridades e dissimilaridades (AIAT, 2006). Neste trabalho, observaram-se pequenas diferenças de similaridades entre cepas padrão irradiadas e não irradiadas, em função da dose aplicada. No entanto, o RAPD genótipo não chega a realizar uma segregação, ao menos com os três marcadores genéticos utilizados. A não observação de alteração genética significativa reforça as conclusões obtidas a partir dos resultados da avaliação morfológica. Foi observado durante a execução deste trabalho que cepas irradiadas, logo que dispostas em meio de cultivo, apresentam alterações morfológicas que as diferem do padrão não irradiado. Porém, ao serem submetidas a repiques sucessivos, passam a apresentar morfologia muito próxima ao padrão. A irradiação induz a um estresse afetando metabolicamente e, ao ser fornecido nutriente e condições adequadas de crescimento aos fungos, essa alteração fisiológica é superada. Esses achados sugerem que cepas irradiadas podem voltar a se desenvolver, deteriorando o substrato, desde que sejam fornecidas condições para seu crescimento.

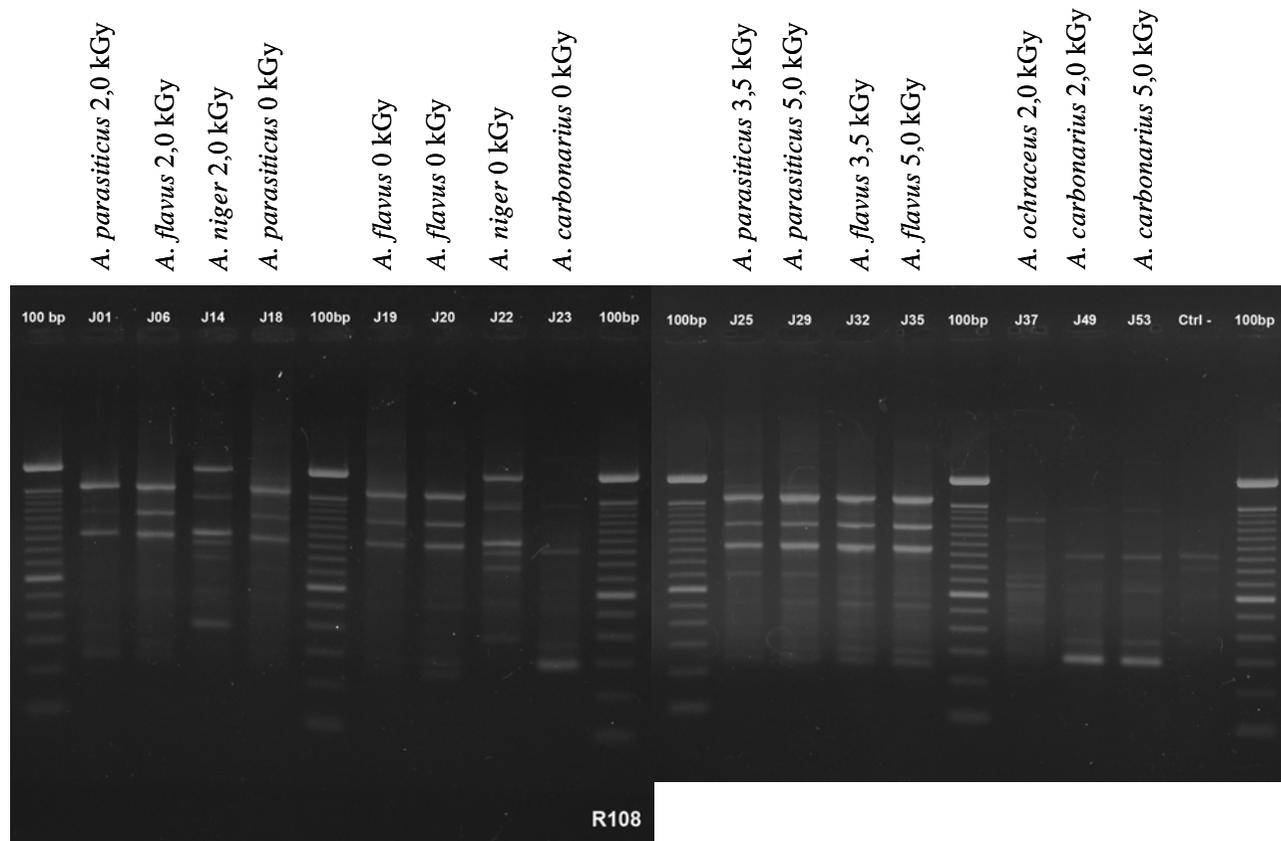


Figura 16. Produtos de amplificação por RAPD obtidos a partir de espécies de *Aspergillus* spp. É mostrada a amplificação com o primer R 108.

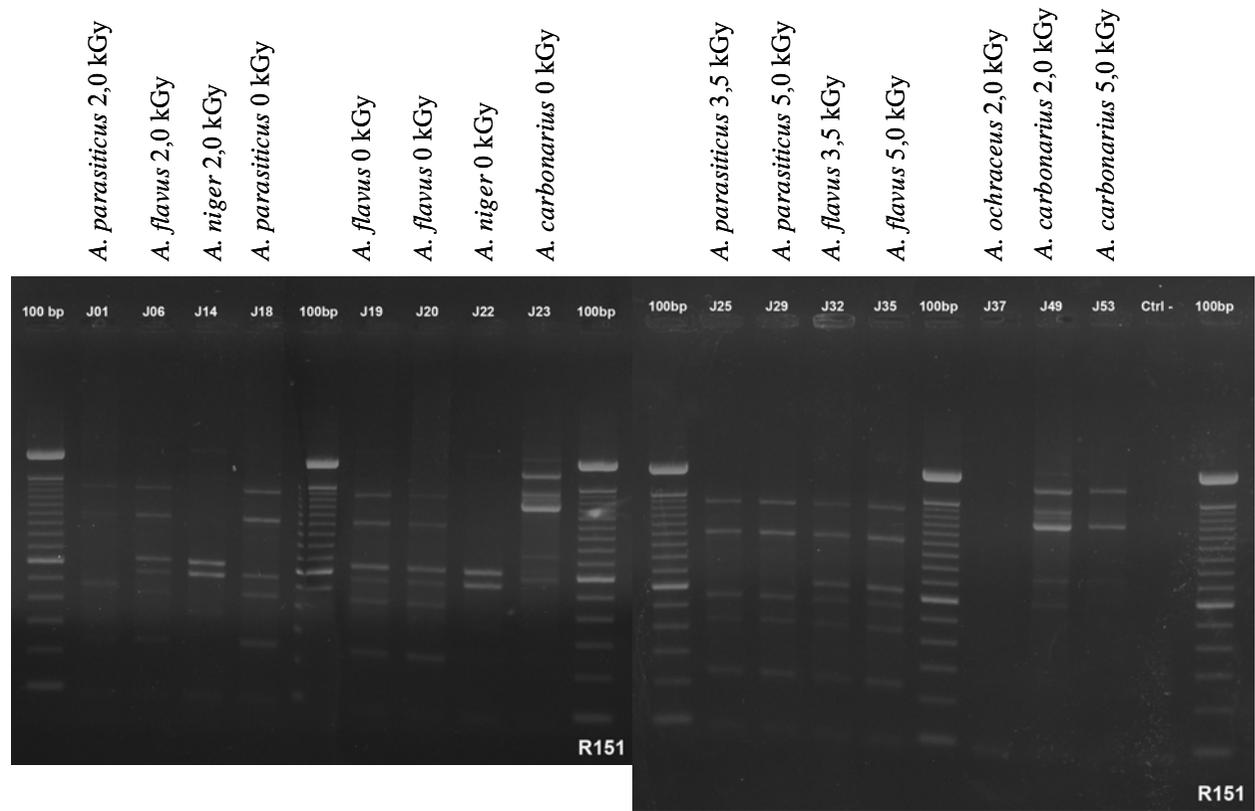


Figura 17. Produtos de amplificação por RAPD obtidos a partir de espécies de *Aspergillus* spp. É mostrada a amplificação com o primer R 151.

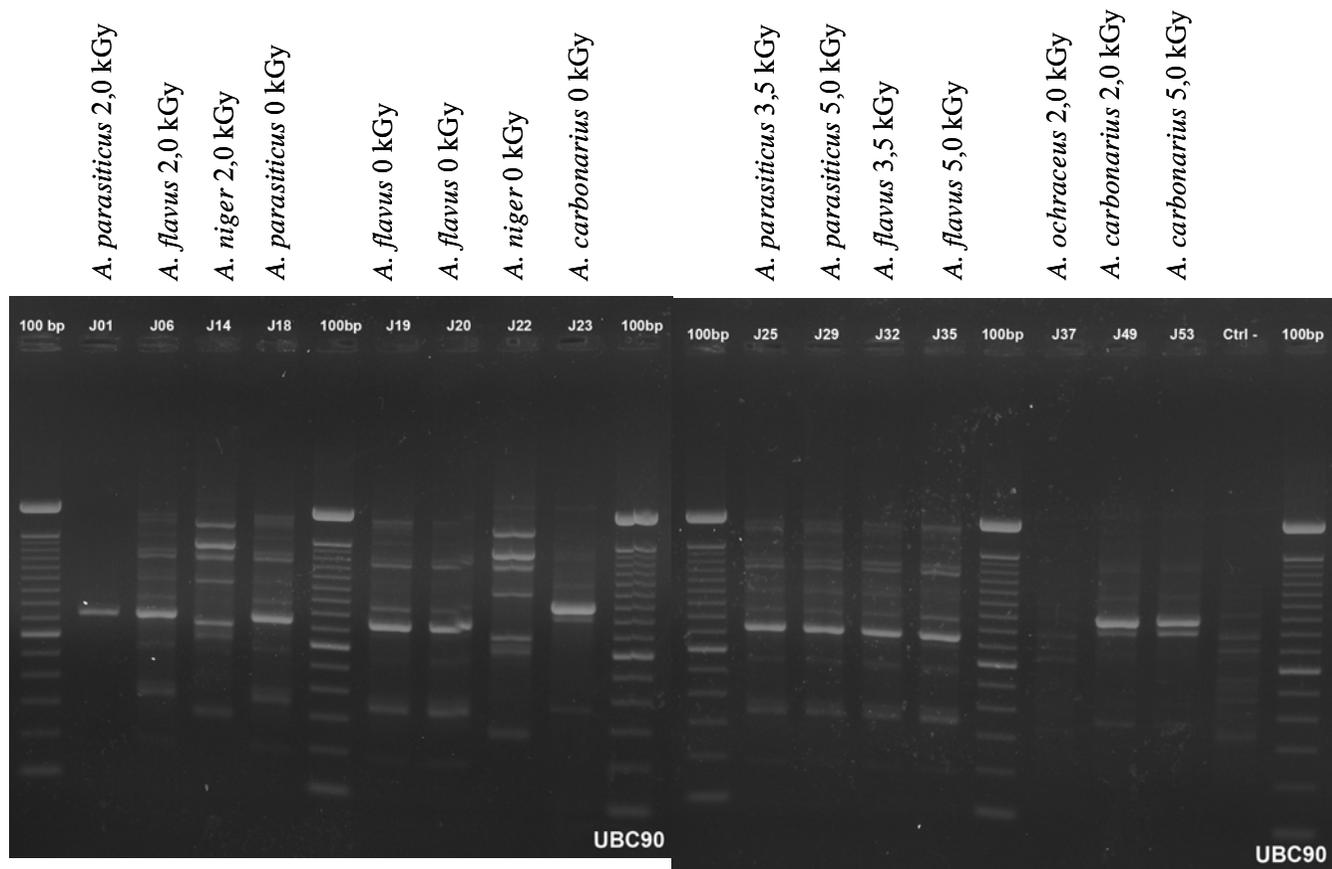


Figura 18. Produtos de amplificação por RAPD obtidos a partir de espécies de *Aspergillus* spp. É mostrada a amplificação com o primer UBC90.

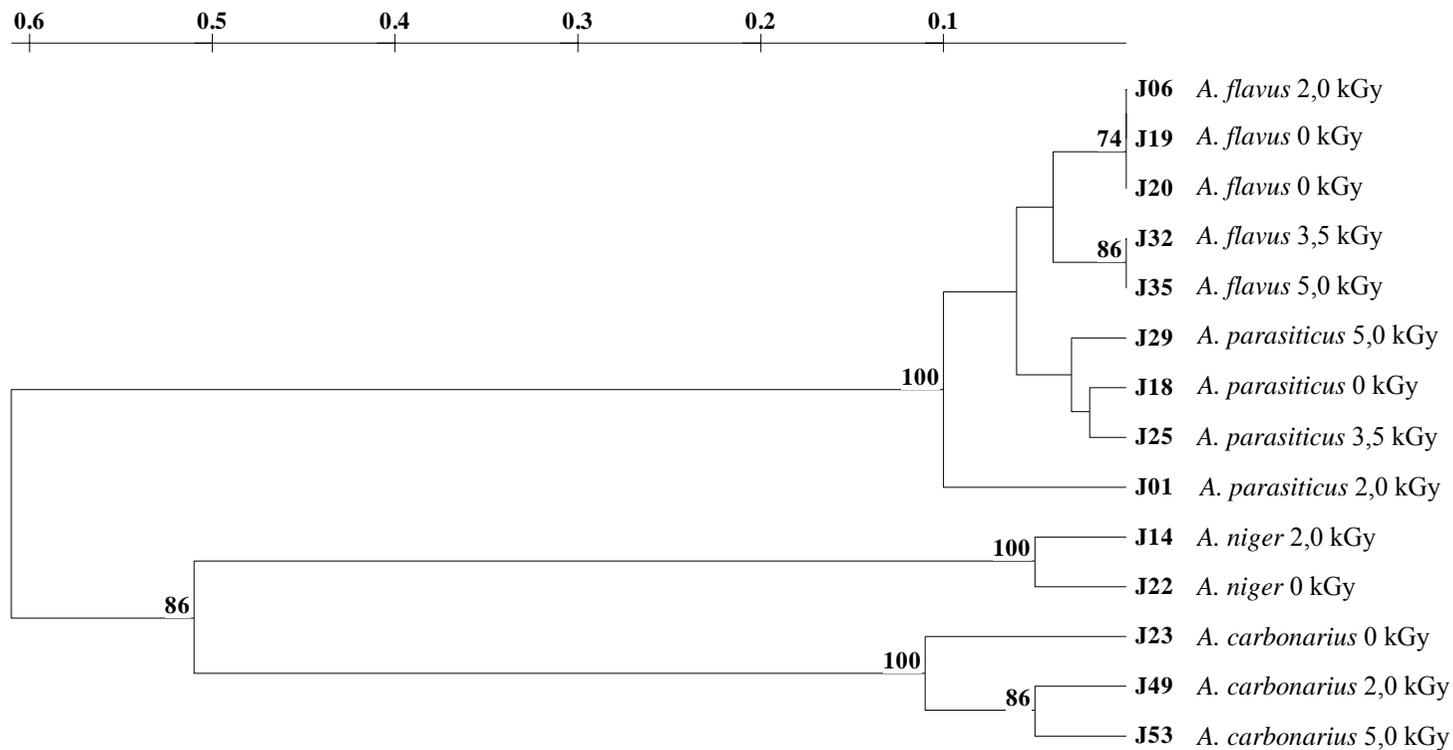


Figura 19. Dendograma de similaridade genética, obtido a partir dos produtos de amplificação por RAPD com os primers R108, R151 e UBC90 para isolados de *Aspergillus* spp. controles e irradiados. A escala superior representa a distância taxonômica.

4.4 Irradiação de Aflatoxina B₁

Além da microbiota deteriorante, preocupa a ocorrência de micotoxinas. Existem estudos sobre a redução da concentração de aflatoxinas (RUSTOM, 1997) e ocratoxina (REFAI et al., 1996) por exposição à radiação gama. Trabalhos prévios demonstram que a dose requerida para reduzir a toxina é superior a necessária para inibir o crescimento fúngico.

No presente trabalho, a aflatoxina B₁ na concentração de 500ppb foi irradiada com 4 e 8 kGy. Ao realizar a leitura das placas de CCD verificou-se que para ambas as doses, não foi detectada fluorescência, o que indica a degradação da AFB₁ (Figura 20).

Aflatoxina é resistente à radiação gama em condições secas, mas mostra-se sensível em soluções aquosas (PATEL et al., 1989).



Figura 20. Cromatografia em camada delgada de AFB₁ na concentração de 500ppb ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) submetido a 0, 4 e 8 kGy de radiação gama. Foi injetado $15 \mu\text{l}$ das amostras, três aplicações cada, e $5 \mu\text{l}$ do padrão de AFB₁ com $18,0645 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Aquino et al (2005) verificaram que a degradação de AFB₁ e AFB₂ foi maior com a dose de 2 kGy quando comparada à de 5 kGy, justificado pelo fato da A_a ter sido diferente, 0.91 e 0.88 para o milho irradiado com 2 e 5 kGy respectivamente. A redução de AFB₂ (97,6% a 2 kGy, 94% a 5 kGy) foi mais eficiente que a redução de AFB₁ (68,9% a 2 kGy, 46% a 5 kGy). A dose de 10 kGy resultou em completa redução tanto de AFB₁ quanto de AFB₂.

Aziz et al. (2007) verificaram que 5 kGy inativou fumonisina B₁ por 96,6%, 87,1% e 100% em trigo, milho e cevada, respectivamente. A dose de 7 kGy foi suficiente para completa destruição de fumonisina B₁ em trigo e milho. A contaminação natural inicial de fumonisina B₁ era de $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$, $5,8 \mu\text{g g}^{-1}$ e $13,2 \mu\text{g g}^{-1}$ para cevada, trigo e milho respectivamente. A redução total da contaminação em cevada com dose mais baixa em relação aos outros substratos provavelmente deveu-se a menor concentração inicial.

Prado et al. (2003), ao irradiarem amendoim com 15, 20, 25 e 30 kGy, conseguiram uma redução de 69-74% e 55-62% para amostras naturalmente contaminadas com 248 e $85 \mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxina B₁.

Aziz e Youssef (2002) descrevem que o tratamento de alimentos e produtos agrícolas com 5 kGy destrói 44-48% de aflatoxina B₁, 16-20% de ocratoxina A e 56-75% de zearalenona, enquanto 10 kGy resultou em 82-88% de redução de AFB₁, 88-94% de zearalenona e apenas 44-48 de OTA. AFB₁ foi completamente destruída com 20 kGy.

Aflatoxinas são altamente resistentes a vários tratamentos físicos e químicos (PATEL et al., 1989). Destruição completa de AFB₁ em amendoim naturalmente contaminado com níveis de 86 e 248 µg kg⁻¹ não foi alcançada mesmo com doses de até 30 kGy (PRADO et al., 2005).

5 CONCLUSÕES

- 1) A contagem fúngica decresce com o aumento da dose de radiação aplicada. E, a dose 8 kGy foi eficiente em eliminar a micobiota de ingredientes e ração avícola.
- 2) Dos fungos que resistiram à dose 3,5 kGy, *Cladosporium* spp., *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. foram os gêneros predominantes.
- 3) A inativação de cepas de referência de *Aspergillus* spp. em meio CYA foi observada a partir de 1,5 kGy, sendo que a dose 4,5 kGy foi responsável pela inativação de todas as colônias. Há diferenças na radiosensibilidade entre espécies e *Aspergillus parasiticus* mostrou-se a mais radorresistente.
- 4) A macroscopia dos fungos irradiados mostra diminuição da conidiogênese e aumento da ocorrência de estruturas de resistência, como os esclerócios. Alterações ultraestruturais foram observadas principalmente em nível de membrana plasmática e de organelas, em especial núcleo e mitocôndrias.
- 5) Irradiação com as doses 2,5 e 4 kGy, em milho, estimulou a produção de AFB₁ por *A. parasiticus* e *A. flavus*, respectivamente.
- 6) *Aspergillus niger* exposto a 2,0 kGy de radiação gama e *A. ochraceus* a 3,5 kGy, ambos em milho, aumentaram a produção de ocratoxina A.
- 7) O processo físico de irradiação altera a morfologia e promove o aumento na produção de toxina após exposição de *Aspergillus* spp. a doses médias de radiação gama (2 a 4 kGy). Não foram observadas alterações significativas no genótipo fúngico, ao menos com os três marcadores utilizados, através da técnica de RAPD. As alterações morfológicas, em função do estresse metabólico induzido pela irradiação, são superadas ao fornecerem nutrientes e condições adequadas ao desenvolvimento dos fungos. Dessa forma, sugere-se que fungos expostos à irradiação podem voltar a se desenvolver e deteriorar o substrato, desde que fornecidas condições para seu crescimento.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, M.L.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M.R.; CABAÑES, F.J. Current importance of Ochratoxin A – Producing *Aspergillus* spp. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 6, p. 903-906, 2001.
- ABARCA, M.L., ACCENSI, F., CANO, J., CABAÑES, F.J. Taxonomy and significance of black *Aspergilli*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 86, p.33–49, 2004.
- ADAMO, M.; GIOVANNOTTI, M.; MAGAUDDA, G.; PLOSSI-ZAPPALA, M.; ROCCHETTI, F.; ROSSI, G. Effect of gamma rays on pure cellulose paper as a model for the study of treatment of “biological recovery” of biodeteriorated books. **Restaurator**, v.19, p. 41-59, 1998.
- ADAMO, M.; BRIZZI, M.; MAGAUDDA, G.; PLOSSI-ZAPPALA, M.; ROCCHETTI, F.; SAVAGNONE, F. Gamma radiation treatment of paper in different environmental conditions. **Restaurator**, v.22, p. 107-131, 2001.
- AIAT, N. Genetic Variability among Three Species of *Aspergillus* 2. Random Amplified Polymorphic Dna (RAPD) Markers for Genetic Analysis. **Journal of Applied Science Research**, v. 2, n.10, p. 709-713, 2006.
- ALEXOPOLUS, C.J.; MILLS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. Fourth Edition. New York: Jhon Wiley and Sons Inc., 1996.
- AL-MASRI, M. R. Changes in apparent metabolizable energy and digestive tract of broiler chickens fed diets containing irradiated meat-bone meal. **Radiation Physics and Chemistry**, v.67, p.73-77, 2003.
- ALMEIDA, A.P.; CORRÊA, B.; MALLOZI, M.A.B.; SAWAZAKI, E.; SOARES, L.M.V. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 321-326, 2000.
- AMARAL, K.A.S. do; NASCIMENTO, G.B.; SEKIYAMA, B.L.; JANEIRO, V.; MACHINSKI JR, M. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.336-342, 2006.
- ANDERSEN, B.; THRANE, U.; SVENDSEN, A.; RASMUSSEN, A. Associated field mycobiota on malt barley. **Canadian Journal of Botany**, v.74, p.854-858, 1996.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC**. 15th ed. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists, 1990.
- AQUINO, S.; FERREIRA, F.; RIBEIRO, D.H.B.; CORRÊA, B.; GREINER, R.; VILLAVICENCIO, A.L.C.H. Evaluation of viability of *Aspergillus flavus* and aflatoxins degradation in irradiated samples of maize. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.352-356, 2005.

AQUINO, S.; GONÇALEZ, E.; REIS, T.A.; SABUNDJIAN, I.T.; TRINDADE, R.A.; ROSSI, M.H.; CORRÊA, B.; VILLAVICENCIO, A.L.C.H. Effect of γ -irradiation on mycoflora of guarana (*Paullinia cupana*). **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76, n. 8-9, p. 1470-1473, 2007.

ARAÚJO, E.S.; SANTOS, A.M.; AREIAS, R.G.B.M.; SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. Uso de RAPD para análise de diversidade genética em arroz. **Agronomia**, v. 37, n. 1, p.33-37, 2003.

AZIZ, N.H.; REFAI, M.K.; ABD EL-AAL, S.S. Occurrence of aflatoxin and aflatoxigenic moulds in coffee beans and decontamination by gamma radiation. **Journal Egyptian Veterinary Medical Association**, v. 50, n. 2, p. 257-265, 1990.

AZIZ, N.H.; MOUSSA, L.A.A. Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits. **Food Control**, v.13, p.281-288, 2002.

AZIZ, N.H.; EL-FAR, F.M.; SHAHIN, A.A.M.; ROUSHY, S.M. Control of *Fusarium* moulds and fumonisin B₁ in seeds by gamma-irradiation. **Food Control**, v.18, p. 1337-1342, 2007.

BATTAGLIA, R.; HATZOLD, T.; KROES, R. Occurrence and significance of OA in food. In: **Workshop Organized by ILSI Europe**, v. 13s, p.1-3, 1996.

BAU, M.; CASTELLÁ, G.; BRAGULAT, M.R.; CABAÑES, F.J. DNA-based characterization of ochratoxin-A-producing and non-producing *Aspergillus carbonarius* strains from grapes. **Research in Microbiology**, v.156, p. 375–381, 2005.

BIEHL, M.L.; BUCK, W.B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, v.50, n.12, p.1058-1073, 1987.

BINDER, E.M. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. **Animal Feed Science and Technology**, v.133, p.149-166, 2007.

BLANK, G.; CORRIGAN, D. Comparison of resistance of fungal spores to gamma and electron beam radiation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p. 269-277, 1995.

BOUDRA, H.; MORGAVI, DP. Mycotoxin risk evaluation in feeds contaminated by *Aspergillus fumigatus*. **Animal Feed Science and Technology**, v.120, p.113–123, 2005.

BORGES, V.B. **Radiossensibilidade de espécies toxígenas do gênero *Aspergillus* Fr. Fr. em meio CYA e em grãos.** 2004. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2004.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Portaria MA/SNAD/SFA n. 07 de 09 de novembro de 1988. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09/11/1988, Seção I, p.21968, 1988.

BRASIL. Resolução RDC n. 21 de 26 de janeiro de 2001. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29/01/01, ISSN 1415-1537.

BRASIL. Resolução RDC n. 274 de 15 de outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16/10/2002.

BRASIL. Portaria n. 4 de 10 de janeiro de 2007. Submete à consulta pública, pelo prazo de 90 (noventa) dias, a contar da data de publicação desta Portaria, o Projeto de Instrução Normativa, com seus anexos, que trata das diretrizes e das recomendações da Norma Internacional de Medidas Fitossanitárias - NIMF nº 18, para disciplinar o uso da radiação ionizante como tratamento Fitossanitário com fins quarentenários. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15/01/2007, Seção 1, Página 3.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 4 de 23 de fevereiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos fabricantes de produtos destinados à Alimentação Animal e o Roteiro de Inspeção. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 01/03/2007, Seção 1, Página 5.

BRESLER, G.; VAAMOND, G.; DEGROSSI, C.; PINTO, V. F. Amaranth grain as substrate for aflatoxin and zearalenone production at different water activity levels. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p.57-61, 1998.

BUENO, D.J.; SILVA, J.O.; OLIVER, G. Fungal isolation and enumeration in foods. **Methods in Molecular Biology**, v. 268, p.127-131, 2004.

CALVO, A.M.; BOK, J.; BROOKS, W.; KELLER, N.P. *veA* is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 4733-4739, 2004.

CHELACK, W.S.; BORSA, J.; SZEKELY, J.G.; MARQUARDT, R.R.; FROHLICH, A.A. Variants of *Aspergillus alutaceus* var. *alutaceus* (Formerly *Aspergillus ochraceus*) with Altered Ochratoxin A Production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 9, p. 2487-2491, 1991.

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**, v. 57, n. 9, p. 2492-2496, 1991.

CHEN, Q.; HÁ, Y.; CHEN, Z. A study on radiation sterilization of SPF animal feed. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 57, p. 329-330, 2000.

CHRISTENSEN, M. A synoptic key and evaluation of species in the *Aspergillus flavus* group. **Mycologia**, v.73, p.1056-1084, 1981.

CORDEIRO, V.K.; LIMA, E.A.L.A.; AZEVEDO, J.L. Survival and mutant production induced by mutagenic agents in *Metarhizium anisopliae*. **Scientia Agricola**, v. 52, n. 3, p. 548-554, 1995.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCES AND TECHNOLOGY TASK FORCE REPORT. **Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems**. Ames, IA., 2003. n.139.

CREPPY, E.E. BAUDRIMONT, I.; BETBEDER, A-M. Prevention of nephrotoxicity of ochratoxin A, a food contaminant. **Toxicology Letters**, v. 82/83, p. 869-877, 1995.

CRUZ, L.C.H. Micotoxinas são tão importantes. In: **Micotoxinas: Perspectiva Latinoamericana**. L.C.H. da Cruz (editor). Rio de Janeiro: Editora Universidade Rural, 1996.

CUERO, R.G.; SMITTH, J.E.; LACEY, J. Interaction of water activity, temperature and substrate on mycotoxin production by *Aspergillus flavus*, *Penicillium viridicatum* and *Fusarium graminearum* in irradiated grains. **Transactions of the British mycological Society**, v. 89, p. 221-226, 1987.

DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.; PALACIOS, G.; REYNOSO, M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v.137, p.179-184, 1997.

DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; LUNA, M.; ANCASI, G.; REYNOSO, M.M.; CHIACCHIERA, S.; MIAZZO, R.; PALACIO, G. Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia** v.141, p.37-43, 1998.

DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; HALLACK, C.; CHIACCHIERA, S. M.; PALACIOS, G.; ROSA, C.A.R. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section Nigri in Argentina. **Food Additives and Contaminants**, v.19, n.11, p.1065-1072, 2002.

DIAZ, G.J.; BOERMANS, H.J. Fumonisin toxicosis in domestic animals: a review. **Veterinary and Human Toxicology**, v.36, p. 548-555, 1994.

DILKIN, P.; MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; HICKMANN, J.L. Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de aflatoxinas em híbridos de milho. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p.137-141, 2000.

DILKIN, P. Micotoxicose suína: aspectos preventivos, clínicos e patológicos. **Biológico**, v.64, n.2, p.187-191, 2002.

DIONELLO, R.G.; RADIINZ, L.L.; ELIAS, M.C.; MEIRELLES, M.C.A. Método de secagem e sistema de armazenamento na ocorrência de micotoxinas em milho. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.25, p.09-15, 2000.

D'MELLO, J.P.F.; MACDONALD, A.M.C. Mycotoxins. **Animal Feed Science Technology**, v.69, p.155-166, 1997.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of Soil fungi**, London: Academic Press, 1980.

DURAN, R.M.; CARY, J.W.; CALVO, A.M. Production of cyclopiazonic acid, aflatoxin, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by *veA*, a gene necessary for sclerotial formation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p.1158-1168, 2007.

ELLNER, F.N. Mycotoxins-quantification, control and regulation in agricultural produce. In: Symposium proceedings n. 75. Human exposure to pesticide residues, natural toxins and GMOs real and perceived risks. N. Atreya; R. Billington (Eds), p.43-51, 2000.

Environmental Health Criteria 105. Selected Mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot. International Programme on Chemical Safety. Geneva: WHO, 1990.

ESTEBAN, A.; ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R.; CABAÑES, F.J. Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. **Food Microbiology**, v. 23, p. 634–640, 2006.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food and Nutrition Paper. Manuals of food quality control Vol. 10 – Training in Mycotoxins analysis. **Food and Agriculture Organization**, Rome, 1990. 109 pp.

FARIAS, A.X., ROBBS, C.F., BITTENCOURT, A.M., ANDERSEN, P.M.; CORRÊA, T.B.S. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 617-621, 2000.

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

FIGUEIRA, E.L.Z.; COELHO, A.R.; ONO, E.Y.S.; HIROOKA, E.Y. 2003. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 2, p. 359-378, 2003.

FLETCHER, H.L. Resistance to radiation, recombination repair of DNA and chromosome organisation. **Mutation Research**, v.80, p.75-89, 1981.

FRAGA, M.E.; CURVELLO, F.; GATTI, M.A.; CAVAGLIERI, L.R.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R. Potencial Aflatoxin and Ochratoxin A Production by *Aspergillus* Species in Poultry Feed Processing. **Veterinary Research Communications**, v. 31, p. 343-353, 2007.

FRISVAD, J.C.; THRANE, U. Mycotoxins production by food-borne fungi. In: SANSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. Introduction to food-borne fungi. Holanda: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, 1996. p.251-260.

GILBERT, J.; FREMY, J.M. Determination of mycotoxins and plant toxins: panel discussion. **Natural Toxins**, v.3, 317, 1995.

GMP Regulations on Product Standards in the Animal Feed Sector, GMP14, 17-08-2005. 25p.

GONÇALES, E; PINTO, M.M.; FELICIO, J.D. Análises de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. **Biológico**, v. 63, n.1-2, p.15-19, 2001.

GOTMISKY, S. A.; KOKAEVA Z. G.; BOBROVA V. K. Use of molecular marker for the analysis of plant genome. **Research Journal of Genetics**, v. 11, n.35, p. 1538- 49,1999.

GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**, 2nd ed. New York: Wiley-Liss, 1994. 458p.

GROENE, E.M.; JAHN, A.; HORBACH, G.J.; FINK-GREMMELS, J. Mutagenicity and genotoxicity of the mycotoxin ochratoxin A. **Environ. Toxicology and Pharmacology**, v. 1, p.21-26, 1996.

GUNTERUS, A.; ROZE, L.V.; BEAUDRY,R.; LINZ, J.E. Ethylene inhibits aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* grown on peanuts. **Food Microbiology**, v. 24, p. 658–663, 2007.

HARTLEY, R.O.; NESBITT, B.F.; O'KELLY, J. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. **Nature**, v. 197, p. 1056-1058, 1963.

HERNANDES NK, VITAL HC, SABAA-SRUR UO. Irradiação de alimentos: vantagens e limitações. **Boletim SBCTA**, v. 37, p.154-159, 2003.

HOCKING, A.D.; PITT, J.I. Dichloran-Glicerol media for enumeration xerophilic fungi from low moisture foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, p. 488-492, 1980.

HUSSEIN, S.H.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v.167, p.101-134, 2001.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/cgi-bin/prtab>> Acesso em 01 de maio de 2005.

International Consultative Group on Food Irradiation (ICGFI). Code of good irradiation practice for the control of pathogenic microorganisms in poultry feed. Document n. 19. Vienna, 1995. Disponível em: < <http://www.iaea.or.at/icgfi/documents/19document.htm> >. Acesso em: 01 set. 2003.

ITO, H.; KUME, T.; TAKEHISA, M. & IIZUKA, H. Distribution of Microorganisms in Animal Feeds and Their Disinfection by Radiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v.18, n. 3-4, p.569-574, 1981.

KARUNARATNE, A.; BULLERMAN, L.B. Interactive effects of spore load and temperature on aflatoxin production. **Journal of Food Protection**, v.53, p.227-229, 1990.

KAWASHIMA, L.M., VALENTE SOARES, L.M. Incidência de fumonisina B₁, aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n.3, p.516-521, 2006.

KING, A.D.; HOCKING, A. D.; PITT, J.I. Dichloran-Rose bengal medium for enumeration and isolation of fungi from foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, n.5, p.959-964, 1979.

KLICH, M. A. **Identification of Common *Aspergillus* Species**. Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 116p.

KLICH, M.; PITT, J.I. **A Laboratory Guide to common *Aspergillus* species and their Teleomorphs**. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 1988, North Ryde, 116 p

KROGH, P. Role of ochratoxin in disease causation. **Fd Chem. Toxic.**, v. 30, n. 3, p. 213-224, 1992.

KUBENA, L.F.; HUFF, W.E.; HARVEY, R.B.; YERSIN, A.G.; ELISSALDE, M.H.; WITXEL, D.A.; GIROIR, L.E.; PHILLIPS, T.D.; PETERSON, H.D. Effects of a hydrated sodium calcium aluminosilicate on growing turkey poult during aflatoxicosis. **Poultry Science**, v.70, n.8, p.1823-1830, 1991.

KUIPER-GOODMAN, T. Mycotoxins: risk assessment and legislation. **Toxicology Letters**, v.82/83, p.853-859, 1998.

LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2ª ed. Curitiba: Paranaset, 1997.

LEE, H. B.; MAGAN, N. Impact of environment and interspecific interactions between spoilage fungi and *Aspergillus ochraceus* on growth and ochratoxin production in Maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p.11-16, 2000.

LEESON, S.; DIAZ, G.J.; SUMMERS, J.D. **Poultry metabolic disorders and mycotoxins**. Guelph: University Books, 1995.

LEGARDA, T. M.; BURDASPAL, P. A. Ocratoxina A en cervezas elaboradas en España y en otros países europeos. **Alimentaria**, abril, p.115-122, 1998.

LI, W.T. Simple method for constructing phylogenetic trees from distance matrices. **Proceedings - National Academy of Sciences USA**, v. 78, p.1085-1089, 1981.

LIN, D.; LEHMANN, P.F.; HAMORY, B.H.; PADHYE, A.A.; DURRY, E.; PINNER, R.W.; LASKER, B.A. Comparison of three typing methods for clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 1596–1601, 1995.

LÓPEZ, A.G. **Regulación de Componentes de Aceites Esenciales sobre la Toxicogénesis de *Fusarium verticillioides***. (Tesis Doutorado) Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba. 2006. 97p.

LÓPEZ-GARCÍA, R.; PARK, D.L. Effectiveness of postharvest procedures in management of mycotoxin hazards. In: Mycotoxins in agriculture and food safety. Sinha K.K., Bhatnagar, D. (eds.). Marcel Dekker, Inc. p. 407-433, 1998.

MAGNOLI, C.; HALLAK, C.; ASTORECA, A.; PONSONE, L.; CHIACCHIERA, S.M; PALACIO, G.; DALCERO, A. Surveillance of Toxigenic Fungi and Ochratoxin A in Feedstuffs from Córdoba Province, Argentina. **Veterinary Research Communications**, v. 29, p. 431-445, 2005.

MAITY, J.P.; CHAKRABORTY, A.; SAHA, A.; SANTRA, S.C.; CHANDA, S. Radiation-induced effects on some common storage edible seeds in India infested with surface microflora. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 75, n.5, p.1965-1072, 2003.

MAITY, J.P.; CHAKRABORTY, A.; CHANDA, S.; SANTRA, S.C. Effect of gamma radiation on growth and survival of common seed borne fungi in India. **Radiation Physics and Chemistry** (2008), doi:10.1016/j.radphyschem.2008.02.003.

MALLOZZI, A.B.; CORRÊA, B. Fungos Toxigênicos e Micotoxinas. **Boletim Técnico do Instituto Biológico**, n.12, p.5-26, 1998.

MARTINS, M.L.; MARTINS, H.M. Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of deoxynivalenol and zearalenone in corn (*Zea mays*) by *Fusarium graminearum*. **Food Chemistry**, v. 79, p.315-318, 2002.

MIRAGLIA, M.; BRERA, C.; CORNELI, S.; CAVA, E.; MONTAMINO, G. & MIRAGLIA, E. – 1998. Occurrence of ochratoxin A. (AO) in maternal Serum, Placenta and folliculum. In: Mycotoxins and Phycotoxins – Development in chemistry, Toxicology and food safety. Proceedings of International IUPAC symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, 9 – *Miraglia, M.; van Egmond, H.P; Brera, C. & Gilbert, J.* (Eds). Pages 165-179 – **Alaken, Inc. Fort Collins, Colorado**, 1998.

MONTANI, M.L.; VAAMONDE, G.; RESNIR, S.L.; BUERA, P. Water activity influence on aflatoxin accumulation in corn. **International Journal of Food Microbiology**, v. 6, p. 349-353, 1988.

MOSS, M. O. Recent studies of mycotoxins. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 84, p. 62S-76S, 1998.

NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F.O. ***Fusarium species an illustrated manual for indentification***. University Park: The Pennsylvania State University Press. 1983.

NESBITT, B.; O'KELLY, J.; SEARGENT, K.; SHERIDAN, A. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. **NATURE**, v. 195, p. 1062-1063, 1962.

NORBERG, N.A.; SERRA-FREIRE, S.M.N. Identificação de dose letal mínima por irradiação gama para *Aspergillus flavus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.25, n.37, p.75-79, 1993.

OLIVEIRA, G.R.; RIBEIRO, J.M.; FRAGA, M.E.; CAVAGLIERI, L.R.; DIREITO, G.M.; KELLER, K.M.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R. Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro satate, Brazil. **Mycopathologia**, v. 162, p. 355-362, 2006.

OSWEILER, G.D. Mycotoxins and livestock: What role do fungal toxins play in illness and production losses? **Veterinary Medicine**, v.85, p.89-94, 1990.

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

PATEL, U.D.; GOVINDARAJAN, P.; DAVE, P.J. Inactivation of Aflatoxin B₁ by Using the Synergistic Effect of Hydrogen Peroxide and Gamma Radiation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.2, p.465-467, 1989.

PATERNIANI, E. **Melhoramento e produção do milho no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1978.

PIER, A.C. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. **Journal Animal Science**, v. 70, p.3964-3967, 1992.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage, second edition**. London: Black Academic & Professional – Chapman & Hall, 1997, 593p.

PITT, J.I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British Medical Bulletin**, v. 56, p.184-192, 2000.

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

PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated review. **Revue de Médecine Veterinaire**, v.149, p.479-492, 1998.

PONTES NETTO, D.; TRAMONTINI, A.Z.; SASSAHARA, M.; KUBOTA, E.Y. Micotoxinas em alimentação animal no período de maio/1997 a março/2001 no Laboratório de Toxicologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina – Londrina – PR. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, n. 1, p. 63-69, 2002.

PRADO, G.; CARVALHO, E.P.; OLIVEIRA, M.S.; MADEIRA, J.G.C.; MORAIS, V.D.; CORREA, R.F.; CARDOSO, V.N.; SOARES, T.V.; SILVA, J.F.; GONÇALVES, R.C.P. Effect of gamma irradiation on the inactivation of aflatoxin B₁ and fungal flora in peanut. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, n.suppl.1, p.138-140, 2003.

PRADO, G.; CARVALHO, E.P.; OLIVEIRA, M.S.; GAZZINELLI, J.E.C.M.; MORAES, V.D.; CORRÊA, R.F.; CARDOSO, V.N.; SOARES, T.V. Influência da irradiação gama (⁶⁰Co) na destruição da aflatoxina B₁ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n.2, p.186-192, 2005.

PRADO, G.; CARVALHO, E.P.; GAZZINELLI, J.E.C.M.; MORAES, V.A.D.; OLIVEIRA, M.S.; CORRÊA, R.F.; CARDOSO, V.N. Efeito da irradiação gama (⁶⁰Co) na frequência fúngica de amendoim *in natura* em função do tempo de prateleira. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n.5, p.930-936, 2006.

QUEZADA, T.; CUÉLLAR, H.; JARAMILLO-JUÁREZ, F.; VALDIVIA, A.G.; REYES, J.L. Effects of aflatoxin B₁ on the liver and kidney of broiler chickens during development. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C** 125, n.3, p.265-272, 2000.

QUINN, G.P.; KEOUGH, M.J. (Eds.) Experimental Design Data analysis for biologists. Cambridge University Press, Cambridge, United England, 2002, pp. 72-76.

RACLAVSKÝ, V.; TRTKOVÁ, J.; RUSKOVÁ, L.; BUCHTA, V.; BOLEHOVSKÁ, R.; VACKOVÁ, M.; HAMAL, P. Primer R108 performs Best in the RAPD Strain Typing of Three *Aspergillus* Species Frequently Isolated from Patients. **Folia Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 136-140, 2006.

RASOOLI, I.; OWLIA, P. Chemo prevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. **Phytochemistry**, v.66, p.2851-2856, 2005.

RASOOLI, I.; REZAEI, M. B.; ALLAMEH, A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-parlock*. **Food Control**, v.17, p. 359–364, 2006.

RATH, P.; PETERMEIER, K.; VERWEIJ, P.E.; ANSORG, R. Differentiation of *Aspergillus ustus* Strains by Random Amplification of Polymorphic DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2231–2233, 2002.

RAZZAGHI ABYANEH, M., SHAMS, M., KAWACHI, M., ESLAMIFAR, A., SCHMIDT, O., SCHMIDT, A., YOSHINARI, T. Ultrastructural evidences of growth inhibitory effects of a novel biocide, Akacid, on an aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. **Toxicon**, v. 48, p.1075-1082, 2006.

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**, v.47, n.7, p.617-621, 1996.

RIBEIRO, J.M.M.; ROSA, C.A.R.; CURVELLO, F.; FRAGA, M.E. Toxigenic mycoflora and mycotoxins (Aflatoxins and Ochratoxin A) in poultry feed in Rio de Janeiro, Brazil. In: X Interantional IUPAC – Symposium Mycotoxins and Phycotoxins, 2000, Guarujá-SP-Brasil. Official Program and Abstract Book, p. 133, 2000.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Occurrence of mycotoxins and mycotoxin-producing fungi in Latin America. In de KOE, W.J.; SAMSON, R.A.; VAN EGMOND, H.P.; GILBERT, J.; SABINO, M. (Eds.). Mycotoxins and phycotoxins in perspectiva at the turn of the millennium, p.309-320. Wageningen: W.J. de KOE. 2001.

ROSA, C.A.R. **Micobiota toxígena e ochratoxinas em rações destinadas à alimenta cão de aves, bovinos, suínos e importância em saúde animal**. Tese de Doutorado (Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2002.

ROSA, C.A.R.; RIBEIRO, J.M.M.; FRAGA, M.E.; GATTI, M.; CAVAGLIERI, L.R.; MAGNOLI, C.E.; DALCERO, A.M.; LOPES, C.W.G. Mycoflora of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Veterinary Microbiology**, v. 113, p. 89-96, 2006.

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

SALAY, E. & MERCADANTE, A.Z. Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: Occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination. **Food Control**, v.13, p.87-92, 2002.

SALEH, Y.G.; MAYO, M.S.; AHEARN, D.G. Resistance of Some Common Fungi to Gamma Irradiation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.8, p.2134-2135, 1988.

SAMAPUNDO, S.; DEVLIEGHERE, F.; GEERAERD, A.H.; MEULENAER, B. DE; VAN IMPE, J.F.; DEBEVERE, J. Modelling of the individual and combined effects of water activity and temperature on the radial growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on corn. **Food Microbiology**, v. 24, p. 517–529, 2007.

SAMSON, R.A.; PITT, J.I. **Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics**. New York: plenum Press. 510p, 2000.

SANTOS, A.F.; VIZEU, D.M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Determinação da dose de radiação gama para reduzir a população de *Salmonella* spp em carne de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.2, p.200-205, maio-ago. 2003.

SANTURIO, JM. Mycotoxins and Mycotoxicosis in Poultry. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, n. 1, 2000. ISSN 1516-635X.

SCUDAMORE K.A.; MACDONALD S.J. A collaborative study of an HPLC method for determination of ochratoxin A in wheat using immunoaffinity column clean-up. **Food Additives and Contaminants**, v.15, p. 401-410, 1998.

SCUSSEL, V.M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. p. 19-22.

SHARMA, A. **Mycotoxins: Risk Evaluation and Management in Radiation-Processed Foods**. In: SINHA, K.K.; BHATNAGAR, D. (eds.) *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. USA, Maral Dekker, 1998.

SILVA, E.N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 2, 2002.

SILVA, M.da; MORAES, A.M.L.; NISHIKAWA, M.M.; GATTI, M.J.A.; ALENCAR, M.A.V.de; BRANDÃO, L.E.; NÓBREGA, A. Inactivation of fungi from deteriorated paper materials by radiation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 57, p.163-167, 2006.

SIMÃO, A.M. *Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico* 2ª ed. São Paulo: Nobel, 1985. capítulo 11.

SMITH L.E.; MOSS, M.O. *Mycotoxins: Formation, analysis and significance*. New York: Jhon Wiley and Sons. pp.1-143, 1985.

SUN, N.; LEE, S.; SONG, K.B. Characterization of a carotenoide-hyperproducing yeast mutant isolated by low-dose gamma irradiation. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.263-267, 2004.

TANAKA, M.A.S. Sobrevivência de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho mantidas em duas condições de armazenamento. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 60-64, 2001.

TÉREN J.; VARGA J.; HAMAR Z.; RINYU E.; KEVEI F. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. **Mycopathologia**, v. 134, p. 171-176, 1996.

TRAN-DINH, N.; PITT, J.I.; CARTER, D.A. Molecular genotype analysis of natural toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Mycological Research**, v.103, p. 1485-1490, 1999.

TUNG, H.T.; WYATT, R.D.; THAXTON, P.; HAMILTON, P.B. Concentrations of serum proteins during aflatoxicosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.34, n.2, p.320-326, 1975.

UENO, Y.; MAKI, S.; LIN, J.; FURUYA, M.; SUGIURA, Y. 7 KAWAMURA, O. A 4-year study of plasma ochratoxin a selected population in Tokyo by immunoassay and immunoaffinity column-linked HPLC. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 36, n. 5, p. 445-449, 1998.

URBAIN, W. **Food Irradiation**. (s.l.): Academic Press, 1996.

VAN DE PEER, Y., DE WACHTER, R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. **Computer Applications in the Biosciences**, v.10, p. 569-570, 1994.

VAN EGMOND, H.P. Mycotoxins? Detection, reference material and regulation. In: SAMSON, R.A.; HOESKTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. Introduction to Food-borne Fungi, 6 ed. Baarn, Netherlands: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, p.332-338, 2000.

VINING, L.C. Role of secondary metabolites from microbes. In: Secondary metabolites: their function and evolution. Chadwick D.J.; Whelan J.(eds.). John Wiley: Chichester pp: 184-194, 1992.

VITAL, H. C. *et al.* Experimentos dosimétricos no irradiador gama do IPE. In: ENCONTRO NACIONAL DE APLICAÇÕES NUCLEARES (ENAN), 5., Rio de Janeiro, 2000.

VITAL, H. C. Mapeamento dosimétrico do irradiador gama do IPE, Nota Técnica Interna do IPE, 2000.

WEBB, B.D.; THIERS, H.D.; RICHARDSON, L.R. Studies in Feed Spoilage Inhibition of Mold Growth by Gamma Radiation. **Applied Microbiology**, v. 7, p. 329-333, 1959.

WHO (World Health Organization) “*Environmental Health Criteria 105 – Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichotecenes and Ergot*”(1990). WHO, Rome.

WYATT, R.D. Metionina en la Dieta en Casos de Aflatoxicosis em pollo de engorde. **Avicultura profesional**, v. 5, n.2, p.53-54, 1987.

ZAPATA, M.L. Estudio de posibles efectos sinérgicos de la ingesta subcrónica combinada de diacetoxispermol y de ocratoxina A. (tesis doutorado). Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad nacional Del Litoral. 2000. 203p.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. Ochrotoxin A. in serum of residents north of Alps. **Journal of Chromatography B**, v.666, p.85-89, 1995.

7 ANEXOS

A	Cálculo do tempo de irradiação	69
B	Cálculo de produção de toxina	70
C	Fórmulas dos meios de cultura empregados	71
D	Análise estatística	74
E	Tabelas de avaliação morfológica das cepas de referência de <i>Aspergillus</i> submetidas à radiação gama	76

ANEXO A - Cálculo do tempo de irradiação

O cálculo do tempo necessário de exposição das amostras aos raios gama, necessários para atingir a dose de radiação pretendida, foi realizado através de um programa desenvolvido pelo Dr. Hélio Vital. Para cada amostra e dose foi calculado o tempo específico. Como exemplo, segue o cálculo do tempo de exposição para as amostras de 2 kGy (cepas de referência em milho picado). Foi considerada a altura média de todas as amostras, depois de acondicionadas na gaveta do irradiador, de sete cm (14 /2 cm).

TEMPO DE EXPOSIÇÃO

GAVETA NO CENTRO DA CÂMARA SUPERIOR DO BPCDI

Autor: Helio C. Vital (IPE, Out. 1999)

Data (ex: 19,10,2000)? 24,5,2007

Dose Média Total Desejada (Gy)? 2000

Diâmetro ou Altura Máxima da Amostra (cm)? 14

Densidade da Amostra (g/cm³)? 0.2

Geom. Amostra: Esf.(=1); Cil.(=2); Ret.(=3)? 2

Fatores para Cálculo da Taxa de Dose Efetiva

Decaimento	Altura	Auto-Atenuação	Build-Up	Total
0.8455	0.7558	0.9767	1.0000	0.6241

Taxa Média : 21.470 Gy/min

Tempo de cada Meia Exposição: 0h 46m 17.2s

Tempo de uma Exposição Contínua: 1h 32m 51.7s

Observações:

Amostras devem ser giradas 180 graus no meio da irradiação

Trânsitos da fonte não devem ser incluídos na cronometragem

Erros sistemáticos médios estimados: 3 - 8%

Outro Cálculo (S ou N) ?

ANEXO B - Cálculo de produção de toxina

- *Aspergillus parasiticus* (0 kGy)

Ao comparar o padrão com a amostra em CCD, verificou-se que: 2 µL da amostra era equivalente a 2 µL padrão. O padrão foi previamente quantificado por espectrofotometria em 3,4 µg/ml de AFB₁. Dessa forma os cálculos de produção foram feitos como descritos abaixo.

1000 µL ——— 3,4 µg AFB₁
2 µL (injetado) ——— **X = 0,0068 µg AFB₁**

2 µL amostra ——— 0,0068 µg AFB₁
500 µL (volume ressuspendido) ——— **X = 1,7 µg AFB₁**

0,1981 gr micelio ——— 1,7 µg AFB₁
1 gr micelio ——— **X = 8,5815 µg AFB₁**

Quantidade de toxina detectada: 8,5815 µg AFB₁

- *A. parasiticus* (2,5 kGy)¹

Ao comparar o padrão com a amostra em CCD, verificou-se que: 2 µL da amostra era equivalente a 6 µL padrão.

1000 µL ——— 3,4 µg AFB₁
6 µL ——— **X = 0,0204 µg AFB₁**

2 µL amostra ——— 0,0204 µg AFB₁
500 µL (volume ressuspendido) ——— **X = 5,1 µg AFB₁**

0,0986 gr micelio ——— 5,1 µg AFB₁
1 gr micelio ——— **X = 51,7241 µg AFB₁**

Quantidade de toxina detectada: 51,7241 µg AFB₁

- *A. parasiticus* (2,5 kGy)²

Ao comparar o padrão com a amostra em CCD, verificou-se que: 2 µL da amostra era equivalente a 6 µL padrão.

1000 µL ——— 3,4 µg AFB₁
6 µL ——— **X = 0,0204 µg AFB₁**

2 µL amostra ——— 0,0204 µg AFB₁
500 µL (volume ressuspendido) ——— **X = 5,1 µg AFB₁**

0,0743 gr micelio ——— 5,1 µg AFB₁
1 gr micelio ——— **X = 68,6406 µg AFB₁**

Quantidade de toxina detectada: 68,6406 µg AFB₁

ANEXO C – Fórmulas dos meios de cultura

1. Agar Dichloran Rose Bengal Cloranfenicol (DRBC)

Glicose	10 g
Peptona bacteriológica	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Agar-agar	15 g
Rose Bengal ^a	25 mg
Dichloran ^b	2 mg
Cloranfenicol	100 mg
Água destilada	1000 ml

^a 5 % m/v em água – 0,5 ml

^b 0,2 % m/v em etanol – 1 ml

Esterilizar por autoclavação a 121° C por 15 minutos. O pH final deve estar entre 5,5 e 5,8. Armazenar o meio preparado protegido da luz, pois os fotoprodutos de Rose Bengal são inibidores fúngicos.

2. Agar Dichloran Glicerol 18 % (DG18)

Glicose	10 g
Peptona bacteriológica	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Agar-agar	15 g
Glicerol	220 g
Dichloran ^a	2 mg
Cloranfenicol	100 mg
Água destilada	1000 ml

^a 0,2 % m/v em etanol – 1 ml

Esterilizar por autoclavação a 121° C por 15 minutos. O pH final deve estar entre 5,5 e 5,8.

3. Agar Dichloran Cloranfenicol Peptona (DCPA)

Glicose	10 g
Peptona bacteriológica	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Agar-agar	15 g
Dichloran ^a	2 mg
Cloranfenicol	100 mg
Água destilada	1000 ml

^a 0,2 % m/v em etanol – 1 ml

Esterilizar por autoclavação a 121° C por 15 minutos. O pH final deve estar entre 5,5 e 5,8.

4. Agar Extrato de Malte (MEA)

Glicose	1 g
Peptona bacteriológica	20 g
Extrato de malte	20 g
Agar-agar	20 g
Água destilada	1000 ml

Esterilizar por autoclavação a 121° C por 15 minutos. O pH final .

5. Agar Czapek Extrato de Levedura (CYA)

Sacarose	30 g
Czapek concentrado	10 ml
Solução traço de metais	1 ml
KH ₂ PO ₄	1 g
Extrato de levedura	5 g
Agar-agar	15 g
Água destilada	1000 ml

Esterilizar por autoclavação a 121° C por 15 minutos. O pH final 6,7.

Czapek concentrado		Solução traço de metais	
NaNO ₃	30 g	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,5 g
KCl	5 g	ZnSO ₄ .5H ₂ O	1 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g	Água destilada	100 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g		
Água destilada	1000 ml		

As soluções podem ser conservadas sem esterelização.

6. Agar Czapek 20 Sacarose (CY20S)

Sacarose	200 g
Czapek concentrado	10 ml
Solução traço de metais	1 ml
KH ₂ PO ₄	1 g
Agar-agar	15 g
Água destilada	1000 ml

Esterilizar por autoclavação a 121° C por 15 minutos. O pH final .

7. Agar Nitrato Glicerol a 25 % (G25N)

PO ₄ H ₂ K	0.75 g
Czapek concentrado	10 mL
Extracto de levadura	3,7 g
Glicerol grado analítico	250 g
Agar	12 g
Água destilada	750 ml

Esterilizar por autoclavação a 121° C por 15 minutos. O pH final .

8. Agar Folhas de Cravo (AFC)

Colocar de 1 a 5 folhas de cravo, previamente esterilizadas por irradiação, em placas de Petri de 6 cm de diâmetro e agregar Agar água a 1,5% temperado a 45° C (esterilizado por autoclavação a 121° C por 15 minutos).

9. Agar Batata Dextrose (BDA)

Batata	250 g
Glicose	20 g
Agar-agar	20 g
Água destilada	1000 ml

Batatas lavadas e descascadas (250 g) são cortadas em pedaços, adicionadas de 500 ml de água e fervidas em autoclave a vapor fluente por 45 minutos. Fundir o agar-agar (20 g) com 500 ml de água. Filtrar o caldo das batatas e adicionar o agar. A polpa da batata é homogeneizada para obter um purê e a metade é adicionada ao agar, junto com os 20 g de glicose. Completar o volume para um litro. Esterilizar por autoclavação a 121° C por 15 minutos.

10. Caldo Extrato de Levadura Sacarose (YES)

Extrato de levedura	20 g
Sacarose	150 g
Água destilada	1000 ml

^a Para preparar o Agar YES acrescentar ao caldo 15 g de agar-agar.

Esterilizar por autoclavação a 121° C por 15 minutos.

ANEXO D – Análises Estatísticas

Efeito de diferentes doses de radiação gama sobre a micobiota de fubá, avaliado por contagem geral em meio DRBC. 1º ensaio.

The SAS System

General Linear Models Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
DOSE	4	1 2 3 4
FUNGI	3	1 2 3
LOG	12	0 2.004321374 2.303196057 2.478566496 3.301247089 3.477265995 3.602168551 4.113976758 4.176120211 4.204147125 4.255296632 4.278776458

Number of observations in data set = 36

Dependent Variable: LOG

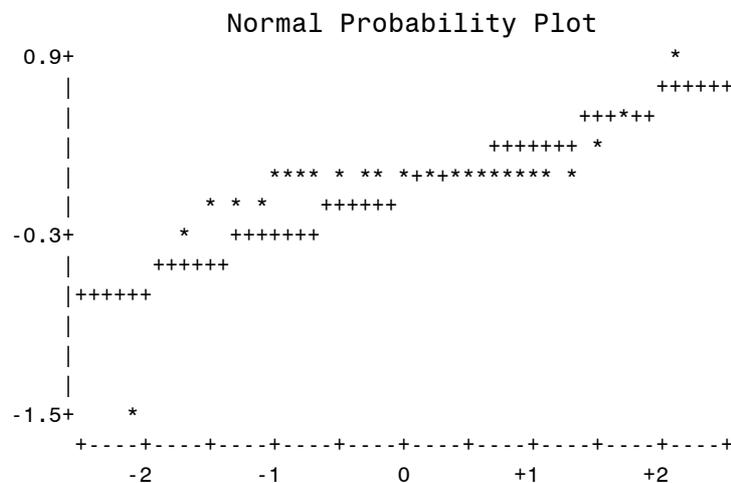
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	98.42477408	8.94770673	64.98	0.0001
Error	24	3.30499459	0.13770811		
Corrected Total	35	101.72976867			

R-Square	C.V.	Root MSE	LOG Mean
0.967512	25.34015	0.37109043	1.46443643

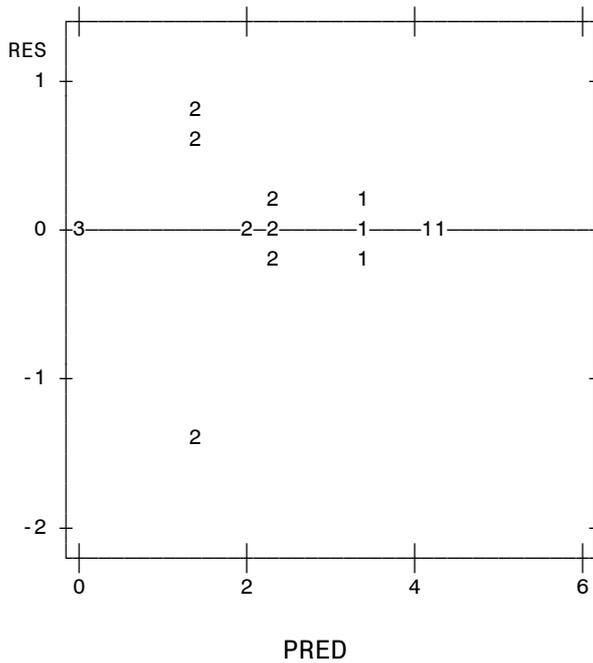
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
DOSE	3	96.23208371	32.07736124	232.94	0.0001
FUNGI	2	1.08353409	0.54176705	3.93	0.0333
DOSE*FUNGI	6	1.10915627	0.18485938	1.34	0.2775

Univariate Procedure

Variable=RES



Plot of RES*PRED. Symbol is value of DOSE.



NOTE: 23 obs hidden.

General Linear Models Procedure

T tests (LSD) for variable: LOG

Alpha= 0.05 df= 24 MSE= 0.137708

Critical Value of T= 2.06

Least Significant Difference= 0.361

Means with the same letter are not significantly different.

T Grouping	Mean	N	DOSE
A	3.9570	9	1
B	1.9007	9	2
C	0.0000	9	3
C	0.0000	9	4

ANEXO E – Características morfológicas de cepas de *Aspergillus* spp. controles e submetidas à radiação gama.

Tabela 16. Características morfológicas sobre MEA de *Aspergillus flavus*, cepa controle e submetida à radiação gama, comparadas ao padrão descrito na literatura.

	Macroscópicas (colônias)			Microscópicas				
	Ø	Tipo	Cor	Vesícula	Estipe	Métulas	Fiálides	Conídios
KLICH (2002)	(50) 65-70 mm	Algodonosa, flocosa, especialmente no centro	conídio oliva ou verde escuro, micélio branco, reverso incolor a amarelo escuro	Esférica a alongada, seriação variável (12)20-45(85) µm	(250)400-800 x 8-17 µm	(6)8-10 (16) x 5-7 µm	7-12 x (2,5)3-4 (5)µm	Globoso a elíptico 3-6 µm de diâmetro, parde lisa ou finamente rugosa
0 kGy	60 mm	Algodonosa, micélio reprodutivo escasso, vegetativo abundante	Branca, marrom esverdeado no micélio reprodutivo, reverso amarelo claro uniforme	Globosa a alongada, poucas bisseriadas, 31 x 35µm	428 x 9,3 µm	-	7,26 µm	Lisos, esféricos 6µm
4 kGy	55 mm	Algodonosa, micélio reprodutivo escasso, vegetativo abundante	Branca, mostarda no micélio reprodutivo, reverso marrom amarelado a marrom claro uniforme	Globosa a alongada, maior presença de bisseriadas, 28 x 30 µm	328 x 8,3 µm	-	5,8 µm	Lisos, esféricos 4,4µm

Tabela 17. Características morfológicas sobre MEA de *Aspergillus parasiticus*, cepa controle e submetida à radiação gama, comparadas ao padrão descrito na literatura.

	Macroscópicas (colônias)			Microscópicas					
	Ø	Tipo	Cor	Vesícula	Estipe	Métulas	Fiálides	Conídios	
KLICH (2002)	60-70 mm	Colônias flocosas não densas. Micélio inconspicuo, ocaionalmente com flocos,	Conídio oliva ou verde escuro, reverso incolor ou do amarelo escuro ao verde escuro	(10)20-35 µm, esférica ou levemente alongada, radiada, predomina uniseriada	(100)2 50-500 µm	Qdo presente: 7-10 x 3-7 µm	8-11 x 3-5 µm	Globoso, 3,5-6 µm de diâmetro, parede distintamente rugosa	
0 kGy	Cobrem a placa	Baixas e aveludadas, micélio reprodutivo abundante e vegetativo escasso	Verde musgo escuro pelo micélio reprodutivo, vegetativo cinza, reverso amarelo marrom claro	Radiada, bisseriada, 12 µm	100 x 4,8µm	6 x 2,4 µm	3 x 2,4 µm	Rugosos e esféricos 3 x 2,4µm	
2,0 kGy	60 mm	Baixas com abundante micélio reprodutivo, escasso vegetativo	Verde escuro, reverso marrom amarelo claro mais escuro no centro	Radiada unisseriada em sua maioria e espatulada 8-10 µm	140 x 4,8 µm	-	5 x 2,4 µm	Esféricos, rugosos muito espinhosos 2 x 2,4 µm	
2,5 kGy	55 mm	Abundante micélio vegetativo; escasso reprodutivo	Verde escuro, conidióforos abundantes e baixos; reverso marrom amarelo a marrom claro, centro mais escuro	Radiada, bisseriada, 10 µm	80 x 2,8 µm	5 x 2,4 µm	3 x 2,4 µm	Esféricos e rugosos 3 x 2,4 µm	
2,5 kGy	70 mm	Abundante micélio vegetativo; escasso reprodutivo	Verde escuro, conidióforos abundantes e baixos; reverso marrom amarelo a marrom claro, centro mais escuro	Radiada, algumas unisseriadas, 10 µm	100 x 4,8 µm	8 x 2,4 µm	3 x 2,4µm	Esféricos e muito rugosos 2 x 2,4 µm	

Tabela 18. Características morfológicas sobre MEA de *Aspergillus niger*, cepa controle e submetida à radiação gama, comparadas ao padrão descrito na literatura.

	Macroscópicas (colônias)			Microscópicas				
	Ø	Tipo	Cor	Vesícula	Estipe	Métulas	Fíalides	Conídios
KLICH (2002)	50-70 mm	Col. granular a flocosa, micélio branco e incompiscuoso	conídios negros, micélio branco, reverso incolor	(20)30-75 µm quase esférica, bisseriada, rara unisseriada	(300) 400-3000 x (7)12-17(20) µm	12-20 (40) x 3-6 µm	7-10 x 3-4 µm	Globoso (3)3,5-4,5(5) µm, usualmente muito ou levemente rugoso
0 kGy	65 mm	Col. flocosa, micélio branco	Conídios marrom escuro a negro, reverso incolor	Globosa, esférica e bisseriada 45,7 µm	2968,5 x 13,3 µm	-	-	Globosos e rugosos 4,4 µm
2,0 kGy	57 mm	Col. flocosa, micélio branco	Conídios marrom escuro a negro, reverso incolor	Globosa, esférica e bisseriada 49,8 µm	2765 x 12 µm	18,4 µm	6,4 µm	Globosos, levemente rugosos 3,14 µm
2,0 kGy	59 mm	Col. flocosa, micélio branco	Conídios marrom escuro a negro, reverso incolor	Globosa, esférica e bisseriada 45,3 µm	2587 x 14 µm	11,2 µm	10,9 µm	Globoso, liso a levemente rugoso 4,3 µm

Tabela 19. Características morfológicas sobre MEA de *Aspergillus carbonarius*, cepa controle e submetida à radiação gama, comparadas ao padrão descrito na literatura (continua).

	Macroscópicas (colônias)			Microscópicas				
	Ø	Tipo	Cor	Vesícula	Estipe	Métulas	Fiálides	Conídios
KLICH (2002)	55-70 mm	Micélio inconspícuos ou felpudo, micélio baixo, estipes longas	Conídio negro, reverso incolor ou levemente amarelo	65-90 µm quase esférica, bisseriada	(400)1000-3500 x 15-20 µm,	25-40 x 6-11 µm	8-12 x 5-7 µm	grandes, 7-10 µm, globoso, paredes rugosas
0 kGy	59 mm	Sumergida, profunda, sulcada, abundante micélio vegetativo, escasso reprodutivo e localizado em setores	Amarelo claro com áreas mais escuras dada pelo micélio reprodutivo. Conidióforos escassos, altos, marrom escuro a negros. Reverso sulcado amarelo claro	Radiada, bisseriada 64µm	630 x 13 µm	Algumas irregulares em tamanho 21 µm	Muito amorfas 6µm	Lisos, algo rugosos 8 µm
1,0 kGy	55 mm	Sumergida, profunda, sulcada, abundante micélio vegetativo, escasso reprodutivo e localizado em setores	Amarelo claro com áreas mais escuras dada pelo micélio reprodutivo. Conidióforos escassos, altos, marrom escuro a negros. Reverso claro com áreas amarelas mais escuras	Radiada, bisseriada 56µm	540 x 12 µm	Forma e tamanho irregular	Forma e tamanho irregular	Esféricos algo rugosos 7 µm

Tabela 19. Continuação.

1,5 kGy	57 mm	Sumergida, profunda, sulcada, abundante micélio vegetativo, escasso reprodutivo e localizado em setores	Amarelo claro com áreas mais escuras dada pelo micélio reprodutivo. Conidióforos escassos, marrom escuro a negros: altos na periferia e baixos na zona central da colônia. Reverso claro com áreas amarelas mais escuras	Radiada 51µm	764 x 14 µm	Algumas irregulares em tamanho 19 µm	7 µm	Esféricos algo rugosos 7,2 µm
2,0 kGy	60 mm	Sumergida, profunda, sulcada, abundante micélio vegetativo, escasso reprodutivo e localizado no centro da colônia	Amarelo claro com áreas mais escuras no centro dada pelo micélio reprodutivo. Conidióforos escassos marrom escuro a negros: altos na periferia e baixos na zona central da colônia. Reverso claro com áreas amarelas mais escuras	Radiadas, bisseriadas 58µm	880 x 13 µm	Irregular na forma e tamanho	Irregular na forma e tamanho	Esféricos e muito rugosos 7,4 µm

Tabela 20. Características morfológicas sobre MEA de *Aspergillus ochraceus*, cepa controle e submetida à radiação gama, comparadas ao padrão descrito na literatura.

	Macroscópicas (colônias)			Microscópicas				
	Ø	Tipo	Cor	Vesícula	Estipe	Métulas	Fiálides	Conídios
KLICH (2002)	44-55 mm	Micélio reprodutivo não denso, inconspicuo a flocoso	Amarelo claro a amarelo forte, amarelo âmbar; reverso amarelo a laranja claro	Globosa a alongada, 25-55 µm, bisseriadas	300-1700 µm	6-12 x 2-6 µm	7-12 x 2-3 µm	2,5-3,5 µm, liso ou finamente rugoso, esférico ou levemente elíptico
0 kGy	48 mm	Baixas, abundante micélio reprodutivo. Escasso vegetativo, circunscrito a uma zona de 4 mm na periferia. Elevação central de 6 mm coberta de conídios	Ocre central (reprodutivo) e creme na periferia. Conidióforos abundantes e baixos cor ocre. Reverso marrom escuro no centro e mais claro na periferia	Globosa, radiada 24,9 µm	140 x 5,3 µm	7,6 µm	5,8 µm	Esféricos, lisos, 2,8 µm
2,0 kGy	35 mm	Baixas, escasso micélio reprodutivo. Presença de esclerócios rosas	Ocre central (reprodutivo) e creme na periferia. Reverso marrom escuro no centro e mais claro na periferia	Globosa, bisseriada 23 µm	70 a 80 x 4,8 µm	8 µm	7,2 µm	Lisos, esféricos 2,4 µm
3,5 kGy	42 mm	Baixas, pouco micélio reprodutivo.	Ocre central (reprodutivo) e creme na periferia. Reverso marrom no centro e mais claro na periferia	Globosa, bisseriada 28,5µm	Parede rugosa, marrom pálida, 230 µm	9,7 µm	7,9 µm	Lisos, esféricos 2,5 µm