

Influência da irradiação gama na produção de aflatoxina B₁ e no crescimento de cepa toxigênica de *Aspergillus flavus* em amendoim (*Arachis hypogaea* L.)

Gamma-irradiation effect on aflatoxin B₁ production and growth of toxigenic strain of *Aspergillus flavus* in peanut (*Arachis hypogaea* L.).

RIALA6/1021

Guilherme PRADO^{1,2*}; Eliana P. CARVALHO²; Marize S. OLIVEIRA¹; Jovita E. C. M. GAZZINELLI¹; Vanessa D. MORAES¹; Ricardo F. CORRÊA³; Valbert N. CARDOSO⁴; Thais V. SOARES¹

* Endereço para correspondência: Fundação Ezequiel Dias, Laboratório de Micologia e Micotoxinas. Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Gameleira CEP 30510-010. Belo Horizonte/MG.

¹ Fundação Ezequiel Dias, Laboratório de Micologia e Micotoxinas.

² Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência de Alimentos. Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

³ Laboratório de Medidas Nucleares, Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear. Belo Horizonte/MG.

⁴ Laboratório de Radioisótopos. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais.

Recebido: 31/03/2005 – Aceito para publicação: 30/06/2005.

RESUMO

Foi verificado o efeito da irradiação gama (⁶⁰Co), em diferentes doses, na destruição de cepa aflatoxigênica e na produção de aflatoxina B₁ por *Aspergillus flavus* IMI 190443, em amendoim, cultivar Tatu Vermelho, safras 2001/2002 e 2002/2003. Foram feitos dois testes nas amostras, um deles envolvendo irradiação e posterior inoculação e outro, com inoculação antes da irradiação. A destruição do *Aspergillus flavus* IMI 190443, após irradiação, foi medida pela porcentagem de infecção fúngica, por meio da técnica do plaqueamento direto. A aflatoxina B₁ foi extraída em mistura de metanol e KCl 4% (270 + 30, v/v), seguido de clarificação com CuSO₄ 10% e partição em clorofórmio. A quantificação foi executada por cromatografia em camada delgada, medindo-se a área das fluorescências de amostras e padrões em densitômetro a 366 nm. A inoculação de amendoim previamente irradiado, com cepa aflatoxigênica, provocou a formação de teores elevados de aflatoxina B₁. Doses de irradiação gama de 25 e 30 kGy foram necessárias para a completa inativação de esporos.

Palavras-Chave. amendoim, aflatoxina B₁, irradiação gama, *Aspergillus flavus*.

ABSTRACT

Different doses of gamma-irradiation effect was verified for inactivating aflatoxigenic strain, and on aflatoxin B₁ production by *Aspergillus flavus* IMI 190443 in peanut, Tatu Vermelho variety, 2001/2002 and 2002/2003 crops. Two tests were performed in all samples: in one of them they were firstly irradiated before being inoculated, and in another assay peanuts were inoculated with aflatoxigenic strain before being irradiated. After irradiation, *Aspergillus flavus* IMI 190443 destruction was observed by the percentage of fungi infection by means of direct plating technique. Aflatoxin B₁ was extracted with a mixture of methanol and 4% potassium chloride (270 + 30, v/v), followed by clarification with 10% cupric sulfate and partition with chloroform. Quantification was done by thin layer chromatography, measuring the samples fluorescent areas and of standard samples in densitometer (366 nm). Previously irradiated peanuts inoculated with aflatoxigenic strain, induced the production of high levels of aflatoxin B₁. The data of the present study showed that 25 and 30 kGy gamma irradiation doses were necessary to get a complete inactivation of *Aspergillus flavus* IMI 190443.

Key Words. peanut, aflatoxin B₁, gamma irradiation, *Aspergillus flavus*.

INTRODUÇÃO

O problema das micotoxinas é muito sério em países em desenvolvimento, onde condições climáticas favoráveis, práticas agrícolas e de armazenamento inadequadas, conduzem ao crescimento fúngico e produção de toxinas em diferentes alimentos¹.

Fungos do gênero *Aspergillus*, em áreas de clima quente e úmido, são capazes de invadir figos, nozes, cereais, mas principalmente amendoim e milho, e produzirem as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, metabólitos secundários que apresentam atividade mutagênica, teratogênica e carcinogênica². *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* são as espécies mais importantes produtoras de aflatoxinas sendo, a aflatoxina B₁ entre todas as toxinas, a mais tóxica para os seres humanos e pode estar envolvida epidemiologicamente, com câncer de fígado humano em algumas partes do mundo, como na China e África, agindo sinergicamente com o vírus da hepatite B³⁻⁵.

No Brasil, a incidência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim, continua a ser grande problema, embora a extensão e os níveis estejam situados em patamares inferiores aos relatados no período de 1965 a 2000⁶⁻⁸.

Vários métodos de preservação têm sido descritos para impedir o crescimento de fungos e produção de aflatoxinas, tais como fumigação, amônia, luz ultravioleta, tratamento pelo calor, solventes químicos, mas nenhum desses métodos oferece completo controle dos fungos toxigênicos e das micotoxinas. Além do mais, efeitos nocivos à saúde humana e ao meio ambiente, associados aos resíduos, limitam a aplicação química em grande extensão. Conseqüentemente, irradiação ionizante por meio de uma fonte de ⁶⁰Co, também chamada de esterilização a frio, tem sido investigada como processo alternativo para a preservação de alimentos⁹⁻¹².

No Brasil, a legislação que trata do emprego da irradiação em alimentos é a Resolução RDC N.º 21, de 26 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. As doses a serem aplicadas devem ser compatíveis com os efeitos desejados, não tendo a legislação fixado valores mínimos ou máximos¹³.

O propósito da presente investigação foi verificar o grau de contaminação e a produção de aflatoxina B₁, por uma cepa aflatoxigênica, em amendoim em grão: (1) previamente irradiado com ⁶⁰Co e (2) previamente inoculado, seguido de tratamento com irradiação gama em diferentes níveis.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram utilizadas amostras de amendoim em grão *in natura* (4-6 kg), enviadas pela Santa Helena Indústria de Alimentos S. A. (Ribeirão Preto - São Paulo), cultivar Tatu Vermelho, das safras de 2001/2002 e 2002/2003, onde não foram detectadas aflatoxinas.

Fungo aflatoxigênico

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

Preparação da suspensão de esporos do fungo aflatoxigênico

A cepa de *Aspergillus flavus* foi inoculada em placa de Petri contendo o meio de Czapek (nitrato de sódio 4%, cloreto de potássio 1%, sulfato de magnésio 7H₂O 1%, sulfato ferroso 7H₂O 0,02%, fosfato de potássio dibásico 2%, sacarose 3%, sulfato de zinco 7H₂O a 1% 0,1 mL, sulfato de cobre a 0,5% 0,1 mL, ágar 2%) e incubada por 7 dias à 25°C. Após esporulação, uma alçada de esporos foi transferida para um tubo de Eppendorf, contendo aproximadamente 1,5 mL de Tween 80 a 0,1%, com posterior agitação por 1 minuto para dispersão dos esporos. Foi transferido então, 200 µL desta suspensão para Erlenmeyer de 250 mL, contendo 25 mL do meio GYEP (glicose 2%, extrato de levedura 0,3% e peptona 1%) solidificado. Seguiu-se incubação à 25°C por 7 dias para esporulação. Após esse tempo, foi adicionado 20 mL de Tween 80 0,1% no frasco e 10 pérolas de vidro, agitando-se gentilmente e transferindo-se o sobrenadante para um outro Erlenmeyer. O número de esporos.ml⁻¹ da suspensão foi calculado em câmara de Neubauer e ajustado para 10⁴ e 10⁶ esporos.ml⁻¹.

Plaqueamento direto

Os grãos de amendoim foram desinfetados externamente, por imersão, em uma solução de hipoclorito de sódio a 0,4%, por 2 minutos. Em seguida, em duplicata, foram distribuídos 5 grãos/placa em um total de 6 placas, contendo o meio de cultivo Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC). Seguiu-se incubação a 25°C durante 5 dias, e então foi observado o crescimento visual fúngico. Os resultados foram expressos em percentagem de infecção interna¹⁴.

Processo de irradiação

O processo de irradiação foi conduzido e executado no Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - CDTN/MG. A taxa de dose foi ao redor de 6,0 kGy.h⁻¹.

Extração e quantificação de aflatoxina B₁

A extração da aflatoxina B₁ das amostras e a purificação dos extratos foram feitas segundo o método descrito por Valente Soares e Rodriguez-Amaya¹⁵. Posteriormente, a aflatoxina B₁ foi separada, identificada e quantificada por cromatografia em camada delgada (CCD), em placas de sílica gel 60G, 20 x 20 cm (Merck), sem indicador fluorescente, espessura de 0,25 mm, utilizando-se como fase móvel tolueno:acetato de etila:clorofórmio:ácido fórmico (70:50:50:20, v/v/v/v), recomendada por Gimeno¹⁶. Os extratos das amostras para CCD foram ressuspensos em benzeno:acetonitrila (98:2), em volumes que variavam de 100 a 5000 µl. Para aplicação na placa

de cromatografia de camada delgada foram utilizados volumes que variaram de 2 a 10 µL. Para a elaboração da curva de calibração da aflatoxina B₁, foram utilizados volumes de 2 a 10 µL da solução padrão, de concentração de 0,88 µg.mL⁻¹, sempre com um mínimo de 4 pontos. A quantificação da aflatoxina B₁ foi feita através das medidas das intensidades das fluorescências dos spots das amostras e de padrões, em densitômetro Shimadzu, modelo CS9301PC, com lâmpada de xenônio, em leitura linear, feixe 0,4 x 5,0 mm e com alta sensibilidade de fluorescência. Os teores de aflatoxina B₁ nas amostras foram calculados a partir das áreas dos picos das aflatoxinas dos extratos das amostras e da solução padrão de aflatoxina B₁. Boa linearidade (r² > 0,99) foi obtida entre fluorescência emitida e concentração de aflatoxina B₁ na faixa de 0,88 a 8,88 ng. Os limites de detecção e quantificação foram 0,90 µg.kg⁻¹ e 1,1 µg.kg⁻¹, respectivamente.

A concentração exata da solução padrão de aflatoxina B₁ foi determinada em espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC, Shimadzu Scientific Instrument, Japan¹⁷.

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

A partir de amostras de amendoim em grão (200 g), irradiadas com 0, 1,0, 2,0, 3,0, 5,0 e 10,0 kGy, foram pesados 15 g em Erlenmeyer de 125 ml que foram inoculadas com 5 mL da suspensão de esporos de *A.flavus* IMI 190443 10⁴ esporos.mL⁻¹. Em seguida, incubou-se a 25°C durante 7 dias e quantificou-se a aflatoxina B₁. Com amostras da safra 2001/2002, o procedimento foi realizado em triplicata para cada nível de irradiação. Com amostras da safra 2002/2003 foram realizadas 6 repetições.

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

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

Determinação da porcentagem fúngica

Foram distribuídos em frascos Erlenmeyer de 500 mL, 45 g de amendoim *in natura* e 15 mL de uma suspensão de esporos de *A.flavus* IMI 190443 10⁶ esporos.mL⁻¹. Após equilíbrio a 4°C por uma noite, realizou-se o processo de irradiação nos níveis de 0, 0,3, 0,5, 1,0, 3,0, 5,0 e 10,0 kGy. Esse procedimento foi realizado em duplicata. Em seguida, realizou-se o processo de desinfecção e o plaqueamento direto.

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

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

Determinação da aflatoxina B₁

Foram distribuídos em frascos Erlenmeyer de 125 mL, 15 g de grãos de amendoim e 5 mL de uma suspensão de esporos de *A.flavus* IMI 190443 10⁶ esporos.mL⁻¹. Após equilíbrio a 4°C por uma noite, realizou-se o processo de irradiação nos níveis de 0, 0,3, 0,5, 1,0, 3,0, 5,0 e 10,0 kGy. Em seguida, procedeu-se a incubação a 25°C por 7 dias e realizou-se a quantificação da aflatoxina B₁. Este procedimento foi realizado em triplicata.

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

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

Análise estatística

Na situação em que foi possível a análise via o teste F e os resultados foram significativos, foi utilizado o teste de Tukey para determinar as diferenças entre as médias em nível de significância de 5%. Para comparar tratamentos no caso em que a significância foi detectada pelo teste Kruskal-Wallis, executou-se comparação múltipla do próprio teste. Foram utilizados os recursos do software estatístico SAS^{17,18}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Os teores de aflatoxina B₁ produzidos pelo *Aspergillus flavus* IMI 190443, em amostras previamente irradiadas, são mostrados na Tabela 1.

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

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

* Média de 3 repetições. ** Média de 6 repetições
Médias seguidas da mesma letra na vertical, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, em 5% de significância.

Observa-se que a produção de aflatoxina B₁ aumentou de 689,3 µg.kg⁻¹ e 740,0 µg.kg⁻¹ (amostras não irradiadas) para 18022 µg.kg⁻¹ e 5353 µg.kg⁻¹ (irradiadas com 10 kGy), safras 2001/2002 e 2002/2003, respectivamente. Esses dados estão consistentes com os obtidos por Hassan e Aziz²⁰, onde após irradiação de milho com 2,0 kGy e inoculação com *Aspergillus flavus* EA-81 (10⁵ esporos.mL⁻¹), o teor de aflatoxina da amostra irradiada e inoculada (35600 µg.kg⁻¹) foi superior ao da amostra não irradiada e inoculada (22800 µg.kg⁻¹).

O aumento do teor de aflatoxina pode ser explicado por dois possíveis mecanismos: (i) a irradiação afeta alguns constituintes do grão, tornando-o mais disponível ao fungo; (ii) a irradiação elimina ou reduz alguma microbiota natural que competiria com o fungo, resultando em melhor crescimento e produção de aflatoxina pelo *Aspergillus spp*²⁰.

Esses resultados sugerem que os cuidados de controle da umidade relativa e da umidade dos grãos de amendoim irradiados, parâmetros importantes no processo de formação de toxinas, devem ser eficientes, a fim de se evitar contaminação

posterior com fungos aflatoxigênicos e produção de níveis elevados de aflatoxina.

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

Os resultados obtidos de porcentagem de infecção fúngica e produção de aflatoxina B₁, em amendoim em grão, inoculado e irradiado, são mostrados nas Tabelas 2 e 3.

A análise estatística referente à porcentagem de infecção após inoculação, irradiação com ⁶⁰Co em diferentes níveis (0,3 a 10 kGy) e incubação por 7 dias a 25°C, foi feita mediante o teste Kruskall-Wallis, cuja probabilidade foi de 0,046. Comparando esse valor com o nível de significância de 0,05, constata-se que há evidências estatísticas de que as médias das amostras diferiram entre si. Analogamente, a análise estatística dos níveis de aflatoxina B₁ (resposta), revelou por meio do teste Kruskall-Wallis probabilidade de 0,026, ou seja, inferior a 0,05. Dessa forma, pelo menos uma dose apresentou-se diferente em relação às demais (Tabela 2).

Tabela 2. Teores de aflatoxina B₁ e porcentagem de infecção fúngica em amendoim, cultivar Tatu Vermelho, após inoculação com *Aspergillus flavus* IMI 190443 (10⁶ esporos.mL⁻¹), irradiação com ⁶⁰Co e incubação a 25°C durante 7 dias. Safra 2002/2003.

Amostra Inoculada e Irradiada (kGy)	Infecção (%)*	Aflatoxina B ₁ (µg.kg ⁻¹)**	Coefficiente de Variação(%)
0	100a	3290d	7,9
0,3	100a	4165d	23,9
0,5	100a	7956bc	10,8
1,0	95a	7659c	2,5
3,0	87b	8871b	19,0
5,0	38bc	9480ab	10,8
10,0	27c	9780a	18,3
<i>In natura</i> (sem irradiação)	22c	ND	—

ND = não detectado.* média de duplicata. ** média de triplicata. — não se aplica

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

Tabela 3. Teores de aflatoxina B₁ e porcentagem de infecção fúngica em amendoim, cultivar Tatu Vermelho, após inoculação com *Aspergillus flavus* IMI 190443 (10⁶ esporos.mL⁻¹), irradiação com ⁶⁰Co e incubação a 25°C durante 7 dias. Safra: 2002/2003.

Amostra Inoculada e Irradiada (kGy)	Infecção (%)*	Aflatoxina B ₁ (µg .kg ⁻¹)**	Coefficiente de Variação (%)
0	100	1112a	29,0
15	1	946a	30,0
20	2	236a	31,0
25	0	ND	—
30	0	ND	—

ND : não detectado.* média de duplicata. ** média de triplicata. — : não se aplica

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

A análise estatística referente aos níveis de aflatoxina B₁ após inoculação, seguido de irradiação em cinco níveis (0, 15, 20, 25 e 30 kGy) e incubação por 7 dias a 25°C, foi feita mediante o teste Kruskal-Wallis. Conforme se pode verificar pela Tabela 3, a resposta obtida para os níveis de aflatoxina B₁ foi nula para altas dosagens (25 e 30 kGy). Com base nos valores não nulos obtidos, foi determinada a probabilidade (p=0,061), superior ao nível de significância estabelecido em 5%. Constatou-se então, que não há evidências estatísticas de diferença significativa entre as dosagens avaliadas: 0, 15 e 20 kGy.

Observa-se que os níveis de aflatoxina B₁, nas amostras inoculadas e irradiadas com doses de 0,3 a 10,0 kGy, 4165 e 9780 µg.kg⁻¹, respectivamente, (Tabela 2) foram superiores quando comparados ao nível encontrado na amostra inoculada sem irradiação (3290 µg.kg⁻¹), atingindo cerca de 300% de aumento com a dose de 10 kGy. Entretanto, em doses de 15,0 a 30,0 kGy, verificou-se redução do teor de aflatoxina B₁ (1112 µg.kg⁻¹), encontrado na amostra inoculada não irradiada, para valores inferiores ao limite de detecção do método empregado (0,9 µg.kg⁻¹), ou seja, não detectado, como nas amostras inoculadas e irradiadas com doses de 25,0 e 30,0 kGy. Nota-se também, em elevadas doses de irradiação, uma correspondência inversa entre níveis de aflatoxina B₁ e infecção fúngica, ou seja, quanto maior a dose de irradiação menor a viabilidade fúngica e menores níveis de aflatoxina foram produzidos por *Aspergillus flavus* IMI 190443. O aumento dos níveis de aflatoxina B₁ nas amostras irradiadas com doses de 0,3 a 10,0 kGy, pode ser explicado pela resistência parcial do *Aspergillus flavus* à irradiação, pela gradativa destruição da microbiota competidora natural e maior disponibilidade do substrato ao fungo^{20,21}. A partir de doses de irradiação mais elevadas, superior a 15 kGy, cessa a resistência natural e a viabilidade dos esporos fúngicos, diminuindo a produção de aflatoxina B₁.

Chiou et al.¹¹ observaram que após inoculação de amendoim *in natura*, variedade Tainam 9, com *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, em concentração não especificada, seguido de irradiação com ⁶⁰Co em doses de 0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 15,0 kGy, e incubação durante 4 semanas a 30°C, os níveis de aflatoxina B₁ foram menores quando comparado ao controle não irradiado e inoculado: de 18630 µg.kg⁻¹ para 12620 µg.kg⁻¹ (5,0 kGy); 7770 µg.kg⁻¹ (7,5 kGy); 4280 µg.kg⁻¹ (10,0 kGy) e 2570 µg.kg⁻¹ (15,0 kGy). Grãos de amendoim com intenso grau de infecção foram também observados. Estes resultados estão parcialmente consistentes com os obtidos nesta pesquisa, visto que completa destruição dos conídios pela irradiação gama, mesmo a 15,0 kGy, não foi alcançada. Por outro lado, diferentemente dos nossos resultados, foi observada uma diminuição da produção de aflatoxina B₁ em função da dose de irradiação gama aplicada. Parece que o tipo da espécie fúngica envolvida (*A.flavus* e *A.parasiticus*), condições de inoculação e incubação, umidade, tamanho do inóculo, afetam o crescimento fúngico e a produção de toxina, e podem explicar essa diferença na produção de aflatoxina

B₁ em função da dose aplicada^{10,22}. Ainda existe a possibilidade, segundo Doyle e Marth (1978) citados por Farkas²³, de variação na decomposição da micotoxina por culturas de micélio, durante prolongado tempo de incubação. Neste trabalho, a quantificação da aflatoxina B₁ foi executada após 7 dias de incubação a 25°C, diferentemente do armazenamento a 30°C durante 4 semanas, efetuado por Chiou et al.¹¹.

Farang et al.¹² verificaram também resistência de esporos de *Aspergillus flavus* NRRL 3145, em concentração não especificada, após inoculação em amendoim, previamente esterilizado a 121°C durante 15 minutos e irradiação a 5,0, 10,0 e 20,0 kGy. Da mesma forma, a produção de aflatoxina B₁ estava presente mesmo após uma dose de 20,0 kGy.

CONCLUSÕES

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

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

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro e a Indústria de Alimentos Santa Helena (Ribeirão Preto - São Paulo) pelas amostras utilizadas nesta pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Aziz NH, Youssef BM. Inactivation of naturally occurring of mycotoxins in some egyptian foods and agricultural commodities by gamma irradiation. *Egypt J Food Sci* 2002; 30: 167-77.
2. Pepeljnjak S, Slobodnjak Z, Segvic M, Peraica M, Pavlovic M. The ability of fungal isolates from human lung aspergilloma to produce mycotoxins. *Human Exper Toxicol* 2004; 23: 15-9.
3. Council for Agricultural Science and Technology [CAST]. Mycotoxins: Economics and Health Risks. Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Technology. Task Force Report 139, 2003.
4. Moss MO. Mycotoxins. *Mycol Res* 1996; 100: 513-23.
5. Wild CP, Hall AJ. Primary prevention of hepatocellular in developing countries. *Mutat Res* 2000; 462: 381-93.
6. Oliveira MS, Prado G, Abrantes FM, Santos LG, Veloso T. Incidência de aflatoxinas, desoxinivalenol e zearalenona em produtos comercializados em cidades do estado de Minas Gerais no período de 1998 - 2000. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2002; 61: 1-6.
7. Rodriguez-Amaya DB, Sabino M. Mycotoxin research in Brazil: The last decade in review. *Braz J Microbiol* 2002; 33: 1-14.
8. Sabino M, Rodriguez-Amaya DB. Mycotoxin research in Brazil. *Ciênc Cult* 1993; 45: 359-71.
9. Aziz NH, Attia ESA, Farag SA. Effect of gamma-irradiation on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in wheat, flour and bread. *Nahrung* 1997; 41: 41-7.

10. Aziz NH, El-Zeany AS, Moussa AA. Influence of ³-irradiation and maize lipids on the production of aflatoxin B₁ by *Aspergillus flavus*. *Nahrung* 2002; 46: 327-31.
11. Chiou RYY, Lin CM, Shyu SL. Property characterization of peanut kernels subjected to gamma irradiation and its effect on the outgrowth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *J Food Sci* 1990; 55: 210-3.
12. Farag RS, Rashed MM, Hussein AA, Abo-Hagar A. Effect of gamma irradiation on the infected yellow corn and peanuts by *Aspergillus flavus*. *Chem Mikrob Technol Lebensm* 1995; 17: 93-8.
13. Brasil. (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução nº 21, de 26 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento para irradiação de alimentos. Publicada no Diário Oficial da União de 29 de janeiro de 2001.
14. Pitt JI, Hocking AD. Methods for isolation, enumeration and identification. In: *Fungi and food spoilage*. 2nd ed. Gaithersburg: Aspen Pub. Inc; 1999. p. 21-57.
15. Valente Soares LM, Rodriguez-Amaya DB. Survey of aflatoxins, ochratoxins A, zearalenone, and sterigmatocystin in some brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. *J Assoc Off Anal Chem* 1989; 72: 22-5.
16. Gimeno A. Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin and penitrem A. *J Assoc Off Anal Chem* 1979; 62: 579-85.
17. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of the AOAC International*. 16^a edição. 3^a revisão. Gaithersburg: AOAC International, 1997.
18. Sampaio MBI. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 1^a edição, Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia; 1998. 221p.
19. SAS Institute. *Users guide: statistics*. 1989-1996. Version 6.11. System for Windows. Edition. Cary North Carolina; 1996.
20. Hassan AA, Aziz NH. Influence of moisture content and storage temperature on the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus* EA-81 in maize after exposure to gamma radiation. *J Food Saf* 1998; 18: 159-71.
21. Chelack WS, Borsa J, Marquardt RR, Frohlich AA. Role of the competitive microbial flora in the radiation-induced enhancement of ochratoxin production by *Aspergillus alutaceus* var. *alutaceus* NRRL 3174. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57: 2492-6.
22. Schindler AF, Abadie NA, Simpson RE. Enhanced aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* after gamma irradiation of the spore inoculum. *J Food Prot* 1980; 43: 7-9
23. Farkas J. Microbiological safety of irradiated foods. *Int J Food Microbiol* 1989; 9: 1-15.