

MONICA MATTOS DOS SANTOS SIMAS

EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA SOBRE MICROBIOTA FÚNGICA E MICOTOXINAS
ENCONTRADAS EM RAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Benedito Correa

SÃO PAULO

2010

RESUMO

SIMAS, M. M. S. **Efeitos da radiação gama sobre microbiota fúngica e micotoxinas encontradas em ração de frangos de corte.** 2010. 183 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2010.

O presente trabalho teve como objetivo determinar o impacto do uso da radiação gama no controle de fungos toxigênicos e suas micotoxinas presentes na ração de frangos de corte. Para isso, amostras de ração foram submetidas a diferentes doses de irradiação gama (0, 5 e 10 kGy) e contaminadas com aflatoxinas ou fumonisinas. Os resultados de produtividade, rendimento, hematologia e bioquímica dos animais indicam que a irradiação da ração com 5 kGy foi efetiva no sentido de controlar os efeitos deletérios de micotoxinas sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte. Não foram observadas alterações significativas na composição bromatológica das rações. Avaliando a micobiota das amostras irradiadas e não irradiadas, observou-se que aquelas irradiadas apresentaram menor contaminação fúngica do que aquelas não irradiadas, no entanto as dose de 5 ou 10 kGy não provocaram redução do nível de contaminação de aflatoxinas ou fumonisinas pré-existentes nas amostras. As cepas *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*, analisadas através da AFLP, não apresentaram correlação entre os grupos formados, a produção de toxinas, o substrato da qual as amostras foram isoladas e o nível de radiação empregado. Levando-se em conta os objetivos da presente investigação, os resultados obtidos sinalizam que a dose de 5 kGy seria a mais indicada para o tratamento das rações de aves. Apesar de não alterar os níveis de micotoxinas presentes nas amostras, esta dose induz redução significativa da microbiota fúngica e altera a digestibilidade da ração, o que faz com que frangos alimentados com rações irradiadas com 5kGy apresentem melhor desempenho (traduzido em maior peso final) ao término do período de criação comercial.

Palavras-chave: Radiação gama, Ração, Frangos de corte, *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides*, Aflatoxinas, Fumonisinias

ABSTRACT

SIMAS, M. M. S. **Effects of gamma radiation on fungal microbiota and mycotoxins in broiler chicken feed**. 2010. 183 p. Ph. D. thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2010.

The purpose of this work was to study the control of toxigenic fungi and mycotoxins in broiler feed by gamma radiation. Feed samples were treated with gamma radiation (0, 5 and 10 kGy) and contaminated with aflatoxins or fumonisins. Performance, hematological and biochemical results indicated that a 5 kGy dose was effective on the control of the deleterious effects caused by mycotoxins on broilers. No significant alterations were observed on the feed chemical composition. Irradiated samples presented lower fungal contamination than those not irradiated. We did not detect alterations on aflatoxin or fumonisin content of feed samples after irradiation. AFLP results demonstrated that *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* did not present any correlation between groups, toxin production and irradiation dose. We can conclude that the dose of 5 kGy is indicated for treatment of broiler feed. Despite the fact that it does not change the mycotoxin levels found in the samples, this dose significantly reduces the fungal microbiota and modifies the feed digestibility, increasing the final weight of broiler chickens.

Key-words: Gamma radiation, Feed, Broiler chicken, *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides*, Aflatoxins, Fumonisins

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é atualmente o segundo produtor mundial de frangos de corte com aproximadamente 730 milhões de aves, cuja criação está concentrada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do país, que juntas possuem 88,6% do plantel nacional. Deste total, 26,13% encontra-se na região Sudeste, onde o maior produtor é o estado de São Paulo que conta com aproximadamente 109,4 milhões de aves (57%) (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2003). Em 2003, o país assumiu a liderança do ranking dos maiores exportadores do setor avícola, com crescimento de 20% em relação a 2002. As exportações brasileiras de frango *in natura* e industrializado somaram cerca de dois milhões de toneladas, representando US\$ 1,8 bilhão (MAPA, 2005).

A alimentação de quase todo este plantel é realizada através de rações comerciais. A produção deste insumo segue regras de um mercado competitivo, que exige redução nos custos, sem comprometer a qualidade do produto final. Por este motivo, as fábricas de ração têm intensificado o controle dos ingredientes recebidos para garantir a qualidade dos alimentos produzidos. Variações na composição e qualidade da ração são uma das principais causas de redução na produção esperada das aves (BELLAVÉR e NONES, 2000).

Como as rações destinadas à frangos de corte fabricadas no Brasil são preparadas à base de milho e soja (70 a 80% da composição final) (PEDROZA e DENZEN, 1991; PINAZZA, 1993), estes substratos são monitorados constantemente para verificar sua qualidade nutricional e o nível de agentes contaminantes. Entretanto, apesar de alguns cuidados serem adotados, a depender das condições de plantio e estocagem, a presença de contaminantes, como as micotoxinas, pode vir a ser um problema. A presença destas toxinas é comum em grãos de milho cultivados e armazenados em áreas quentes e úmidas e naquelas sementes danificadas por insetos.

Estas rações contaminadas por micotoxinas, além de reduzir o desempenho e afetar o estado geral da saúde do animal, constituem um risco para seres humanos, uma vez que produtos animais contendo resíduos de micotoxinas podem ser consumidos pela população. A prevenção da contaminação de grãos e alimentos por estas substâncias baseia-se no controle do desenvolvimento dos fungos produtores através de medidas que limitem o seu crescimento. Em relação às micotoxinas, uma vez produzidas, resta apenas a possibilidade de reduzir o seu impacto sobre o desempenho dos animais, pois dificilmente tem os seus níveis reduzidos completamente através de métodos de detoxificação que atualmente são conhecidos.

Uma destas técnicas de prevenção e controle de fungos toxigênicos e micotoxinas que vem sendo largamente estudada e tem apresentando bons resultados é a radiação ionizante, especialmente raios gama (AZIZ *et al.*,1997; AZIZ *et al.*,2002; FERREIRA, 2005). O processo não aumenta o nível normal de radioatividade do alimento, independentemente do tempo durante o qual o alimento é exposto à radiação. Ela pode impedir a divisão de microrganismos que causam a deterioração do alimento, tais como bactérias e fungos, pela alteração de sua estrutura molecular (ICGFI, 1999; SPOLAORE *et al.*, 2003).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

A avicultura se destacou nas últimas décadas como um dos setores agrícolas que apresentou maior dinamismo. O seu crescimento foi decorrente, sobretudo, dos avanços tecnológicos nas áreas de genética, nutrição, sanidade e manejo, os quais possibilitaram a instalação de uma indústria altamente eficiente e competitiva em todo o mundo, particularmente no Brasil (ROSMANINHO *et al.*, 2001).

O estímulo inicial para o desenvolvimento desta atividade ocorreu durante a II Guerra Mundial (1939-1945), quando se tornou necessário destinar a oferta de carne vermelha para os soldados envolvidos em combates. Foi preciso aumentar a produção de carnes alternativas, de preferência de pequenos animais, que estivessem prontas para consumo num curto espaço de tempo para a alimentação da população. Os Estados Unidos iniciaram pesquisas no sentido de obter novas linhagens de aves, rações, medicamentos e alimentos que atendiam aos requerimentos da nova atividade. O mesmo foi feito, no pós-guerra, nos países europeus (LIMA *et al.*, 2005).

A partir de então, a substituição das carnes vermelhas pelas brancas, principalmente de frango, nos países desenvolvidos, foi impulsionada por uma forte queda de seu preço relativo, resultado da eficiência do seu sistema produtivo. Mais recentemente, a carne branca tem sido valorizada na busca de uma dieta saudável e mais equilibrada, em função de valores culturais atrelados a um novo enfoque sobre a saúde (LIMA *et al.*, 2005).

No Brasil, os reflexos desses avanços começaram a chegar ao final da década de 50 e início da década de 60, quando tiveram início as importações de linhagens americanas híbridas, mais resistentes e mais produtivas. Com elas, padrões de manejo e alimentação foram se alterando gradativamente. Na década de 70, a indústria de frangos cresceu em média 12% ao ano, principalmente na região Sul, que possuía grande produção de milho e soja (LIMA *et al.*, 2005).

A contribuição da avicultura no PIB durante o período 1972-1988 foi sempre superior ao da produção brasileira agregada, enquanto a avicultura se desenvolvia em média 9,6% ao ano, a taxa para o país era de apenas 2% ao ano, exceção feita aos anos de 1984, 1985 e 1988, que foram anos de crise para o setor e para o país (LIMA *et al.*, 2005).

Em 2003, o país assumiu ainda a liderança do *ranking* dos maiores exportadores do setor avícola, com aumento de 20% em relação a 2002. As exportações brasileiras de frango

in natura e industrializado somaram cerca de dois milhões de toneladas, representando US\$ 1,8 bilhão. A maior parte dos embarques foi destinada à Arábia Saudita, Japão, Holanda, Alemanha, Rússia e Hong Kong (MAPA, 2005).

No ano seguinte, a atividade não apenas reafirmou o resultado financeiro das vendas externas de 2003, quando o Brasil apresentou a melhor receita, como alçou o País à condição de maior exportador mundial em volume. Isso confirmou os prognósticos realizados por vários especialistas, que destacavam o forte potencial de crescimento deste setor. A auto-suficiência na produção de milho e de soja, para alimentação animal e exportação, tem sido um dos fatores responsáveis pelo grande volume produzido (LIMA et al., 2005).

Nos anos mais recentes, devido à importância decrescente da produção e venda de produtos homogêneos como o frango inteiro, grande parte das empresas tem investido no processamento e maior industrialização de cortes diferenciados. Sua participação nas exportações vem aumentando gradativamente, em 1985, representava cerca de 14% do total e em 1994 alcançou 43%. São exportações de maior valor agregado, que, em alguns anos, chegaram a obter preços 70% superiores aos obtidos pelo frango inteiro. O Oriente Médio, especialmente a Arábia Saudita, é o principal mercado para o frango brasileiro e tem preferência pelo frango inteiro. O Extremo Oriente e a Europa preferem as partes e são os 2º e 3º mercados, respectivamente (ABSA, 2005).

Dentre os principais avanços tecnológicos que contribuíram para o desenvolvimento do setor avícola é possível enumerar: (a) adoção de peças com *design* otimizado (bebedouros e comedouros); (b) melhoramento genético, via cruzamento de diferentes linhagens; (c) automação do processo de fornecimento de ração e água para as aves; (d) formulação da ração através de sistemas informatizados para cada uma das fases de criação; e (e) desenvolvimento do setor farmacêutico veterinário. Todos estes fatores têm como objetivo principal explorar ao máximo o potencial genético das aves, com custos cada vez mais reduzidos, seja pela eliminação dos desperdícios ou pela redução da mão de obra (ABSA, 2005)

De acordo com a FAO, a avicultura é uma exploração zootécnica capaz de colaborar positivamente na minimização dos graves problemas de alimentação da crescente população mundial. Dessa forma, as carnes de aves têm evoluído de forma expressiva. O encurtamento do ciclo de produção, a maior eficiência produtiva e a conseqüente redução do custo da carne de aves, o ativismo de consciência alimentar privilegiando as carnes brancas, a diversidade de apresentações e o crescente uso dessas carnes em industrialização explicam essa evolução e

permitem prognósticos otimistas em relação a essa proteína animal, identificada como a carne do futuro (LIMA *et al.*, 2005).

Para a alimentação deste grande plantel, investimentos foram feitos na indústria de rações, concomitantemente ao desenvolvimento do setor. A produção brasileira de rações teve crescimento expressivo nos anos 70, mais particularmente no período 1975-1980, quando a fabricação saltou de 5.726 mil toneladas para 11.156 mil toneladas, um aumento de 94,83% (ABSA, 2005).

Nos anos 80, o mercado de rações mostrou mudanças substanciais. O fator mais significativo dessas mudanças foi a progressiva verticalização da produção de aves, com a integração dos criadores à agroindústria de abate e processamento de carnes. Mais recentemente, em virtude do avanço na área genética e das novas exigências alimentares das aves, houve a necessidade de se introduzir ingredientes mais puros, digestíveis e acumuláveis, que foram acrescidos aos ingredientes básicos das rações. Além da presença do milho, farelo de soja, farinhas de origem animal e de trigo, também foram acrescidos minerais, como o fosfato bicálcico, vitaminas, aminoácidos sintéticos, promotores de crescimento e anticoccidianos. Todos esses cuidados com a alimentação das aves visam uma produção em maior escala num menor espaço de tempo (ABSA, 2005).

As rações fabricadas no Brasil, Estados Unidos e outros países são preparadas à base de milho e soja que representam 70 a 80% da composição das rações para aves. Os cereais são, em geral, de grande valor energético compondo a parte volumosa da ração (TARDIN, 1989).

A proteína é um dos mais importantes nutrientes na alimentação de frangos de corte, considerando que a produção industrial de aves visa principalmente uma conversão eficiente de proteína da ração em proteína muscular. A exigência de proteína bruta (PB) para frangos de corte é de 22,4 e 22,5% para a fase inicial e 19,5 e 18,5% de PB na fase de crescimento, respectivamente, para machos e fêmeas (COSTA *et al.*, 2001).

A adição da quantidade ideal do premix na ração também é um fator primordial na nutrição avícola, pois existem algumas situações que podem contribuir para a deficiência do consumo de vitaminas pelas aves, tais como (a) estresse, que aumenta a necessidade de vitaminas, (b) destruição das vitaminas durante o armazenamento da ração e (c) condições ambientais que podem afetar os níveis de vitaminas no premix ou nas rações (HESS, 1993).

A produção de rações segue as regras de um mercado competitivo, que exige redução no custo sem comprometer a qualidade do produto, por este motivo as fábricas de ração têm

intensificado o controle dos ingredientes recebidos para poder garantir a qualidade dos alimentos produzidos (BELLAYER e NONES, 2000). A padronização dos ingredientes para rações é regulamentada através Portaria nº7 de 9/11/1988, expedida pelo Ministério da Agricultura. Esta Portaria indica que o teor de umidade do milho e farelos utilizados na fabricação da ração não deve ultrapassar 14%, evitando-se assim a fermentação e conseqüente contaminação microbiana (ENGLERT, 1978), e que o teor máximo de micotoxinas presentes nestes ingredientes não deve ser superior a 50 ppb.

Entretanto, apesar dos cuidados adotados, a depender das condições de plantio dos grãos e estocagem destes grãos e da ração, a presença das micotoxinas, pode ser uma realidade. De acordo com Santurio (2002), as micotoxinas mais prevalentes no Brasil são aflatoxinas, fumonisinas e zearalenona, produzidas pelos gêneros fúngicos *Aspergillus* e *Fusarium*.

2.2 ASPERGILLUS FLAVUS

2.2.1 ASPECTOS GERAIS

O *Aspergillus* pertence à divisão Eumycota, subdivisão Ascomycotina, classe Plectomycetes e família Euroticeae. Morfologicamente as espécies de *Aspergillus* caracterizam-se pelo desenvolvimento de colônias coloridas, brilhantes, com produção de conídios em cabeças do tipo *mop-like* (escovão) típicas. O *A. flavus* apresenta colônias caracteristicamente verdes a amarelo-oliva, embora eventualmente possa apresentar-se amarelo-puro, tornando-se acinzentadas com a idade. Longos conidióforos sustentam cabeças conidiais que são tipicamente radiados, com vesículas globosas a subglobosas e com esclerócios pretos presentes em 50% das cepas (PITT e HOCKING, 1985).

Os esclerócios são considerados estruturas de resistência para suportar variações adversas das condições ambientais (WICKLOW et al., 1984). São estruturas geralmente ovaladas a globosas e de coloração escura, rígidas, compostas por uma massa compacta de hifas inativas com material de reserva que se mantém dormente até que uma condição favorável leve ao crescimento micelial (WICKLOW, 1983). Nem todas as cepas que produzem aflatoxinas são produtoras de esclerócios (CHANG et al., 2001)

As cepas de *Aspergillus flavus* podem ser divididas em dois grupos quanto à produção de esclerócios. As classificadas como S são cepas que produzem numerosos e pequenos esclerócios (diâmetro < 400 µm) e produzem altos níveis de aflatoxinas, enquanto que as do

tipo L produzem poucos e grandes esclerócios (diâmetro > 400 µm) e produzem baixos níveis de aflatoxina (SAITO et al, 1986; COTTY, 1989). CARWELL e COTTY (2002) relataram que cepas S são frequentemente encontradas em regiões de altas temperaturas e baixa pluviosidade relativa na América do Norte e postularam que a produção de pequenos esclerócios pelas cepas S pode ser um mecanismo de sobrevivência para um organismo adaptado à flutuações climáticas.

O *Aspergillus flavus* destaca-se por ser o mais importante produtor de aflatoxinas, aproximadamente 50% das cepas são capazes de sintetizar as aflatoxinas B₁ e B₂ (PITT e HOCKING, 1999; GEISEN, 2000). Sob certas condições, o *A. flavus* também é capaz de produzir alcalóides indol como o aflatrem (WICKLOW, 1983) e ácido ciclopiazonico (CAST, 1989).

O *A. flavus* pode se desenvolver em amplo espectro de temperatura, entre 6 a 45 °C (LACEY *et al.*, 1991, DAVIS E DIENER 1983), sendo a melhor temperatura 30 °C (RAMAKRISHNA et al, 1993). O crescimento deste fungo pode ocorrer com umidade relativa entre 86-87% (DAVIS e DIENER 1983), e atividade de água (Aa) mínima de 0,78 a 0,80, sendo a ideal entre 0,95-0,97 (RAMAKRISHNA *et al.*, 1993). Para a produção de micotoxinas Aa ideal é maior, em torno de 0,83 a 0,87 e temperatura de 27 °C (JEWERS, 1990; LACEY *et al.*, 1991).

2.2.2 OCORRÊNCIA EM MILHO E RAÇÃO

A ocorrência de fungos do gênero *Aspergillus* apresentam distribuição mundial, com predomínio nas regiões de clima tropical e subtropical. A contaminação dos produtos vegetais ocorre através do contato com os esporos do fungo, presentes no ambiente, sobretudo no solo, durante os procedimentos de colheita e secagem. A utilização de práticas agrícolas incorretas, que prolongam o contato dos produtos com o solo, as lesões na superfície dos grãos, provocadas por insetos, e o armazenamento inadequado, em locais úmidos e sem ventilação, são apontados como as principais causas que favorecem a contaminação e o desenvolvimento de fungos toxigênicos (AGAG, 2004; CHU, 1991). A produção de aflatoxinas por estes fungos nos grãos é mais comum após o dano provocado por insetos, aves, ácaros e fatores climáticos como altas e baixas temperaturas, estresse hídrico dentre outros (WHITLOW e HAGLER, 2002; AGAG 2004).

Ribeiro et al. (2003) analisaram a diversidade fúngica em três produtos derivados de milho (fubá, xerém e farinha de milho pré-cozida), sendo encontradas 23 espécies de fungos

filamentosos distribuídos em oito gêneros: *Absidia*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Eimericella*, *Fusarium*, *Monascus*, *Penicillium* e *Rhizopus*. O maior número de espécies ocorreu no fubá (47%), seguido do xerém (29,5%) e farinha de milho (23,5%). O *Aspergillus flavus* esteve presente nos três substratos, sendo encontrado em concentrações de 4 a 10 UFC/g

Outros trabalhos foram realizados com o objetivo de verificar se o nível de contaminação por *Aspergillus* também se estendia às rações. Correa *et al.* (1997) observaram frequência de *Aspergillus* em 58,3% das amostras de ração destinada a gado leiteiro, com nível de contaminação variando entre $3,0 \times 10^2$ a $7,8 \times 10^3$ UFC/g, sendo que o principal gênero encontrado foi o *A. flavus*.

Oliveira *et al.* (1998) analisaram 66 amostras de ração para aves e observaram que o fungo mais frequentemente isolado foi o *Aspergillus* (71,7%), com nível de contaminação variando entre 0,5 e $21,5 \times 10^3$. E dentre estes, a espécie mais frequente foi *A. flavus*, sendo que 44% dos isolados apresentavam potencial toxigênico para produção de aflatoxinas.

2.3 AFLATOXINAS

2.3.1 ASPECTOS GERAIS

Foi a morte de quase 100.000 peruzinhos no Reino Unido, em 1960, após a ingestão de ração contendo torta de amendoim brasileira, que levou à descoberta de um grupo de compostos agora conhecidos como aflatoxinas. Investigações químicas e microbiológicas rapidamente revelaram que os efeitos tóxicos produzidos pela torta de amendoim havia sido resultado da presença de quatro metabolitos tóxicos do fungo *Aspergillus flavus* nesta dieta (JEWERS, 1990).

São conhecidas 18 diferentes moléculas do grupo das aflatoxinas, sendo a aflatoxina B₁ (AFB₁) considerada a mais tóxica, seguida da aflatoxina G₁ (AFG₁), aflatoxina B₂ (AFB₂) e aflatoxina G₂ (AFG₂) (BENNET e FRENHOLZ, 1978; SHARMA e SALUNKHE, 1991; ZEINGUE *et al.*, 1993; COULOMBE, 1991). As aflatoxinas são biossinteticamente consideradas bisfurano cumarinas derivadas de decacetídeos. São compostos heterocíclicos distinguíveis cromatograficamente por apresentarem fluorescência azul (série B) ou verde (série G) quando submetidas à radiação ultravioleta de comprimento de onda longo (JEWERS, 1990; GOURAMA e BULLERMAN, 1995). Estas moléculas apresentam baixo peso molecular (AFB₁: 312,2782, AFB₂: 314,294, AFG₁: 328,2776, AFG₂: 330,2934 g/mol),

sendo altamente solúveis em compostos de polaridade intermediária e pouco solúveis em água (MERCK, 1996).

As aflatoxinas quando secas são muito estáveis em temperaturas elevadas (o ponto de fusão da AFB₁ é de 269 °C) e quando dissolvidas em solventes polares são relativamente sensíveis a luz, particularmente à radiação ultravioleta. São destruídas por autoclavação em presença de amônia e por tratamento com hipoclorito (WHO, 1979).

A AFB₁, além de ser a mais freqüentemente encontrada em substratos vegetais, é a que apresenta maior poder toxigênico, seguida de AFG₁, AFB₂ e AFG₂ (LEESON *et al.*, 1995). Em Saúde Animal, várias espécies domésticas e de experimentação são sensíveis aos seus efeitos tóxicos agudos, mutagênicos e carcinogênicos, sendo o fígado o principal órgão atingido (OSWEILLER, 1990; JOBIM *et al.*, 2001). De modo análogo, em Saúde Pública, as aflatoxinas são identificadas como fatores envolvidos na etiologia do câncer hepático no homem, conseqüente à ingestão de alimentos contaminados (MCLEAN e DUTTON, 1995).

Uma das causas da extrema toxicidade da AFB₁ é a sua rápida absorção pelo sistema gastrointestinal, o que facilita a entrada na circulação sangüínea e seu transporte para o fígado, principal sítio de biotransformação (DALEZIOS *et al.*, 1973).

Neste órgão ocorre ativação metabólica e posteriormente reações com macromoléculas e organelas celulares. Na fase I da biotransformação, as reações que envolvem a conversão da AFB₁ em vários outros metabólitos são mediadas, em maior escala, pelo citocromo P-450 ligado às monooxigenases de função mista. Esse sistema enzimático está presente nos componentes da membrana do retículo endoplasmático dos hepatócitos e tem a função de facilitar a hidroxilação, demetilação, redução e epoxidação, que ocorrem durante o processo de biotransformação. Ao final são gerados vários metabólitos tais como AFM₁ (ALLCROFT e CARNAGHAN, 1963), AFQ₁ (BUCHI *et al.*, 1974; MASRI *et al.*, 1974), AFP₁, AFB₁-2'3-epóxido e AFB_{2a} (Figura 1). Outros metabólitos podem ser formados por reações de redução catalisada por um sistema de redutase citoplasmático NADPH-dependente, como o aflatoxicol, aflatoxicol M₁ (SALHAB *et al.* 1977) e aflatoxicol H₁ (DALEZIOS *et al.*, 1973; WONG e HSIEH, 1978; WYATT, 1991). O aflatoxicol é considerado um reservatório de AFB₁ no espaço intracelular, pois pode ser convertido nesta micotoxina através da dehidrogenase microssômica (WONG e HSIEH, 1978).

Na fase II da biotransformação da AFB₁, a reação mais típica é a de conjugação, envolvendo substratos endógenos, tais como o ácido glicurônicos, sulfatos ou glutatona. Essas reações são biologicamente importantes para os metabólitos da AFB₁ (aflatoxicol,

AFM₁, AFQ₁, AFP₁) com exceção da AFB₁-2,3-epóxido, que é altamente reativa. Esses metabolitos contêm grupos hidroxilas que se conjugam com ácido glicurônico, sulfato e

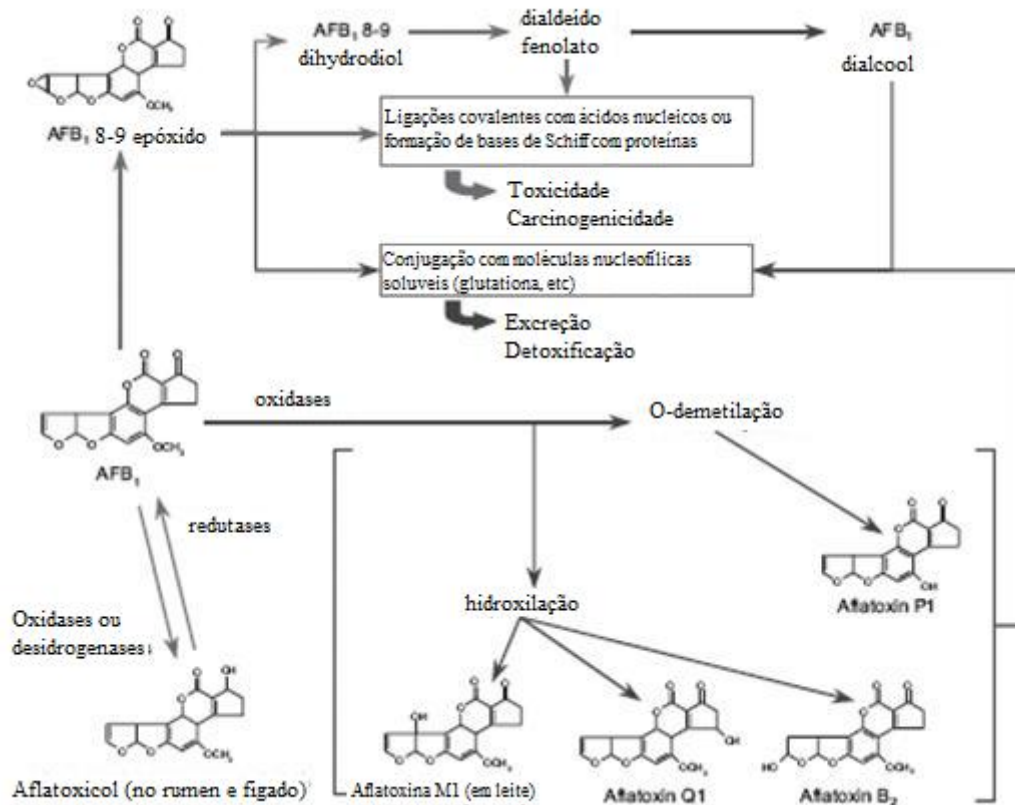


Figura 1 – Metabolismo da aflatoxina B₁ no fígado. Processos de detoxificação são mostrados em negrito e os demais são aqueles que conduzem a toxicidade ou carcinogenicidade. FONTE: YIANNIKOURIS e JOUANY, 2002.

glutathione, aumentando sua solubilidade em água e facilitando a sua excreção na bile ou urina (RAJ e LOTLIKAR, 1984).

A glutathione S-transferase é uma isoenzima que catalisa as reações de conjugação com glutathione e protege os tecidos de reações tóxicas. A sensibilidade de uma variedade de espécies animais aos efeitos tóxicos da AFB₁, em grande parte depende da habilidade dessas espécies de detoxificar os metabólitos reativos dessa toxina através do processo de conjugação com glutathione (NEAL *et al.*, 1987).

Uma vez biotransformada e ativada metabolicamente pelo sistema microsomal do fígado, o principal metabólito tóxico da aflatoxina é o AFB₁-epóxido. Esta molécula apresenta característica eletrofílica e, conseqüentemente, liga-se covalentemente a vários locais nucleofílicos da célula, tais como DNA, RNA e proteínas, resultando na interferência do funcionamento celular (GARNER, 1972; NEAL *et al.*, 1981; JEFcoat, 1983; SMITH, 1994; PARKINSON, 1996). Quando há hidratação do epóxido, ocorre a formação do 8,9-dihidro-8,9 dihidroxi B₁ (B₁ diol), que sob condições fisiológicas é capaz de reagir com os grupos amino de proteínas, formando a base de Schiff (HSIEH, 1981; KUILMAN *et al.*, 2000).

Podem ocorrer dois tipos de interação entre a AFB₁ e ácidos nucleicos, através de uma ligação não covalente, fraca e reversível ou através de uma ligação covalente irreversível, que necessita de ativação metabólica. O essencial para a ligação covalente é a ligação dos C2-C3 insaturados (SABINO, 1990). No DNA estas ligações ocorrem em áreas ricas em guanina (NEAL *et al.*, 1981).

2.3.2 EFEITOS BIOLÓGICOS EM AVES

A sensibilidade aos efeitos tóxicos das aflatoxinas varia consideravelmente entre as espécies animais. Com relação às espécies exploradas na avicultura comercial, a susceptibilidade é maior em patos, seguido de perus, gansos, faisões e frangos (MULLER *et al.*, 1970). A DL₅₀ de dose única (mg/kg de peso corporal) é de 0,3 para patinhos e 6,0 a 16,0 para galinhas (JEWERS, 1990). Aytug (1999) relataram que, para aves, o nível tóxico de aflatoxinas na ração é de 100–300 µg/kg.

Mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie, a relação dose-resposta pode variar de acordo com raça, sexo, idade e composição da dieta (JEWERS, 1990; COULOMBE, 1991;

MARIANI, 1998; MCLEAN e DUTTON, 1995). Outros fatores como desnutrição, erros de manejo, temperaturas extremas e camas velhas contribuem de maneira decisiva para que baixos níveis de aflatoxina na ração possam alterar o desempenho das aves (SANTURIO, 1997). Portanto, a influência das aflatoxinas sobre o organismo das aves depende da qualidade de vida do animal (níveis alimentares e de estresse), ou seja, quanto maior o estresse menor a quantidade de micotoxina necessária para causar problemas orgânicos (JONES et al 1982; DOERR et al 1983).

Os efeitos tóxicos das aflatoxinas são dependentes da dose e do tempo de exposição, determinando, assim, intoxicações agudas ou crônicas. A síndrome tóxica aguda ocorre pela ingestão de alimentos 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 (OSWEILLER, 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; MABBETT, 2004).

Os efeitos primários da aflatoxicose em aves podem ser utilizados como guia para diagnóstico clínico da doença. De uma forma geral, os sinais clínicos da aflatoxicose em aves incluem anorexia, redução de crescimento, redução do peso corporal, diminuição de ganho de peso, queda na produção de ovos e hemorragia (MABBETT, 2004; GIACOMINI *et al.*, 2006). Uma das características de surtos de aflatoxicose a campo é a má absorção, que se manifesta como partículas mal digeridas de ração na excreta das aves e está associada com esteatorréia ou excreção aumentada de lipídeos. Esta má absorção prejudica a eficiência da conversão alimentar e conseqüentemente eleva custos de produção (SANTURIO, 1997)

Ao exame patológico, a primeira alteração observada é no tamanho dos órgãos internos, como aumento do fígado, baço e rins, e diminuição na bursa de Fabricius e timo. Necrose e hiperplasia do ducto biliar também podem ser registradas (HUSSEIN e BRASEL, 2001; NEWBERNE, 1973; CAST, 2003; SMITH e MOSS, 1985). O fígado de aves com aflatoxicose tem como característica coloração amarelada e textura friável com acentuada

infiltração de gordura. O grau de infiltração gordurosa depende da dose e do tempo e intoxicação por aflatoxina, chegando a 68% em frangos de corte (SANTURIO, 1997; MABBET, 2004).

As alterações bioquímicas incluem diminuição dos níveis séricos de proteína total, albumina, triglicérides, fosfolipídios, colesterol, ácido úrico e fósforo; e aumento da urea-N sérica (HUSSEIN e BRASEL, 2001; NEWBERNE, 1973; CAST, 2003; SMITH e MOSS, 1985), e enzimas hepáticas como TGO e TGP (ALLAMEH *et al.*, 2005; OGUZ *et al.*, 2002). A atividade sérica de TGO e TGP é considerada indicador sensível de dano/disfunção hepatocelular, indicando inflamação no fígado, lesão ou obstrução do trato biliar (OGUZ *et al.*, 2002).

As células T são mais susceptíveis a aflatoxinas que as células B, por isso baixos níveis de aflatoxinas afetam a resposta mediada por células, enquanto que níveis mais altos provocam diminuição da produção de imunoglobulinas (IgG e IgA) e resposta dos anticorpos. Estas micotoxinas diminuem a atividade dos fagócitos e também deterioram a atividade do fator sérico termoestável, responsável pela sua atividade. A atividade do complemento, um constituinte sérico produzido pelo fígado, também é diminuída pelas aflatoxinas (MABBETT, 2004; GIACOMINI *et al.*, 2006). Desta forma, estas alterações no sistema imune são refletidas no aumento da susceptibilidade a candidíase, doença de Marek, coccidiose e salmonelose em galinhas, e pasteurelose e salmonelose em perus (NEWBERNE, 1973; SMITH e MOSS, 1985; AMER *et al.*, 1998; HUSSEIN e BRASEL, 2001; CAST, 2003).

As aflatoxinas também são responsáveis por graves efeitos genotóxicos no organismo dos animais, sendo estes considerado o principal efeito biológico destas micotoxinas. São observadas principalmente neoplasias hepáticas, além de mutagênese e teratogênese (MCLEAN e DUTTON, 1995).

Vários estudos foram realizados com o objetivo de determinar as alterações provocadas por diferentes níveis de contaminação da ração com aflatoxinas. Segundo Abdel-Wahhab *et al.* (2002) e Giacomini *et al.* (2006), altos níveis de aflatoxinas (2,5 a 3 mg de AF/kg da dieta) induziram alterações significativas nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e patológicos das aves. Por outro lado, níveis mais baixos de aflatoxinas induzem efeitos mais leves, como demonstrado por Giambrone *et al.* (1985a), Giambrone *et al.* (1985b) e Kan *et al.* (1989), que empregaram aflatoxinas em concentrações de 50 a 800 µg/kg.

No entanto, Doerr *et al.* (1983) relataram que quando frangos de corte são alojados e manejados de maneira semelhante aos aviários comerciais, torna-se difícil prever um nível

seguro de contaminação na ração, devido aos vários efeitos ambientais capazes de produzir estresse nos animais, os quais podem potencializar os efeitos da aflatoxina.

2.3.3 OCORRÊNCIA EM MILHO E RAÇÃO

As aflatoxinas podem ocorrer em vários substratos como milho, sorgo, cevada, trigo, centeio, amendoim, soja, arroz, algodão e seus derivados (AGAG, 2004), e além destes, existem relatos em nozes, ervilhas, semente de girassol, aveia, arroz, painço, castanha do Pará, pistache, avelã, leite e produtos lácteos, ovos, algumas frutas secas e chás (SCUSSEL, 1998).

De acordo com Santurio (1996), resultados de mais de 2.500 análises de micotoxinas realizadas no laboratório da Universidade Federal de Santa Maria, no período de 1987 a 1994, permitiram concluir que 25% do milho produzido no Brasil está contaminado por aflatoxinas e, desta porcentagem, aproximadamente 15% apresentam níveis de contaminação superiores a 20µg/kg.

Com o objetivo de tentar estabelecer uma correlação entre o milho empregado na fabricação de ração e a concentração final de aflatoxinas neste substrato, Jones *et al.* (1982) analisaram a matéria prima, a ração produzida na fábrica e, posteriormente, a mesma ração armazenada nos aviários, e encontraram médias de contaminação de 1,2, 6,0 e 8,8 µg/kg de aflatoxinas, respectivamente. Ainda no mesmo experimento, foi observada uma forte correlação entre a frequência e nível de aflatoxinas com o tempo de permanência da ração nos aviários, sendo ressaltado que a concentração de aflatoxinas tende a aumentar ao longo da cadeia de produção e comercialização das rações.

Widiastuti *et al.* (1988) também analisaram amostras de milho e ração de frangos, provenientes da Indonésia, e observaram que 96% das amostras de milho e 95% das amostras de ração estavam contaminadas com aflatoxinas. Destas, AFB₁ foi a forma mais predominante, acompanhada por baixos níveis de AFB₂, enquanto que AFG₁ e AFG₂ foram encontradas em apenas 33 e 14% de amostras de milho e 7 e 2% em amostras de ração, respectivamente. Nas amostras de milho, a concentração de aflatoxinas variou entre 1 e 20.000 µg/kg, enquanto que na ração variou entre 1 e 500 µg/kg.

Alimentos e rações destinadas à alimentação animal de uma forma geral, também foram avaliados quanto à presença desta toxina, sendo detectada a sua presença em 24,89% das amostras analisadas, com nível máximo de contaminação de 1.906 µg/kg (BALDISSERA *et al.*, 1993). Analisando milho utilizado como ingrediente na ração animal do Reino Unido

em 1992, Scudamore et al. (1997) verificaram que 26 amostras (51%) continham aflatoxinas totais em níveis entre 1 e 47 µg/kg. Correa et al. (1997) observaram a presença de aflatoxinas em 14,6% de um total de 96 amostras de ração de gado leiteiro com níveis de AFB₁ variando entre 11,5 e 287 µg/kg.

Gonzalez et al. (2001) relataram a presença destes contaminantes em 36,84% (28/76) das amostras de milho e 16,86% (57/338) nas amostras de ração, sendo que para as aflatoxinas, os índices de contaminação estavam entre 0,15 a 221,49 µg/kg e 0,40 a 685,5 µg/kg, respectivamente. Outro estudo realizado com amostras de milho provenientes do Paraná concluiu que 11,3% estavam contaminadas com aflatoxinas, com níveis variando entre 38 e 460 µg/kg (ONO *et al.* 2001).

A pesquisa de aflatoxinas em milho, farelo de soja e farelo de trigo empregados na produção de ração de aves no Kuwait revelou níveis máximos de 1,69; 1,27 e 1,07 µg/kg, respectivamente. As rações produzidas a partir destes substratos também foram analisadas, sendo observada contaminação máxima de 3,26 e 1,05 µg/kg para ração inicial e ração de terminação (BEG *et al.*, 2006).

2.4 FUSARIUM VERTICILLIOIDES

2.4.1 ASPECTOS GERAIS

O *Fusarium verticillioides* (= *F. moniliforme*) é um fungo endofítico encontrado principalmente em grãos de milho, sendo isolado em mais de 90% das amostras analisadas (LESLIE, 1996). Cultivares de milho com alto conteúdo de lisina, híbridos marrons e linhagens de *sweet corn* com o genótipo SH-2 são mais susceptíveis a infecção por *Fusarium verticillioides*, enquanto que linhagens de milho híbrido BT são menos susceptíveis a infecção por este fungo (LESLIE e SUMMERELL, 2006).

O *F. verticillioides* geralmente aparece nos grãos na medida em que estes se aproximam da sua maturidade fisiológica (BUSH *et al.*, 2004) e continuam a proliferar até o final da estação de crescimento quando podem representar mais de 90% das cepas de *Fusarium* isoladas dos grãos. Baseado em análises de microscopia eletrônica, o fungo é encontrado na ponta dos grãos sintomáticos e assintomáticos. Nos grãos sintomáticos, o embrião e o endosperma também estão colonizados e em alguns casos os microconídios são produzidos no interior do grão infectado (LESLIE e SUMMERELL, 2006).

Se o *F. verticillioides* está presente em um grão de milho, então este grão tem menor chance de ser infectado por *Aspergillus* spp., *F. graminearum*, *F. subglutinans* e *Diploidia maydis*. Estes grãos também podem conter menos micotoxinas produzidas por outros fungos, como aflatoxinas (LESLIE e SUMMERELL, 2006).

Este fungo pode ser considerado o mais importante produtor de fumonisina, devido a sua habilidade de produzir altas concentrações desta micotoxina em grãos de milho (DESJARDINS *et al.*, 1996). O *F. verticillioides* é capaz de se desenvolver em temperaturas entre 2,5-5,0 a 32-37 °C, sendo que a faixa ótima de crescimento fica entre 22 e 28 °C, com máximo crescimento observado quando a temperatura está a 25 °C (ALBERTS *et al.*, 1990; PITT e HOCKING, 1997; LESLIE e SUMMERELL, 2006). Dilkin *et al.* (2002) observaram que um aumento na umidade das culturas conduzia a um decréscimo na produção de toxina. Os autores também concluíram que a temperatura de 24,5 °C é ideal para a produção de fumonisina B₁ e 24,2 °C para a produção de fumonisina B₂, confirmando os resultados já apresentados na literatura.

O nível de Aa ideal para o desenvolvimento fúngico deve ser superior a 0,87, e para produção de fumonisinas superior a 0,90 (LEITÃO, 1988; LACEY *et al.*, 1991; CHAGNIER *et al.*, 1995). Vários autores afirmam não ser possível correlacionar os níveis de fumonisina encontrados na amostra com a quantidade (UFC/g) de *Fusarium* isolado (ETCHERVERRY *et al.*, 2002; LESLIE e SUMMERELL, 2006).

Em meio de Agar Batata Dextrose, *F. verticillioides* apresenta micélio aéreo branco, de rápido crescimento, que freqüentemente se torna tingido de violeta. A pigmentação no ágar é bastante variável, podendo ser observada nenhuma pigmentação ou nuances de laranja, violeta ou magenta (quase negro). Esporodóquios podem estar presentes apresentando coloração que varia de castanho a alaranjado. O esclerócio pode também se desenvolver e geralmente apresenta-se de cor azul escuro, podendo ser abundante e modificar a coloração da superfície das colônias (NELSON *et al.*, 1983; LESLIE e SUMMERELL, 2006).

O *F. verticillioides* apresenta raros macroconídios em forma de foice reta, com superfície ventral e dorsal quase paralelas, e paredes finas e delicadas. A célula apical é geralmente curva e afilada na ponta, enquanto que a célula basal é chanfrada ou tem forma de pé. Apresentam três a cinco septos e em algumas espécies são raros serem observados. Os microconídios são abundantes, unicelulares e apresentam o formato de bastão oval, com extremidades afiladas. São formados em longas cadeias e em falsas cabeças (NELSON *et al.*, 1983).

2.4.2 OCORRÊNCIA EM MILHO E RAÇÃO

No Brasil, algumas espécies do gênero *Fusarium* já foram isoladas do milho e outros substratos procedentes de vários estados brasileiros, com predominância de *F. verticillioides* e *F. graminearum* (SALGADO e CARVALHO, 1980).

Lillehoj e Zuber (1988) verificaram que 92% das amostras de milho provenientes do Brasil estavam contaminadas por *Fusarium* sp. No Estado de São Paulo, Pozzi *et al.* (1995) também observaram a predominância do gênero *Fusarium* (83,8%) em amostras de milho recém colhido e armazenado na região de Ribeirão Preto. Resultados semelhantes foram observados por Castro *et al.* (1995) e Almeida *et al.* (2000) ao pesquisarem amostras de milho de diferentes localidades do referido Estado. Os autores constataram um percentual de contaminação variando entre 55 e 80%.

Ribeiro *et al.* (2003) analisaram a diversidade fúngica em três produtos derivados de milho (fubá, xerém e farinha de milho pré-cozida), e encontraram 23 espécies de fungos filamentosos distribuídos em oito gêneros: *Absidia*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Eimericella*, *Fusarium*, *Monascus*, *Penicillium* e *Rhizopus*. O maior número de espécies ocorreu no fubá (47%), seguido do xerém (29,5%) e farinha de milho (23,5%), sendo o *Fusarium moniliforme* isolado em maior número nos três substratos.

Pesquisando amostras de ração de aves da região de Manaus, no norte brasileiro, Oliveira *et al.* (1998) observaram uma freqüência de isolamento de 10% de fungos do gênero *Fusarium*.

2.5 FUMONISINAS

2.5.1 ASPECTOS GERAIS

Até o presente momento, 28 fumonisinas já foram isoladas e caracterizadas, sendo a fumonisina B₁ (FB₁) a mais importante do grupo (MUSSER e PLATTNER, 1997; RHEEDER *et al.*, 2002). São compostos altamente polares, solúveis em água, metanol ou água-acetonitrila, e insolúveis em solventes orgânicos. A FB₁ apresenta peso molecular de 721,84 g/mol. Estas micotoxinas não possuem um cromóforo e são fracamente detectadas com luz ultravioleta no comprimento de onda de 210 nm (DIAZ e BOERMANS, 1994; MEREDITH, 1999). São estáveis ao aquecimento (ALBERTS *et al.*, 1990) e sua remoção dos alimentos ocorre através de processos que alcançam temperaturas acima de 150°C (WHO, 2001).

Dentre os análogos da fumonisina, a FB₁ representa geralmente 70 a 80% da fumonisina total produzida, enquanto a FB₂ representa 15 a 25% e a FB₃ geralmente representa 3 a 8% quando cultivadas em meio de arroz ou meio líquido. Os outros análogos podem ocorrer naturalmente, mas representam cerca de menos de 5% do total de fumonisinas presentes. Os análogos menos conhecidos das fumonisinas não são detectados na maioria das técnicas analíticas devido ao processo de derivatização, mas podem ser detectados com o uso de cromatografia líquida-espectrofotometria de massa com ionização de elétron-spray (RHEEDER *et al.*, 2002; WHITLOW e HAGLER, 2002).

O mecanismo de ação das fumonisinas está relacionado à inibição da biossíntese dos esfingolipídios, devido à semelhança estrutural desta toxina com a esfinganina, um composto intermediário na biossíntese dos esfingolipídios (WANG, 1991; WHITLOW e HAGLER 2002). Os esfingolipídios são responsáveis pela manutenção da integridade celular, regulação de receptores de superfície celular, bombas de íons e outros sistemas vitais para o funcionamento e sobrevivência das células (MERRILL *et al.*, 1997).

A FB₁, FB₂, FB₃ e FB₁ hidrolisadas inibem a síntese de ceramidas se ligando especificamente às enzimas esfingosina e esfinganina N-acetiltransferase, e bloqueando a biossíntese do complexo de esfingolipídeos. Isto resulta no acúmulo de esfinganina e um desvio na via da síntese da ceramida para produzir esfingosina-1-fosfato a partir da esfinganina. Fumonisinas também bloqueiam a reacetilação da esfingosina liberada pelo *turnover* dos esfingolipídeos. Após a interrupção do metabolismo dos esfingolipídeos, vários intermediários bioativos de lipídeos são criados enquanto outros são perdidos. Sendo então observado um aumento nas bases esfingoides intracelulares livres, que inibem as quinases. Um aumento na concentração intracelular de cálcio ocorre devido a um aumento na concentração de esfingosina-1-fosfato no retículo endoplasmático. Além disso, há um aumento na esfinganina livre, que afeta a proliferação e o ciclo celular, iniciando a apoptose e a necrose celular. Finalmente, há uma redução na concentração do complexo de esfingolipídeos, que regula o crescimento da célula através do ciclo celular (Figura 2).

2.5.2 EFEITOS BIOLÓGICOS EM AVES

A maioria das espécies de aves domésticas demonstra grande resistência frente à fumonisinas (LEESON *et al.*, 1995). Enquanto uma dose de 10 mg/kg administrada à equinos é capaz de induzir alterações, apenas níveis mais altos foram capazes de provocar lesões em aves.

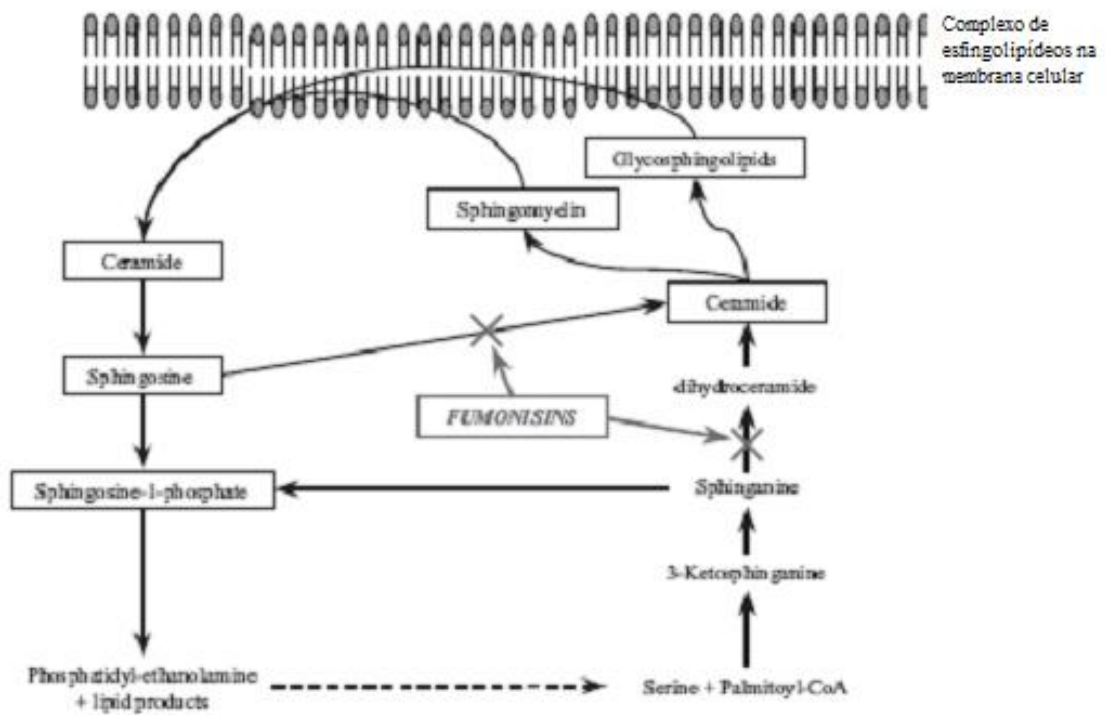


Figura 2 – Via biossintética da síntese de novo (fora dos boxes) e turnover de esfingolipídeos (nos boxes) em células animais e sua inibição por fumonisinas.

Henry e Wyatt (1994) observaram que a administração de FB₁ purificada, nas doses de 0, 20, 40 e 80 mg/kg, a frangos com 1 a 21 dias de idade, não provocou qualquer efeito adverso sobre ganho de peso, conversão alimentar ou consumo de água. Esta afirmação foi contestada por Espada et al. (1997) que intoxicaram pintos de 1 dia com 10 mg de fumonisinas/kg de ração durante 6 dias e observaram que a FB₁ pode contribuir para o aparecimento de petéquias, aumentando o tempo de coagulação sanguínea e diminuindo a concentração de albumina sérica.

No entanto, os estudos de Espada et al. (1997) foram sendo questionados, uma vez que a administração de doses baixas (50 mg de FB₁/kg da dieta) não era capaz de provocar alterações nos animais (BROOMHEAD *et al.*, 2002). Esta informação é corroborada por Weibking et al. (1993) que administraram diferentes doses de fumonisinas a frangos de corte. Animais tratados com 75 mg/kg apresentaram apenas redução na biossíntese de esfingolipídeos, quando comparado com o controle, indicando que aquele nível pode ser tóxico para aves, apesar de não resultar em sinais clínicos evidentes. Enquanto que os grupos que receberam rações contendo níveis de 225 e 450 mg/kg de FB₁ desenvolveram lesões no fígado e redução no ganho de peso, respectivamente.

Li et al. (1999) também não conseguiram observar alterações no ganho de peso ou conversão alimentar em frangos alimentados com 200 mg de FB₁/kg, embora tenham constatado diminuição na imunidade humoral e na supressão de linfócitos. No entanto, níveis de 300 mg de FB₁/kg de ração administrado a frango de corte durante duas semanas por Brown et al. (1992) provocaram diarreia, redução no ganho de peso (19%), aumento no peso do fígado (30%), além de alterações histológicas, como necrose hepática multifocal, hiperplasia biliar, necrose de músculos e raquitismo.

De uma forma geral, as aves intoxicadas com fumonisinas apresentam diarreia, inapetência, lesões orais e diminuição do desempenho produtivo, com bioquímica sérica revelando aumento da atividade do aspartato aminotransferase e diminuição do colesterol e fosfatase alcalina. No exame post-mortem verifica-se aumento do peso do fígado, rins e pâncreas; e redução do peso do baço e coração. As lesões histopatológicas consistem em necrose hepática, hiperplasia hepatocelular moderada e difusa, hiperplasia biliar, hipertrofia das células de kupfer e atrofia tímica cortical (JESCHKE *et al.*, 1987; ENGELHARDT *et al.*, 1989; LEDOUX *et al.*, 1992; WEIBKING *et al.*, 1993a; BERMUDEZ *et al.*, 1996; BERMUDEZ *et al.*, 1997; KUBENA *et al.*, 1997).

Esta toxina pode ainda apresentar atividade carcinogênica (VOSS et al, 2002) e genotóxica (GALVANO et al 2002). No entanto não foram revelados efeitos teratogênicos, Collins et al (1998a,b) relatou que os efeitos tóxicos observados no feto são decorrentes da toxicidade materna.

2.5.3 OCORRÊNCIA EM MILHO E RAÇÃO

No Brasil, alguns estudos têm mostrado contaminação do milho com fumonisinas em mais de 90% das amostras analisadas (ONO *et al.*, 2001; SYDENHAM *et al.*, 1992; YAMAGUCHI *et al.*, 1992). Orsi et al. (2000) ao analisarem amostras de milho provenientes das cidades de Sete Lagoas/MG, Andará/PR e Cravinho/SP verificaram que FB₁ e FB₂ estavam presentes em 90,2 e 97,4% das amostras, respectivamente. Em semelhante estudo, realizado por Almeida et al. (2002) no estado de São Paulo, a prevalência de FB₁ em amostras de milho variou entre 88,5 e 93,5%.

A ocorrência de FB₁ em cereais e ração no sul do Brasil foi verificada por Mallmann et al (2001), cujo estudo revelou uma positividade de 32% no total de amostras, sendo que as maiores concentrações foram encontradas no arroz (14,21 mg/kg), ração (68,33 mg/kg), milho (78,92 mg/kg) e trigo (24,35mg/kg).

Outros estudos, no estado de São Paulo, sobre a ocorrência de fumonisinas em milho realizadas por Gonzalez et al. (2001) e Camargos et al. (2000) revelaram níveis de contaminação entre 2,38 a 78,5 ppm e 1,63 a 25,69 µg/g, respectivamente, o que levou este último autor a concluir que estes níveis colocavam o estado de São Paulo entre os mais contaminados do mundo em termos de fumonisinas.

Gonzalez *et al.* (2001) também analisaram 338 amostras de ração destinadas à alimentação de animais de criação e animais domésticos e observaram que 16,86% estavam contaminadas com micotoxinas, sendo que para fumonisinas os níveis variavam entre 0,31 e 157,9 ppm.

O número de trabalhos sobre a ocorrência de fumonisinas em ração, especialmente em ração destinada a aves ainda é muito escasso, mesmo levando em consideração a extrema relevância desta micotoxina para a avicultura. A maior parte dos trabalhos sobre este assunto geralmente está vinculado à ocorrência de algum surto, especialmente em equinos (ROSS et al., 1991).

2.6 CONTROLE DE FUNGOS E MICOTOXINAS

Rações contaminadas por micotoxinas, além de reduzir o desempenho e afetar o estado geral da saúde do animal, constituem um risco para seres humanos, uma vez que produtos animais contendo resíduos de micotoxinas podem ser consumidos pela população. Então qualquer que seja a estratégia de descontaminação escolhida, esta deve preencher alguns critérios: (a) a micotoxina deve ser inativada (destruída) por transformação de composto tóxicos em não tóxicos, (b) esporos fungicos e micélio devem ser destruídos, para que novas toxinas não sejam formadas, (c) alimentos ou rações devem conservar seu valor nutritivo e permanecer palatáveis, (d) a propriedade física do material cru não deve se alterar significativamente, (e) e deve ser economicamente viável (o custo da descontaminação deve ser menor do que o valor do produto contaminado) (BATA e LASZTITY, 1999)

O melhor método para o controle da contaminação de alimentos por micotoxinas é a prevenção do aparecimento de fungos, através de medidas que limitem o seu crescimento. O plantio de variedades de grãos resistentes à contaminação fúngica (BROWN *et al.*, 1999) é uma importante medida preventiva a ser adotada a campo. Um dos substratos mais atingidos é o milho, sendo, portanto, o mais estudado. Pesquisas já identificaram que os aldeídos voláteis com cadeia de 6 a 12 carbonos, especialmente o hexanal, produzidos através da oxidação enzimática do ácido linoléico presentes neste grão, inibem o crescimento de *A. flavus* e a produção de aflatoxinas. Assim, o potencial de resistência de genótipos de milho ao desenvolvimento fúngico está diretamente relacionado ao grau de ácido linoléico presente no grão (SANTURIO, 1997).

Além disso, com relação às técnicas agrícolas, alguns procedimentos podem ser adotados como a utilização correta de fertilizantes e irrigação, espaçamento correto dos cultivares, colheita com equipamentos adequados para evitar danos aos grãos e realização da colheita em dias secos para evitar absorção de umidade (SCUSSEL, 1998).

As técnicas de armazenagem também são bastante importantes na prevenção da contaminação, principalmente de grãos a granel, no chão ou em silos. Durante a estocagem deve-se manter ambiente limpo, isento de roedores e insetos, controlar a aeração, temperatura, umidade e iluminação (SCUSSEL, 1998; BUSH *et al.*, 2004). Entretanto, as condições climáticas nem sempre permitem um controle eficiente (JOBIM *et al.*, 2001).

Os métodos para detoxificação de micotoxinas em alimentos são utilizados quando as medidas preventivas falharam. Estes métodos são classificados em métodos biológicos

(microbiológico), métodos químicos (ácidos, bases, agentes oxidantes) ou métodos físicos (seleção, irradiação, aquecimento) (JEWERS 1990).

Os métodos químicos podem ser empregados para remoção fúngica ou detoxificação. Dentre os inibidores de fungos podem ser empregados a amônia, solução de peróxido de hidrogênio, hidróxido de cálcio, bissulfeto de sódio, carbonato de sódio, cal, etc. Dentre estes, os principais são os ácidos orgânicos, que são substância de estrutura simples como o ácido propiônico, acético, sórbico e benzóico e seus sais de cálcio, sódio e potássio. O ácido propiônico e seus derivados são eficientes inibidores fúngicos, sendo utilizados em rações animais (LACEY, 1989; REIS e RODRIGUES, 1998). Estes produtos apresentam como principal constituinte o ácido protônico, que é um ácido orgânico de grande ação fungicida. A ação destes produtos baseia-se na redução do pH das células fúngicas (JOBIM et al., 2001).

Grandes cuidados devem ser tomados no uso de agentes químicos, pois subdoses podem estimular a produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* (AL-HILLI e SMITH, 1979) e alguns fungos contaminantes podem metabolizar baixas quantidades destes preservativos (MUTASA e MAGAN 1990).

Nos Estados Unidos, México e África do Sul, o processo de amoniação de alta temperatura/alta pressão (80-120 °C/35-50psi) tem sido empregado na descontaminação de sementes de algodão (SCOTT, 1998). Allahmeh et al. (2005) avaliaram a eficácia da amoniação para a inativação de aflatoxinas e verificaram que o tratamento de milho, contaminado com 1000 ou 2000 µg de aflatoxinas/kg, durante 48 horas com 1% de amônia aquosa resultou em mais de 98% de destruição de aflatoxinas.

Outro método químico utilizado para controle de contaminação por micotoxinas é o uso de materiais inertes (adsorventes) na dieta a fim de reduzir a absorção das micotoxinas pelo trato gastrointestinal dos animais. Dentre estes materiais podem ser enumerados o carvão ativado, bentonitas, zeolitas, aluminossilicatos de cálcio sódio hidratado (HSCAS), uma variedade de argilas (caolin, sepiolita e spent canola bleaching Clay), resinas sintéticas de troca de íons, alfalfa e um agente ligante de sílica/polivinil-polipirrolidona (SCOTT, 1998).

O funcionamento dos adsorventes baseia-se no fato das toxinas se ligarem a estes produtos, através de cargas elétricas, fazendo com que estas não sejam absorvidas pelos animais e sejam eliminadas nas fezes (ARAVIND et al., 2003; KRABBE, 2005).

Métodos que realizam a detoxificação física são a limpeza (não garante a completa descontaminação), seleção e separação mecânica (não é possível observar a presença da toxina), lavagem, segregação por densidade (alto custo para secagem), inativação térmica (a

temperatura a ser atingida seria muito alta, uma vez que, por exemplo, para destruir 87-100% de fumonisinas em uma amostra de milho seria necessário empregar 150-220 °C, irradiação (incluindo microondas), ultrassom, extração por solventes (alto custo e possibilidade de haver resíduos no produto final) e absorção (SCOTT, 1998).

Um dos métodos físicos que vem sendo largamente estudado e com bons resultados é a radiação ionizante, especialmente os raios gama. O processo não aumenta o nível normal de radioatividade do alimento, independentemente do tempo durante o qual o alimento é exposto à radiação. Esta técnica pode impedir a divisão de microrganismos que causam a deterioração do alimento, tais como bactérias e fungos, pela alteração de sua estrutura molecular (ICGFI, 1999).

2.6.1 RADIAÇÃO IONIZANTE

2.6.1.1 Conceitos Gerais

Radiação é a propagação da energia por meio de partículas ou ondas, podendo ser classificada pelo elemento condutor da energia (eletromagnética, corpuscular e gravitacional), pela fonte de radiação (solar, Cerenkov e radioatividade) ou pelos seus efeitos (ionizante e não ionizantes) (SCHABERLE e SILVA, 2000). As radiações são produzidas por processos de ajustes que ocorrem no núcleo ou nas camadas eletrônicas, ou ainda pela interação de outras radiações/partículas com o núcleo ou o átomo (TAUHATA et al., 2003).

De acordo com seus efeitos, estas radiações são classificadas em duas categorias: radiação ionizante (raios X, radiação gama, feixe de elétrons, etc) que tem a capacidade de alterar átomos ou moléculas, ou seja, é capaz de converter átomos e moléculas em íons pela remoção de elétrons de suas órbitas; e radiação não ionizante (ondas de radio, microondas, radiação infravermelha, luz visível e luz ultravioleta) que não possui energia suficiente para arrancar elétrons dos átomos, sendo, portanto inofensiva ao homem (RUSTOM, 1997). As radiações ionizantes podem ser formadas por partículas energéticas carregadas, como os elétrons, ou por fótons com energia alta, como os raios X ou os raios gama.

A radiação gama (γ) é um tipo de radiação eletromagnética produzida geralmente por elemento radioativo. Após a emissão de uma partícula alfa (α) ou beta (β), o núcleo resultante dos processos ocorridos ainda se encontra com excesso de energia e procura estabilizar-se, emitindo esse excesso em forma de onda eletromagnética. É uma radiação sem carga elétrica e sem massa, com baixo poder de ionização, e grande poder de penetração.

2.6.1.2 Efeitos em alimentos

A irradiação de alimentos não é uma tecnologia nova. Os efeitos letais da radiação ionizante sobre microorganismos são observados e relatados desde 1898 e técnicas para utilizar radiação com a finalidade de eliminar bactérias em alimentos tem sido testadas desde 1916. A quantidade de dados científicos gerados por diversos países e por programas de convênio internacionais, durante os últimos 50 anos, superam as pesquisas de qualquer outra técnica para processamento de alimentos (MOLLINS et al., 2001).

O Comitê da Junta de Especialistas sobre Irradiação de Alimentos, formados por órgãos das Nações Unidas (AIEA, OMS, entre outros), sugere, para o processo de irradiação de alimentos, que seja utilizada radiação gama originada dos radionuclídeos Cobalto⁶⁰ e Césio¹³⁷, raios X com energia de até 5 MeV ou elétrons com energia de até 10 MeV (DIEHL, 1992; FAO/IAEA 1982). Dos radionuclídeos o Cs¹³⁷ não é mais utilizado, devido a sua baixa disponibilidade. Portanto, o Co⁶⁰ é a única fonte de raios gama de interesse prático.

O Cobalto (Co) é um metal duro, de cor cinza azulada, encontrado de forma estável (não radioativo) na natureza. Tem características parecidas com o ferro, podendo, inclusive, ser magnetizado. O isótopo radioativo mais conhecido é o Cobalto 60 (Co⁶⁰), descoberto por Glenn Seaborg e John Livingood na Universidade da Califórnia na década de 30. O Cobalto não radioativo ocorre em vários minerais, e foi utilizado durante centenas de anos para dar coloração azulada à cerâmicas e ao vidro. Sua meia-vida é de 5,27 anos e decai em Ni₆₀ por emissão beta e gama. O Co⁶⁰ é utilizado em muitas aplicações como radiografia (gamagrafia) industrial, medidores de nível, de espessura, esterilização de objetos e alimentos e em radioterapia em hospitais.

As vantagens da fonte de Co⁶⁰ são (a) alta penetração e dose uniforme, permitindo o tratamento de produtos de tamanho, forma e densidade variáveis; (b) uso comprovado por longa data em aplicações industriais e (c) fácil utilização da fonte e baixo risco ambiental. Dentre as principais desvantagens pode-se citar a pequena meia-vida, o que significa que 12% da atividade da fonte deve ser substituída anualmente para manter a potência original (MATSUDA, 2002).

Em geral, o processo de irradiação nas doses recomendadas, acarreta poucas alterações químicas nos alimentos (DIEHL et al., 1994; AL-MASRI, 2003), entretanto quando doses inadequadas são aplicadas nos alimentos, estes podem ter o sabor ou nível de componentes alterados, tornando-o inadequado para consumo (ICGFI, 1999). Segundo Diehl (1992, 1995), nas doses de até 1kGy, as perdas nutricionais são consideradas insignificantes e nenhuma das

alterações conhecidas encontradas nos alimentos irradiados é nociva ou perigosa, estando dentro dos limites encontrados normalmente para alimentos (SATIN, 1993; DELINCEE et al., 1998). Para doses mais altas (acima de 10 kGy), que são usadas para esterilização e controle de patógenos perigosos, as perdas nutricionais são avaliadas como menores ou comparáveis com aquelas originadas pelo processo do cozimento e refrigeração (GROLINCHOVA et al., 2004).

Nas proteínas, a radiação é capaz de induzir alterações da sua configuração através de quebras nas ligações originais, como pontes de hidrogênio e ligações S-S, que estabilizam as suas estruturas secundárias e terciárias. Com esta alteração, suas características podem ser comprometidas. É importante salientar que estas modificações estão relacionadas à substâncias químicas puras, quando estes elementos são irradiados em misturas complexas (alimentos), pode haver variação na sensibilidade à radiação (GROLINCHOVA et al 2004).

As gorduras são classificadas como um dos componentes mais sensíveis à radiação ionizante, que pode induzir muitas reações hidrolíticas e auto-oxidantes levando a mudanças organolépticas indesejáveis e perdas de ácidos graxos essenciais. A variação e natureza das mudanças causadas por algumas doses de radiação dependem da composição do material a ser irradiado, o tipo de gordura e seu conteúdo de ácidos graxos insaturados (GROLINCHOVA et al 2004). Por sua vez, carboidratos e minerais presentes nos alimentos são relativamente estáveis a radiação até 10 kGy (ROBERT e WEESE, 2006).

O percentual de vitaminas perdidos na produção de alimentos irá depender da dose de irradiação, composição do alimento, temperatura do alimento a ser irradiado e a presença ou ausência de oxigênio. Vitaminas são mais susceptíveis a irradiação na presença de oxigênio e em temperaturas acima do congelamento. Geralmente quanto maior a dose de irradiação, maior a perda de vitaminas. Um comitê formado pela FAO, WHO e IAEA indicam que a perda de vitaminas em alimentos tratados com irradiação abaixo de 1 kGy são mínimas e compatíveis com perdas em alimentos tratados com aquecimento e armazenado por longos períodos de tempo (ROBERT e WEESE, 2006).

Já doses acima de 10 kGy podem vir a degradar estas substâncias, no entanto, pesquisadores indicam que estas perdas podem ser minimizadas pela irradiação em embalagem livre de oxigênio (latas ou embalagens flexíveis) ou em temperaturas criogênicas variando de -20°C to -40 °C. Soluções aquosas de vitaminas são mais vulneráveis a destruição por irradiação do que aquelas na matriz de alimento ou alimento desidratado. Então a

extrapolação de perdas nutricionais de soluções aquosas para alimentos sólidos é inapropriada (SCF, 2003).

Embora haja uma perda mínima de vitaminas associadas à irradiação, principalmente de algumas mais sensíveis como a vitamina B1, C e E, é extremamente improvável que haja deficiência de vitaminas devido ao consumo de alimentos irradiados (GAO, 2000). Todas as outras vitaminas tendem a ser relativamente estáveis a irradiação até 5 kGy (ROBERT e WEESE, 2006).

Em 1962 a WHO e a American Medical Association afirmaram que o alimento irradiado, produzido sob boas práticas de fabricação (BPF) deve ser considerado seguro e nutricionalmente adequado, pois a radiação (a) não induz a alteração na composição do alimento, que do ponto de vista toxicológico, poderia levar a efeitos adversos à saúde humana; (b) não induz alterações na microflora do alimento, que poderiam aumentar o risco microbiológico para o consumidor; e (c) não leva a perdas nutritivas, que poderia impor efeitos adversos ao estado nutricional individual ou populacional (SPOLAORE *et al.*, 2003).

Em 1980, o Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee on Food Irradiation (JECFI), formado pela FAO, WHO e IAEA, outorgou a alimentos irradiados com 10 kGy uma condição de segurança: “Irradiação de qualquer alimento até uma dose de 10 kGy não provoca problemas toxicológicos; portanto, testes toxicológicos deste tipo de alimento, não são mais necessário”. Além disso, o JECFI também declarou que a irradiação de alimentos até uma dose de 10 kGy não induziria problemas nutricionais ou microbiológicos especiais.

Baseados nestas conclusões, em 1983 o Codex Alimentarius Commission em associação com *Recommended International Code of Practice for the Operation of Radiation Facilities Used for the Treatment of Food* adotaram um *General Standard for Irradiated Food*. Muitos países seguiram estes códigos nos anos 80 e 90 e iniciaram os procedimentos de aprovação desta tecnologia para várias aplicações. Até o momento, 40 países permitem a irradiação de um ou mais produtos e 29 estão aplicando a radiação de forma comercial, e dentre estes o Brasil.

Em 1997, o WHO juntamente com a FAO e a IAEA realizaram um encontro de especialistas para analisar questões relacionadas à irradiação em doses maiores que 10 kGy, e concluíram que “O alimento irradiado com qualquer dose apropriada para alcançar o objetivo tecnológico pretendido é tanto seguro para consumir quando nutricionalmente adequado” (GAO, 2000; MOLLINS *et al.*, 2001).

Doses de irradiação acima de 10 kGy são utilizadas para alimentos muito úmidos de origem animal, para refeições completas de pacientes em terapia imunossupressiva, astronautas, exercito, indivíduos em atividades especiais ao ar livre e para a descontaminação de ervas de baixa umidade e vegetais secos (SCF, 2003)

2.6.1.3 Efeitos biológicos

A radiação pode causar uma variedade de efeitos físicos e bioquímicos nos microrganismos. A destruição ou inativação dos microrganismos pela irradiação ocorre em progressão geométrica (HANSEN e SHAFFER, 2001).

No mecanismo de ação direta, a radiação danifica diretamente o material genético, enquanto que no mecanismo indireto, moléculas, como a água, são quebradas pela irradiação. Os produtos primários da radiólise da água, como o radical livre hidroxila (OH^\bullet), íons de hidrogênio (H^\bullet) e o peróxido de hidrogênio, (H_2O_2) entre outros, são muito eficientes em produzir danos biológicos (DIEHL, 1995).

Segundo Coore e Venaille (1988), as modificações no DNA e RNA incluem a hidratação da citosina, ruptura das pontes de hidrogênio, formação de pontes entre duas hélices ou entre partes de uma mesma hélice, entre outras. Como consequência, ocorre o bloqueio da duplicação do DNA (quando não existe um sistema de reparação adequado), paralisação da síntese de proteínas, quando RNA mensageiro reencontra um códon radiomodificado, para o qual não existe um RNA de transferência. Enfim todos esses processos têm como consequência a inibição da reprodução e crescimento dos microrganismos.

As células apresentam diferentes sensibilidades aos efeitos da radiação ionizante, dependendo do tipo e da fase de seu ciclo de reprodução. Células em divisão, ou as que são metabolicamente ativas, ou ainda, as que se reproduzem rapidamente são mais sensíveis que aquelas altamente diferenciadas (OKUNO, 1988).

A eficácia da ação bactericida e fungicida de uma determinada dose de radiação depende de fatores, tais como, tipo e espécie de microrganismos; número de microrganismos (ou esporos) existentes inicialmente; e fatores próprios dos microrganismos, como idade, temperatura de crescimento e nível de esporulação (MURANO, 1995).

Geralmente os organismos mais simples são mais resistentes aos efeitos da radiação ionizante. Por exemplo, os vírus são mais resistentes do que as bactérias, as quais são mais resistentes que as leveduras, que são mais resistentes que os fungos filamentosos que, por sua

vez, são mais resistentes que os seres humanos. A diferença na resistência do microrganismo não se restringe somente aos gêneros, mas também entre linhagens de uma mesma espécie (MONK, 1995; MUNZNER, 1969).

A idade da cultura pode influenciar a sensibilidade à irradiação. Culturas com 3 semanas de idade de *Penicillium viridicatum* ou *Aspergillus flavus* requerem uma dose de 2 kGy para prevenir seu crescimento, enquanto que doses de 1 kGy são suficientes para inibir o crescimento das mesmas culturas com 6 semanas (DIEHL, 1995).

2.6.1.4 Efeitos sobre Fungos Toxigênicos e Micotoxinas

A aplicação de doses entre 2 e 7 kGy resulta em uma destruição considerável de microrganismos presentes nos alimentos, praticamente eliminando os patógenos (WHO, 1994). Outra constatação importante foi realizada por Saleh et al. (1996) e Abd El-Aal et al. (1997) que aplicando doses entre 4 e 6 kGy, observaram completa inibição da microbiota em diferentes alimentos.

Aziz et al. (1997) analisaram amostras de trigo e farinha de trigo quanto à presença de micotoxinas (deoxinivalenol, zearalenona e toxina T-2) e quanto ao uso de radiação gama como medida de controle. Estes autores verificaram que doses de 6 kGy foram satisfatórias na eliminação da flora fúngica presente nas amostras. Uma redução nas concentrações de deoxinivalenol, zearalenona e toxina T-2 foi observada em doses de 4 kGy, porém a eliminação completa das micotoxinas foi obtida em doses de 8 kGy.

Outro estudo semelhante, realizado por Aziz et al. (2002) em frutas, naturalmente contaminadas com ácido penicílico, patulina, ácido ciclopiazônico, citrinina, ocratoxina A e aflatoxina B₁, concluiu que nas doses de 1,5 e 3,5 kGy houve decréscimo na contagem de células viáveis fúngica e que em doses de 5kGy as micotoxinas não foram detectadas.

Ferreira (2005) analisou os efeitos da radiação gama sobre cepas de *Fusarium verticillioides* e concluiu que a dose de 5 kGy foi eficaz no controle deste fungo presente em grãos de milho, e que a dose de 10 kGy foi capaz de reduzir os níveis de fumonisina produzidos por estes fungos em 50%.

2.7 LEGISLAÇÃO INTERNACIONAL E BRASILEIRA

O Brasil regula a presença de aflatoxinas nos alimentos desde 1976 (Resolução nº 34/76 do Ministério da Saúde), quando estabeleceu limite máximo de 30 µg/kg. A partir desta

data várias Portarias têm sido editadas com o objetivo de controlar a presença destas micotoxinas nos alimentos destinados ao consumo humano e animal.

Para qualquer matéria prima a ser utilizada diretamente ou como ingrediente para rações destinadas ao consumo animal, a Portaria MA/SNAD/SFA nº 7 de 1988 estabeleceu o limite máximo de 50 µg de aflatoxinas/ kg de alimento.

Com relação à irradiação de alimentos, no Brasil, a primeira legislação sobre o emprego da radiação ionizante como processo de conservação foi estabelecida pela ANVISA através do Decreto-Lei nº 72.718 de 29/08/73.

Atualmente está em vigor a Resolução RDC nº 21 de 26/01/01 da ANVISA que estabelece que qualquer alimento poderá ser tratado por radiação desde que sejam observadas as seguintes condições (a) a dose mínima absorvida deve ser suficiente para alcançar a finalidade pretendida; (b) a dose máxima absorvida deve ser inferior àquela que comprometeria as propriedades funcionais e/ou os atributos sensoriais do alimento; (c) a embalagem deve ter condições higiênicas aceitáveis para o processo de irradiação; (d) o rótulo deve conter os dizeres “Alimento tratado por processo de radiação”; e (e) quando um produto irradiado é utilizado como ingrediente em outros alimentos, deve declarar essa circunstância na lista de ingredientes, entre parênteses, após o nome do mesmo.

Dentro das condições de realização deste experimento, e dentro dos objetivos propostos, pode-se concluir que:

- Os resultados de produtividade, rendimento, hematologia e bioquímica dos animais indicam que a irradiação da ração com 5 kGy foi efetiva no sentido de controlar os efeitos deletérios de micotoxinas sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte;
- A irradiação não provocou alterações significativas na composição bromatológica das rações
- Amostras submetidas ao tratamento com radiação gama apresentaram menor contagem fúngica total do que aquelas não irradiadas.
- A irradiação da ração, com 5 ou 10 kGy, não reduziu o nível de contaminação de aflatoxinas ou fumonisinas pré-existente nas amostras;
- A técnica de AFLP realizada para ambos os fungos não permitiu a correlação entre os grupos formados, a produção de toxinas, o substrato da qual as amostras foram isoladas e o nível de radiação empregado.
- Levando-se em conta os objetivos da presente investigação, os resultados obtidos sinalizam que a dose de 5 kGy seria a mais indicada para o tratamento das rações de aves. Apesar de não alterar os níveis de micotoxinas presentes nas amostras, esta dose induz redução significativa da microbiota fúngica e altera a digestibilidade da ração, o que faz com que frangos alimentados com rações irradiadas com 5kGy apresentem melhor desempenho (traduzido em maior peso final) ao término do período de criação comercial.

REFERÊNCIAS*

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ABD EL-AAL, S. S.; AZIZ, N. H. Effects of gamma radiation on mycotoxin production by toxigenic moulds in local karish cheese. **Egypt. J. Microbiol.**, v. 32, p. 151-168, 1997.

ABDEL-WAHHAB, M. A.; NADA, S. A.; KHALIL, F. A. Physiological and toxicological responses in rats fed aflatoxin-contaminated diet with or without sorbent materials. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 97, p. 209-219, 2002.

ABDULLAH, N.; NAWAWI, A.; OTHMAN, I. Fungal spoilage of starch –based foods in relation to its water activity (aw). **J. Stored Products Res.**, v. 36, p. 47-54, 2000.

ABOUZEID, M. A.; ABD-ELRAHMAN, D. G.; HASSAN, A. A.; YOUSSEF, K. A.; HAMMAD, A.A. Use of gamma irradiation to control *Fusarium verticillioides* producing two known mycotoxins in infected corn. **Int. J. Agric. Biol.**, v. 5, n. 4, p. 397-404, 2003.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE SUÍNOS E AVES (ABSA) Santa Cruz do Sul, RS; Editora Gazeta Santa Cruz; 2005. Santa Cruz do Sul, RS. 91p.

AGAG, B. I. Mycotoxins in Foods and Feeds. 1. Aflatoxins. **Ass. Univ. Bull. Environ. Res.** v. 7, n. 1, March, 2004.

ALBERTS, J. F.; GELDERBLUM, W. C. A.; THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O.; VAN SCHALKWYK, D. J.; BEHREND, Y. Effects of temperature and incubation period on production of Fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, n. 6, p. 1729-1733, 1990.

AL-HILLI, A. L.; SMITH, J. E. Influence of propionic acid on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 6, p. 367-370, 1979.

ALLAMEH, A.; SAFAMEHR, A.; MIRHADI, S. A. M.; SHIVAZAD, M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M.; AFSHAR-NADERI, A. Evaluation of biochemical and production parameters of broiler chicks fed ammonia treated aflatoxin contaminated maize grains. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 122, p. 289-301. 2005.

ALLCROFT, R.; CARNAGHAM, R. B. A. Groundmet toxicity *Aspergillus flavus* toxin (aflatoxin) in animal products. Preliminary communications. **Vet. Rec.**, v. 74, p. 863-864, 1962.

AL-MASRI, M. R. Productive performance of broiler chicks fed diets containing irradiated meat-bone meal. **Biores. Technol.**, v. 90, p. 317-322, 2003.

AL-MASRI, M. R.; ZARKAWI, M. Effects of gamma irradiation on cell wall constituents of some agricultural residues. **Rad. Phys. Chem.**, v. 44, p. 661–663. 1994.

ALMEIDA, A. P.; CORREA, B.; MALLOZZI, M. A. B.; SAWASAKI, E.; ORTEGA, E. M. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **J. Braz. Soc. Microbiol.**, v. 31, p. 321-26, 2000.

ALMEIDA, A. P.; FONSECA, H.; FANCELLI, A. L.; DIREITO, G. M.; ORTEGA, E. M.; CORRÊA, B. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, n. 13, p. 3877-3882, 2002.

ALMEIDA, A. P.; SABINO, M.; FONSECA, H.; CORREA, B. Potencial toxigênico de cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de grãos de milho, da semeadura à colheita, provenientes das regiões de Capão Bonito/SP e Ribeirão Preto/ SP. **Ver. Inst. Adolfo Lutz**, v. 64, n.1, p. 79-84, 2005.

AMER, A. M. M.; FAHIM, E. M. M.; IBRAHIM, R. K. Effect of aflatoxicosis on the kinetic behavior of ceftiofur in chickens. **Res. Vet. Sci.**, v. 68, p. 115-118, 1998.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (AOAC). AOAC Official Method 991.31 Aflatoxin in Corn, Raw Peanuts, and Peanut Butter. **AOAC International**, 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (AOAC). **Official Methods of Analysis**, Washington D.C.: 13th ed. Association of Official Analytical Chemists, 1980.

ARAVIND, K. L.; PATIL, V. S.; DEVEGOWDA, G.; UMAKANTHA, B.; GANPULE, S. P. Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. **Poultry Sci.**, v. 82, p. 571-576, 2003.

ARX, J.A. **The genera of fungi sporulating in pure culture**. 2 ed. Vaduz: J. Cramer, 1974, 315p.

ATEHNKENG, J.; OJAMBO, P.S.; IKOTUM, T.; SIKORA, R.A.; COTTY, P.J.; BANDYOPADHYAY, R. Evaluation of atoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents for aflatoxin in maize. **Food Add. Cont.**, p. 1-8, 2008.

AYTUG, C. N. Mycotoxic diseases in animals and preventive methods, TOPKIM Research Group, Book series, Istanbul, p. 7-18, 1999.

AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; SOUZA, M. T. **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília, Universidade Federal de Brasília, 2003, 211p.

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

AZIZ, N. H.; ABD EL-REHIM, L. A.; EL-FAR, M. A. Effect of gamma-irradiation on aflatoxin B1 produced by *Aspergillus parasiticus* in barley containing antimicrobial additives. **Egypt. J. Rad. Sci. Applic.**, v. 12, p. 101-116. 1999.

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

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

- AZIZ, N. H.; MAHROUS, S. R. Effect of gamma-irradiation on aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus* and chemical composition of three crop seeds. **Nahrung**, v. 48, n. 3, p. 234-238. 2004.
- AZIZ, N. H.; MOUSSA, L. A. A. Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits. **Food Cont.**, v. 13, p. 281-288. 2004.
- AZIZ, N. H.; SOUZAN, R. M.; SHANIN AZZA, A. Effect of γ -irradiation on the occurrence of pathogenic microorganisms and nutritive value of four principal cereal grains. **Applied Rad. Isot.**, v. 64, p. 1555-1562. 2006.
- AZIZ, N. H.; YOUSSEF, B. M. Inactivation of naturally occurring of mycotoxins in some Egyptian foods and agricultural commodities by gamma-irradiation. **Egypt. J. Food Sci.**, v. 30, p. 167-177. 2002.
- BACON, C. W.; HINTON, D. M. Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. **Can. J. Bot.**, v. 74, p. 1195-1202. 1996.
- BALDISSERA, M. A.; SANTURIO, J. M.; CANTO, S. H.; PRANKE, P. H.; ALMEIDA, C. A. A.; SCHMIDT, C. Aflatoxinas, ocratoxina e zearalenona em alimentos para consumo animal no sul do Brasil – Parte II. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 53, p. 5-10, 1993.
- BARROS, G. G.; CHIOTTA, M. L.; REYNOSO, M. M.; TORRES, A. M.; CHULZE, S. N. Molecular characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolates collected from peanut fields in Argentina using AFLPs. **J. Appl. Microb.**, v. 103, p. 900-909, 2007.
- BASALAN, M.; HISMIOGULLARI, S. E.; HISMIOGULLARI, A. A.; FILAZI, A. Fungi and aflatoxin B1 in horse and dog feeds in Western Turkey, **Revue Med Vet**, v. 156, n. 5, p. 248-252, 2004.
- BASMACIOGLU, H.; OGUZ, H.; ERGUL, M.; COL, R.; BIRDANE, Y. O. Effect of dietary esterified glucomannan on performance, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to aflatoxin. **Czech J. Anim. Sci.**, v. 50, p. 31-39. 2005.
- BASTOS, E. **Guia para o cultivo do milho**. São Paulo : Editora Icone (Coleção Brasil Agrícola), 1987, 190p.
- BATA, A.; LASZTITY, R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. **Tr. Food Sci. Technol.**, 10:223-228, 1999.
- BAUDURET, P. A mycological and bacteriological survey on feed ingredients and mixed poultry feed in Reunion Island. **Mycopathol.**, v. 109, p. 157-164, 1990.
- BAYMAN, P.; COTTY, P. J. Association with aflatoxin production and morphology. **Can. J. Bot.** v. 71, n.1, p. 23-31, 1993.
- BEG, M. U.; AL-MUTAIRI, M.; BEG, K. R.; AL-MAZEEDI, H. M.; ALI, N.; SAEED, T.; Mycotoxins in Poultry Feed in Kuwait. **Arch. Environ. Cont. Toxicol.**, v. 50, p. 594-602, 2006.

BELLAVER, C.; NONES, K. A importância da granulometria, da mistura e da peletização da ração avícola Palestra apresentada no IV Simpósio Goiano de Avicultura. 27/4/2000. Goiânia-GO.

BENNET, J. W.; FERNHOLZ, F. A. Effect of light on aflatoxins, anthraquinones, and sclerotia in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Mycologia**, v. 70, p.106-116, 1978.

BERMUDEZ, A. J.; LEDOUX, D. R.; TURK, J. R.; ROTTINGHAUS, G. E. The chronic effects of *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B1 in turkeys. **Avian Dis.**, v. 40, p. 231–235, 1996.

BERMUDEZ, A. J.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E.; BENNETT, G. A. The individual and combined effects of the *Fusarium* mycotoxins moniliformin and fumonisin B1 in turkeys. **Avian Dis.**, v. 41, p. 304–311, 1997.

BINDER, E.M. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 133, p. 149-166, 2007.

BINTVIHOK, A.; KOSITCHAROENKUL, S. Effect of dietary calcium propionate on performance, hepatic enzyme activities and aflatoxin residues in broilers fed a diet containing low levels of aflatoxin B₁. **Toxicon**, v. 47, p. 41–46, 2006.

BOENTE, G.; GONZALEZ, H. H. L.; MARTINEZ, E.; POLLIO, M. L.; RESNIK, S. L. Sorption isotherms of corn – study of mathematical models. **J. Food Engen.**, v. 29, p. 115-128, 1996.

BORSA, J., H. FARAG, AND M. D. EL-DIN. Radiation pasteurization of animal feed. Proc. 1991 Annu. Mtg. Canadian Nuclear Assoc./Canadian Nuclear Society. Canadian Nuclear Assoc., Ottawa, Canada. 1991.

BRIGDEN, J. L.; RIDDELL, C. A survey in four broiler locks in Western Canada. **Can. Vet. J.**, v. 16, n. 7, p. 194-200, 1975.

BRITZ, H.; STEENKAMP, E. T.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, M. J. Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation. **Mycologia**. v. 94, n. 4, p. 722-730, 2002.

BROOMHEAD, J. N., LEDOUX, D. R., BERMUDEZ, A. J., ROTTINGHAUS, G. E. Chronic effects of fumonisin B₁ in broilers and turkeys fed dietary treatments to market age. **Poultry Sci.**, v. 81, p. 56-61. 2002

BROWN, D. W.; CHEUNG, F.; PROCTOR, R. H.; BUTCHKO, R. A. E.; ZHENG, L.; LEE, Y.; UTTERBACK, T.; SMITH, S.; FELDBLYUM, T.; GLEEN, A. E.; PLATTNER, R. D.; KENDRA, D. F.; TOWN, C. D.; WHITELAW, C. Comparative analysis of 87,000 expressed sequence tags from the fumonisin-producing fungus *Fusarium verticillioides*. **Fungal Gen. Biol.**, v. 42, p. 848-861, 2005.

BROWN, R. L.; CHEN, Z. Y.; CLEVELAND, T. E.; RUSSIN, J. S. Advances in the development of host resistance in corn to aflatoxin content by *Aspergillus flavus*. **Phytopathol.**, v. 89, p. 113-117, 1999.

BROWN, T. P.; ROTTINGHAUS, G. E.; WILLIAMS, M. E. Fumonisin mycotoxicosis in broilers: performance and pathology. **Avian Dis.**, v. 36, p. 450-454, 1992.

BRUNS, T. D.; VILGALYS, R.; BARNS, S. M.; GONZALEZ, D.; HIBBETT, D. S.; LANE, D. J.; SIMON, L.; STICKEL, S.; SZARO, T. M.; WEISBURG, W. G.; SOGIN, M. L. Evolutionary relationships within the fungi: analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. **Molec. Phylog. Evol.** v. 1, p.231-241, 1992.

BUCHI, G.; MULLER, G. M.; ROEBUCK, B. D.; WOGAN, G. N. Aflatoxin Q1: a major metabolite of aflatoxin B1 produced by human liver. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol**, v. 8, p. 585, 1974.

BULL, L. T.; CANTARELLA, H. **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba, Potafos, 1993.

BULOCK, J. O. Mycotoxins as secondary metabolites. In: SKYN, P.S. ed. The biosynthesis of mycotoxins. New York, Academic Press, 1980, p. 1-16.

BUSH, B. J.; CARSON, M. L.; CUBETA, M. A.; HAGLER, W. M.; PAYNE, G. A. Infection and Fumonisin Production by *Fusarium verticillioides* in Developing Maize Kernels. **Phytopathol.**, v. 94, n. 1, p. 88-93, 2004.

CAMARGOS, S. M.; SOARES, L. M. V.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZ, D.; CASTRO, J. L.; BORTOLETTO, N. Fumonisin in corn cultivars grown during the 94/95 season in the state of São Paulo, Brazil. In: International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, 10, 2000. Guarujá, SP. Abstract Book. Guarujá, SP. p. 142.

CAMPBELL, G. L.; CLASSEN, H. L.; BALANCE, C. M. Gamma irradiation treatment of cereal grains for chick diets. **J. Nutr.**, p. 560-569, 1986

CARWELL, K. F.; COTTY, P. J. Distribution of *Aspergillus* section *Flavi* among field soils from four agroecological zones of the Republic of Bénin, West Africa. **Plant Dis.**, v. 86, p. 434-439, 2002.

CAST (Council of Agricultural Science and Technology). **Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems**. Task Force Report n. 139, EUA : CAST; 2003.

CASTRO, M. F. P. M.; SOARES, L. M. V.; FURLANI, R. R. Z. Mycoflora, aflatoxigenic species and mycotoxins in freshly harvested corn (*Zea mays* L.): a preliminary study. **Rev. Microbiol.**, v. 26, p. 289-295, 1995.

CBAA, Compendio Brasileiro de Alimentação Animal [Brazilian Feed Guide], 2005. Guia de métodos analíticos [Analytical Methods].

CELYK, I.; OGUZ, H.; DEMET, O.; DONMEZ, H. H.; BOYDAK, M.; SUR, E. Efficacy of polyvinylpolypyrrolidone in reducing the immunotoxicity of aflatoxin in growing broilers. **British poultry Science**, v. 41, p. 430-439, 2000.

CELYK, K.; DENLY, M.; SAVAS, T. Reduction of Toxic Effects of Aflatoxin B₁ by Using Baker Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in Growing Broiler Chicks Diets. **R. Bras. Zootec.**, v.32, n.3, p.615-619, 2003

CELYK, S.; ERDOGAN, Z.; ERDOGAN, S.; BAL, R. Efficacy of tribasic copper chloride (TBCC) to reduce the harmful effects of aflatoxin in broilers. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, v. 29, p. 909-916. 2005.

CAHAGNIER, B.; MELCION, D.; RICHARD-MOLARD, D. Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B₁ on maize grain as a function of different water activities. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 20, p. 247-51, 1995.

CHANG, H. G.; MARKAKIS, P. Effect of gamma irradiation on aflatoxin production in barley. **J. Sci. Food Agric**, v.. 33, p. 559–564, 1982.

CHASIN, A. A. M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M. C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Rev. Farm. Bioquim.**, v. 30, n. 2, p. 49-53, 1994.

CHELKOWSKI, J. Mycological quality of mixed feeds and ingredients. In: J. Chelkowski (ed.), **Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage** (Elsevier, Amsterdam), 217–227, 1991.

CHU, F. S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. **Mutat. Res.**, v. 259, p. 291-306, 1991.

CHULZE, S. N.; RAMIREZ, M. L.; TORRES, A.; LESLIE, J. F. Genetic variation in *Fusarium* section *Liseola* from no-till maize in Argentina. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 66, p. 5312-315, 2000.

CLIFFORD, J. I.; REES, K. R. The action of aflatoxin B₁ on the rat liver. **Biochemical Journal**, v. 102, n. 1, p. 65-75, 1967.

COLLINS, .T. F. X.; SHACKELFORD, M. E.; SPRANDO, R. L.; BLACK, T. N.; LABORDE, J. B.; HANSEN, D. K. Effects of fumonisin B₁ in pregnant rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 397-408, 1998a

COLLINS, .T. F .X.; SHACKELFORD, M. E.; SPRANDO, R. L.; BLACK, T. N.; LABORDE, J. B.; HANSEN, D. K. Effects of fumonisin B₁ in pregnant rats – part 2. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 673-685, 1998b.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB) 2002. Produção brasileira de grãos. Disponível em: <http://www.agricultura.com.br> Acesso em 3 março. 2010.

COORE, F. L.; VENAILLE, L. Tratamientos con radiaciones ionizantes. In: BOURGEOIS, C. M.; MESCLE, J. F.; ZUCCA, J. **Microbiologia Alimentaria 1: Aspectos**

Microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria. Espanha: Acribia, 1988. Cap 4, p 357-381.

CORREA, B.; GALHARDO, M.; COSTA, E. O.; SABINO, M. Distribution of molds and aflatoxins in dairy cattle feeds and raw milk. **Rev. Microbiol.**, v. 28, p. 279-283, 1997.

COSTA, F. G. P.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; GOMES, P. C.; TOLEDO, R. S.; VARGAS, J. G. Níveis dietéticos de proteína bruta para frangos de corte de 1 a 21 e 22 a 42 dias de idade. **Rev. Bras. Zoot.**, v. 30, n. 5, p. 1498-1505, 2001.

COTTY, P. J. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. **Phytopathol.**, v. 79, p. 808-814, 1989.

COTTY, P. J.; CARDWELL, K. F. Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus* section *Flavi*. **Appl. Environ. Microb.**, v. 65, p. 2264-2266, 1999.

COULOMBE, R. A. Aflatoxins. In: SHARMA, R. P.; SALUNKHE, D. K. (Eds). Mycotoxins and phytoalexins. Boca Raton: CRC Press, 1991, p. 103-143.

DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.; PALACIOS, G.; REYNOSO, M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B1, zearalenone and deoxinivalenol in poultry feeds in Argentina. **Mycopathol.**, 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. **Mycopathol.**, v. 141, p. 37-43, 1998.

DALEZIOS, J. I.; HSIEH, D. P. H.; WOGAN, G. N. Excretion and metabolism of orally administered aflatoxin B1 by Rhesus monkeys. **Food Cosmet Toxicol.**, v. 11, p. 605, 1973.

DAVIS, N. D.; DIERNER, U. L. Biology of *A. flavus* and *A. parasiticus*: some characteristics of toxigenic and nontoxigenic isolates of *A. flavus* and *A. parasiticus* in "Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in Corn" Auburn University: Auburn, pp. 1-5. 1983.

DAWKINS, M. S.; DONNELLY, C. A.; JONES, T. A. Chicken welfare is influenced more by housing conditions than by stocking density. **Nature**, v. 427, n. 22, p. 342-344, 2005.

DE LEENHEER, A. P.; LAMBERT, W. E.; VAN BOCXLAER, J. F. Modern Chromatographic Analysis of Vitamins. CRC Press. 1985.

DEL-BIANCHI, M.; OLIVEIRA, C. A. F.; ALBUQUERQUE, R.; GUERRA, J. L.; CORREA, C.; Effects of prolonged oral administration of aflatoxin B1 and fumonisin B in broiler chickens. **Poultry Sci.**, v. 84, p. 1835-1840. 2005.

DELINCEE, H.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H.; MANCINI-FILHO, J. Protein quality of irradiated Brazilian beans. **Rad. Phys. Chem.**, v. 52, p. 1-6, 1998.

DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D.; PROCTOR, R. H. Linkage among genes responsible for fumonisin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi* Mating Population A. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 7, p. 2571-2576, 1996.

DIAZ, G. J.; BOERMANS, H. J. Fumonisin toxicosis in domestic animals: a review. **Vet. Human Toxicol.**, v. 36, n. 6, p. 548-555, 1994.

DIEHL, J. F. Food irradiation: is it an alternative to chemical preservatives? **Food Add. Contam.**, v. 9, n. 5, p. 409-416, 1992.

DIEHL, R.; DUPRAZ, C.; BENNETT, K.; BLOEMEN, H.; DE BOER, H.; HERMSEN, W.; LICHTI, G. G.; McCONNELL, M.; MORRIS, D.; RYAN, J.; SCHOENFELDER, V.; STEINLE, H.; STRONG, A. W.; SWANENBURG, B. N.; VARENDORFF, M.; WINKLER, C. COMPTEL observations of the 1809 MeV gamma-ray line from galactic Al-26. **Astrophys. J. Suppl. Series**, v. 92, n. 2, p. 429-432, 1994.

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

DILKIN, P.; MALLMANN, C. A.; ALMEIDA, C. A. A.; STEFANON, E. B.; FONTANA, F. Z.; MILBRADT, E. L. Production of fumonisins by strains of *Fusarium moniliforme* according to temperature, moisture and growth period. **Braz. J. Microbiol.**, v. 33, p. 111-118, 2002.

DOERR, J. A.; HUFF, W. E.; WABECK, C. J.; CHALOUPIKA, G. W.; MAY, J. D.; MERKLEY, J. W. Effects of low level chronic aflatoxicosis in broiler chickens. **Poultry Sci**, v. 62, p. 1971-1977, 1983.

DOUMAS, I. B. T.; BIGGES, H. G. *Standard methods of clinical chemistry*, vol. 7, Academic Press, 175-188, 1972.

DUTTA, T. K.; DAS, P. Isolation of aflatoxigenic strains of *Aspergillus* and detection of aflatoxin B₁ from feed in India. **Mycopathol.**, v. 151, p. 29-33, 2000.

EL-BAZZA, Z. E., 1991. Influence of sodium chloride on aflatoxin production by irradiated and non-irradiated spores of *Aspergillus flavus*. **Isot. Rad. Res.**, v. 23, p. 133-138, 1991

EL-BAZZA, Z. E.; ABDEL-AAL, S. S.; EL-FOULY, M. Z. Effect of incubation time, temperature and gamma radiation on the production of aflatoxins by local *Aspergillus flavus* isolate. **Az. J. Microbiol.**, v. 3, p. 34-47, 1988.

ENGELHARDT, J. A.; CARLTON, W. W.; TUIITE, J. F. Toxicity of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* for chicks, ducklings, and turkey poults. **Avian dis.**, v. 33, p. 357-360, 1989.

ENGLERT, S. I. **Avicultura: Tudo sobre raças, manejo, alimentação e sanidade**. 2^a edição. Porto Alegre: Agropecuária, 1978, 288p.

ESPADA, Y.; GOPEGUI, R. R.; CUADRADAS, C.; CABANES, F. J. Fumonisin Mycotoxicosis in Broilers weights and serum chemistry modifications. **Avian Dis.**, v. 38, p. 454-460, 1994.

ESPADA, Y.; RUIZ DE GOPEGUI, R.; CUADRADAS, C.; CABANES, F. J. Fumonisin mycotoxicosis in broilers: plasma proteins and coagulation modifications. **Avian Dis.**, v. 41, p. 73-79, 1997.

ESTEBAN, A.; LEONG, S. L.; HOCKING, A. D.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J.; TRAN-DINH, N. Utility of microsatellite markers and amplified fragment length polymorphism in the study of potentially ochratoxigenic black *Aspergilli*. **Curr. Microbiol.**, v. 57, p. 348-355, 2008.

ETCHERVERRY, M.; TORRES, A.; RAMIREZ, M. L.; CHULZE, S.; MAGAN, N. In vitro control of growth and fumonisin productin by *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* using antioxidants under different water availability and temperature regimes. **J. Appl. Microbiol.**, v. 92, p. 624-632, 2002.

FAO, FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. Acessado em 19 de janeiro de 2004. Disponível em www.fao.org. 2004

FAO/IAEA, **Training Manual on Food Irradiation Technology and Techniques** – 2^a ed., 1982.

FARAG, M. D. H.; EL-DIN, D. The nutritive value for chicks of full-fat soybeans irradiated at up to 60 kGy. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 73, p. 319-328, 1998.

FARIAS, A. X.; ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M.; ANDERSEN, P. M.; CORREA, T. B. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no estado do Paraná. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 35, n. 3, p. 617-621, 2000.

FERNANDEZ, A.; VERDE, M. T.; GOMEZ, J.; GASCON, M.; RAMOS, J. J. Changes in the prothrombin time, haematology and serum proteins during experimental aflatoxicosis in hens and broiler chickens. **Res. Vet. Sci.**, v. 58, n. 2, p. 119-122, 1995.

FERREIRA, F. Avaliação dos efeitos da radiação gama sobre amostras de milho artificialmente contaminadas com *Fusarium verticillioides*. (**Tese Mestrado**). Instituto de Ciências Biomédicas: USP, 2005.

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

FRAGA, M. E.; CURVELLO, F.; GATTI, M. J.; CAVAGLIERI, L. R.; DALCERO, A. M.; ROSA, C. A. R. Potential Aflatoxin and Ochratoxin A production by *Aspergillus* species in Poultry Feed Processing. **Vet. Res. Comm.**, v. 31, p. 343-353, 2007.

GALVANO, F.; RUSSO, A.; CARDILE, V.; GALVANO, G.; VANELLA, A.; RENIS, M. DNA damage in human fibroblasts exposed to fumonisin B1. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 25-31, 2002.

GAMBALE, W. Fungos contaminantes.. São Paulo: Médica e Científica Ltda 1998. P. 113-121.

General Accounting Office of United States (GAO). Food Irradiation: Available Research indicates that benefits outweigh risks – Report to Congressional Requesters, 2000.

GARNER, R. C.; MILLER, E. C.; MILLER, J. A. Liver microsomal metabolism of aflatoxin B1 to reactive derivative toxic to *Salmonella typhimurium* TA 1530. **Cancer Res**, v. 32, p. 2058-2066, 1972.

GEISEN, R. PCR methods for the detection of mycotoxin-producing fungi. In: BRIDGE, P.D.; ARORA, D. K.; REDDY, C. A.; ELANDER, R. P. **Applications of PCR mycology**. London: CAB International, 2000, 357 p.

GEISER, D. M.; PITT, J. L.; TAYLOR, J. W. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. **Proceed. Nat. Acad. Sci.**, v. 95, p. 388-393, 1998.

GEISER, D. M.; DORNER, J. W, HORN, B. W.; TAYLOR, J. W. The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. **Fungal Gen. Biol.**, v. 31, p. 169-179, 2000.

GEISER, D. M.; KLICH, M.A.; FRISVAD, J. C.; PETERSON, S. W.; VARGA, J.; SAMSON, R. A. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Stud. Microbiol.**, v. 59, p. 1-10, 2007.

GIACOMINI, L.; FICK, F. A.; DILKIN, P.; MALLMANN, C. A.; RAUBERS, R. H.; ALMEIDA, C. Desempenho e plumagem de frangos de corte intoxicados por aflatoxinas. **Ciencia Rural**, v 36, n. 1, p. 234-239, 2006.

GIAMBRONE, J. J.; DIENER, U. L.; DAVIS, N. D.; PANANGALA, V. S.; HOERR, F. J. Effects of purified aflatoxin on broiler chickens. **Poultry Sci.**, v. 64, p. 852-858, 1985a.

GIAMBRONE, J. J.; DIENER, U. L.; DAVIS, N. D.; PANANGALA, V. S.; HOERR, F. J. Effects of aflatoxin on young turkeys and broiler chickens. **Poultry Sci.**, v. 64, p. 1678-1684, 1985b.

GONZALEZ, F. H. D.; HAIDA, K. S.; MAHL, D.; GIANNESI, G.; KRONBAUER, E. Incidência de doenças metabólicas em frangos de corte no sul do Brasil e uso do perfil bioquímico sanguíneo para o seu estudo. **Rev.Bras. Cienc. Avicol.**, v. 3, n. 2, p. 1-10, 2001.

GOURAMA, H.; BULLERMAN, L. B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: a review. **J. Food Protec.**, v. 58, n. 12, p. 1395-1404, 1995.

GROLINCHOVA, M.; DVORAK, P.; MUSILOVA, H. Employing ionizing radiation to enhance food safety – a review. **Acta Vet. Brno**, v. 73, p. 143-149, 2004.

HANSEN, J.M.; SHAFFER, H.L. Sterilization and preservation by radiation sterilization. In: BLOCK, S.S. **Desinfection Sterilization and Preservation**. 5^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap. 37, p. 729-746.

HARDIN, J. W.; HILBE, J. M. Generalized estimating equations, Chapman and Hall: Boca Raton. 2003.

HASSAN, A.B.; OSMAN, G.A.M.; RUSHDI, M.A.H.; EITAYEB, M.M.; DIAB, E.E. Effect of gamma irradiation on the nutritional quality of maize cultivars (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor*) grains. **Pakist. J. Nutr.**, v. 8, n. 2, p. 167-171, 2009.

HENRY, M.H.; WYATT, R.D. A review of fumonisin production by *Fusarium moniliforme* and fumonisin toxicoses in animals. **Appl. Poult. Res.**, v.2, p.188-192, 1993

HENRY, T.; IWEN, P.C.; HINRICHS, S.H. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 1510, 1515, 2000.

HESS, J.B; ECKMAN, M.K.; BILGILI, S.F.; BLAKE, J.P. Understandin Vitamin Stability. **Curr. Concepts in Broiler Prod.**, p. 4-5, 1993.

HOLLANDER, M.; WOLFE, D. A. Nonparametric statistical methods, 2th ed, Wiley: New York. (1999).

HSIEH, D. P. H.; ATKINSON, D. N. Bifuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 167, p. 101-134, 2001

HUANG, C. J.; CHUANG, T. Y.; TSENG, T. C. Contamination of *Aspergillus flavus* on corn kernels and production of aflatoxin by fungus in Taiwan. **Plant Protect. Bull.**, v. 32, p. 195-202, 1990.

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

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). Dosimetry for Food Irradiation. Technical Reports Series n. 409. Viena, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção da Pecuária Municipal 2002, volume 30. Rio de Janeiro: IBGE; 2003.

ICGFI (International Consultative Group on Food Irradiation) **Fatos sobre irradiação de alimentos**. Série de fichas descritivas do Grupo Consultivo Internacional sobre Irradiação de Alimentos. Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear – CDTN, 1999.

JAFFE, M. Z. Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsfiure im normalen Ham erzeugt und uebe eineneue Reaktion des Kreatinius **Physiol. Chem.**, v. 10, p. 391-400, 1886.

JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 1221 p.

- JAVED, T.; DOMBRINK-KURTZMAN, M. A.; RICHARD, J. L.; BENNETT, G. A.; COTE, L. M.; BUCK, W. B. Serohematologic alterations in broiler chicks on feed amended with *Fusarium proliferatum* culture material or fumonisin B1 and moniliformin. **J. Vet. Diag. Invest.**, v. 7, p. 520–526. 1995;
- JAVED, T.; DOMBRINK-KURTZMAN, M. A.; RICHARD, J. L.; BENNETT, G. A.; COTE, L. M.; BUCK, W. B. Comparative pathologic changes in broiler chicks on feed amended with *Fusarium proliferatum* culture material or purified fumonisin B1 and moniliformin. **Mycopathol.**, v. 159, p. 553-564, 2005.
- JEFCOAT, C. R. Integration of xenobiotic metabolism in carcinogen activation and detoxification. In: CALDWELL, J.; JACOBY, W.B. eds. Biological basis of detoxification – New York, Academic Press, 1983, p. 31
- JESCHKE, N.; NELSON, P. E.; MARASAS, W.O.F. Toxicity to duckling of *Furarium moniliforme* isolated from corn intended for use in poultry feed. **Poultry Sci.**, v. 66, p. 1619-1623, 1987.
- JEWERS, K. Mycotoxins and ther effect on poultry production. **Options Mediterraneennes.**, v. 7, p. 195-202,1990.
- JOBIM, C. C.; GONÇALVES, G. D.; SANTOS, G. T. Qualidade sanitária de grãos e forragens conservadas versus desempenho animal e qualidade de seus produtos. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGES CONSERVADAS. Maringá. Anais ..., p. 242-261, 2001.
- JONES, F. T.; HAGLER, W. H.; HAMILTON, P. B. Association of low levels of aflatoxin in feed with productivity losses in broiler operations. **Poultry Sci.**, v.61, p.861-868,1982.
- JURGENSON, J.E.; ZELLER, K.A.; LESLIE, J.F. Expanded genetic map of *Giberella moniliformis* (*Fusarium verticillioides*). **Appl. Environm. Microbiol.** v. 68, n.4, p.1972-1979, 2002
- KAN, C. A.; RUMP, R.; KOSUTZKY, J. Low level exposure of broilers and laying hens to aflatoxin B1 from naturally contaminated corn. **Arch. Gefluegelkd.**, v.53, p.204-206, 1989.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 5^a ed., Academic Press, San Diego, 932 p., 2004.
- KARAMAN, M.; BASCIOGLU, H.; ORTATATLI, M.; OGUZ, H. Evaluation of the detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis in broilers as assessed by gross examination and histopathology. **Brit. Poultry Sci.**, v. 46, n. 5, p. 394-400, 2005.
- KRABBE, E. L. **Monitoramento e Controle de Fungos e Micotoxinas em Matérias-Primas e Rações** (Comunicação Pessoal), 2005.
- KUBENA, L. F.; EDRINGTON, T. S.; HARVEY, R. B.. Individual and combined effects of fumonisin B₁ present in *Fusarium moniliforme* culture material and T-2 toxin or deoxynivalenol in broiler chicks. **Poultry Sci.**, v. 76, p. 1239-1247, 1997.

KUILMAN, M. E. M.; MAAS, R. F. M.; FINK-GREMMELS, J. Cytochrome P450-mediated metabolism and cytotoxicity of aflatoxin B1 in bovine hepatocytes. **Toxicology in vitro**, v. 14, p. 321-327, 2000.

KUME, T.; ITO, H.; ISHIGAKI, L. Production of aflatoxin and radiosensitivity of moulds isolated from spices. **J. Food Protec.**, v. 50, p.26-32, 1987

LACEY, J. Water availability and the occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in stored products. In: **International IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins**. Tokyo: IUPAC, 1988. v. 6, p.186-89.

LACEY, J.; MAGAN, N. Fungi in cereal grain: their occurrence and water and temperature relations. In: CHELKOWSKI, J. **Cereal grain: mycotoxins, fungi and quality in drying and storage** (Ed.). Amsterdam: Elsevier Science, 1991. p. 77-118.

LACEY, J. Prevention of mould growth and mycotoxin production through control of environmental factors. In *Mycotoxins and Phycotoxins, Bioactive Molecules 10* ed. NATORI, S., HASHIMOTO, K. AND UENO, Y. Amsterdam: Elsevier Sciences. pp. 161-169. (1989)

LAN, F. L.; HOLCOMB, I. J. ; FUSARI, S. A. Liquid Chromatography Assay of Ascorbic Acid, Niacinamide, Piridoxine, Thiamine and Riboflavin in Multivitamin - Mineral Preparation, **J. Assoc. Anal. Chem.**, v. 67, p. 1007-1011. 1985.

LANA, G. R. Q., ROSTAGNO, H. S., ALBINO, L. F. T., LANA, A. M. Q. Efeito da temperatura ambiente e da restrição alimentar sobre o desempenho e a composição da carcaça de frangos de corte. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 29, p. 1117-1123. 2000

LEDOUX, D. R.; BERMUDEZ, A. J.; ROTTINGHAUS, G. E. Effects of feeding Fusarium moniliforme culture material containing known levels of fumonisin B1, in the young turkey poult. *Poultry Sci.*, v. 75, n. 12, p. 1472-1478, 1996.

LEDOUX, D. R.; BROOMHEAD, J. N.; BERMUDEZ, A. J.; ROTTINGHAUS, G. E. Individual and combined effects of the Fusarium mycotoxins Fumonisin B1 and moniliformin in broiler chicks. **Avian Dis.**, v. 47, p. 1368-1375, 2003.

LEDOUX, D. R.; BROWN, T. P.; WEIBKING, T. S.; ROTTINGHAUS, G. E. Fumonisin toxicity in broiler chicks. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 4, p. 330-333, 1992.

LEE, C. Z.; LIOU, G. Y.; YUAN, G. F. Comparison of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae* by amplified fragment length polymorphism. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, v. 45, p. 61-68, 2004.

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

LEITÃO, J.; SAINT BLANQUAT, G.; BAILLY, J. R.; PAILLAS, C. H. Quantitation of aflatoxins from various strains of *Aspergillus* in foodstuffs. **J. Chromatog.**, v. 435, p. 229-234, 1988.

LESLIE, J. F. Introductory biology of *Fusarium moniliforme*. In: JACKSON, L. S.; De VRIES, J. W.; BULLERMAN, L. B. eds. **Fumonisin in food**. New York, Plenum Press, 1996, p. 153-164

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Iowa, Blackwell Publishing, 2006, 388p.

LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; LOGRIECCO, A.; MULE, G.; MORETTI, A.; RITIENI, A. Species diversity of and toxin production by *Gibberella fujikuroi* species complex strains isolated from native prairie grasses in Kansas. **Appl. Environm. Microbiol.**, v. 70, n. 4, p. 2254-2262, 2004.

LI, Y. C.; LEDOUX, D. R.; BERMUDEZ, A. J.; FRITSCHKE, K. L.; ROTTINGHAUS, G. E. Effects of fumonisin B₁ on selected immune responses in broiler chicks. **Poultry Sci.**, v. 78, p. 1275-1282, 1999.

LILLEHOJ, E. B.; ZUBER, M. S. Distribution of toxin-producing fungi in nature maize kernels from diverse environments. **Tropical Scie.**, v. 28, p. 19-24, 1988.

LIMA, J. F.; SIQUEIRA, S. H. G.; ARAÚJO, D. V.; PEREIRA, A. P. G.; SILVA FILHO, G. A.; MIRANDA, H. **Relato Setorial – Agricultura**. Área de Operações Industriais 1 – Gerência Setorial 1. Agosto, 2005.

LIN, M. T.; DIANESE, J. C. A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. **Phytopathol.**, St. Paul, v.66, n.12, p.1466-1469, 1976.

LOURENÇO, A.; DURIGON, E. L.; ZANOTTO, P.; MADEIRA, J. E. G. C.; ALMEIDA, A. P.; CORREA, B. Genetic diversity of environmental *Aspergillus flavus* strains in the state of São Paulo, Brazil by random amplified polymorphic DNA. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 102, n.6, p. 687-692, 2007.

LOWE, J. A.; KERSHALL, S. J. Water activity-moisture content relationship as a predictive indicator for control of spoilage in commercial pet diet components. **Animal Feed Science Technology**, v. 56, p. 187-194, 1995.

MABBETT, T. Storing up problems? **Coffee and Cocoa International**, p. 1-5, 2004.

MAGNOLI, C. E.; SAENZ, M. A.; CHIACCHIERA, S. M.; DALCERO, A. M. Natural occurrence of *Fusarium* species and fumonisin-production by toxigenic strains isolated from poultry feeds in Argentina. **Mycopathol.**, v. 145, p. 35-41, 1999.

MALLMANN, C. A.; SANTURIO, J. M.; ALMEIDA, C. A. A.; DILKIN, P. Fumonisin B₁ levels in cereals and feeds from southern Brazil. **Arq. Instituto Biológicos**, v. 68, p. 41-45, 2001.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DA PECUÁRIA (MAPA). Agronegócio Brasileiro: Uma oportunidade de Investimentos. Disponível na Internet via: <http://www.agricultura.gov.br>. Consultado em 20/11/2005.

MARIANI, G. V. C. Efeito de aflatoxinas sobre o desempenho produtivo de frangos de corte em diferentes períodos de desenvolvimento corporal. [Dissertação]. Santa Maria (RS):Universidade Federal de Santa Maria; 1998

MARTINEZ, M. S.; MARTINEZ, A. J. Mold occurrence and aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ determination in corn samples in Venezuela. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 2933-2936, 2000.

MASRI, S.; HADDON, W. F.; LUNDIN, R. E.; HSIEH, D. P. H. Aflatoxin Q₁: a newly identified major metabolite of aflatoxin B₁ in monkey liver. **J. Agric. Food Chem.**, v. 22, p. 512, 1974.

MATIN, M. A., AMIN, M. R., RAHMAN, S., ROKEYA, B. AND MALEK, M. A. Nutricional value of poultry feed decontamination by irradiation. **Indian Vet. J.** , v. 62, p. 251-254. 1985.

MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M. R. S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: MATIOLI, S. R. editor. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto, Holos editor, 2001, 202ps.

MATSUDA, A. H. **Aplicação da técnica de irradiação gama para a preservação de própolis**, 2002 – Dissertação (Mestrado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2002.

MAXY, R. B. Irradiation of Food for Public Health Protection. **J. Food Protec.**, v. 45, n. 4, p. 363-366, 1992.

MCCULLAGH, P.; NELDER, J. A. Generalized linear models, 2 Ed, Chapman and Hall: London. 1989.

MCLEAN, M.; DUTTON, M. F. Cellular interacions and metabolism of aflatoxin: an update. **Pharmacol. Ther.**,v.65, p.163-192, 1995

MERCK. The Merck Index – Twelfth Edition. Editora: Susan Budavari. New Jersey: Merck & Co, Inc, 1996.

MEREDITH, F. I. Isolation and characterization of fumonisins. **Methods in Enzymology**, v. 311, p. 361,373, 1999.

MERRILL, A. H.; SCHMELZ, E. M.; DILLEHAY, D. L.; SPIEGEL, S.; SHAYMAN, J. A.; SCHROEDER, J. J.; RILEY, R. T.; VOSS, K. A.; WANG, E. Sphingolipids – The enzymatic lipid class: Biochemistry, Physiology, and Pathophysiology. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 142, p. 208-225, 1997.

METTA, V. C.; JOHNSON, B. C. Biological value of gamma irradiated corn protein and wheat glúten. **J. Agric. Food Chem.**, v. 7, p. 131-133. 1951.

MIAZZO, R.; PERALTA, M. F.; MAGNOLI, C.; SALVANO, M.; FERRERO, S.; CHIACCHIERA, S. M.; CARVALHO, E. C. Q.; ROSA, C. A. R.; DALCERO, A.. Efficacy

of sodium bentonite as a detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin and fumonisin. **Poultry Sci.**, v. 84, p.1-8, 2005.

MODIRSANEI, M. MANSOORI, B.; KHOSRAVI, A. R.; KIAEI, M. M.; KHAZRAEINIA, P.; FARKHOY, M.; MASOUMI, Z. Effect of diatomaceous earth on the performance and blood variables of broiler chicks during experimental aflatoxicosis. **J. Sci. Food Agricult.**, v. 88, p. 626-632. 2008.

MOLLINS, R. A.; MOTARJEMI, Y.; KAFERSTEIN, F. K. Irradiation: a critical control point in ensuring the microbiological safety of raw foods. **Food Control**, v. 12, p. 347-356, 2001.

MONK, J. D.; BEUCHAT, L. R.; DOYLE, M. P. Irradiation inactivation of Food-borne microorganisms. **J. Food Protec.**, v. 58, n. 2, p. 197-208, 1995

MONTIEL, D.; DICKINSON, M. J.; LEE, H. A.; DYER, P. S. JEENES, D. J.; ROBERTS, I. N.; JAMES, S.; FULLER, L. J; MATSUCHIMA, K.; ARCHIER, D. B. Genetic differentiation of the *Aspergillus* section *flavi* complex using AFLP fingerprints. **Mycol. Res.**, v. 107, n.12, p. 1427-1434, 2003.

MORENO, E.C.; GARCIA, G.T.; ONO, M.A.; VIZONI, E.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the northern region of Paraná State, Brazil. **Food Chem.**, v. 116, p. 220-226, 2009.

MORETTI, A.; MULÈ, G.; SUSCA, A.; GONZALEZ-JAÉN, M. T.; LOGRIECO, A. Toxin profile, fertility and AFLP analysis of *Fusarium verticillioides* from banana fruits. **Eur. J. Plant Pathol.** v. 110, p. 601-609, 2004.

MULLER, R. D.; CARLSON, C. W.; SEMENIUK, G.; HARSHFIELD, G. S. The response of chicks, ducklings, goslings, pheasants and poults to graded levels of aflatoxin. **Poultry Sci.**, v.49, p. 1346-1350, 1970.

MUNZNER, R. Some factors affecting the radio sensitivity of molds (in German). **Arch. Mikrobiol.**, v. 64, p.349-356, 1969.

MURANO, E. A. Irradiation of fresh meats. **Food Technology**, p.52-54, 1995.

MUSSER, S. M.; PLATTNER, R. D. Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygami*. **J. Agric. Food Chem.**, v.45, p.1169-1173, 1997.

MUTASA, E. S.; MAGAN, N. Utilisation of potassium sorbate by tobacco spoilage fungi. **Mycol. Res.**, v. 94, p. 965-970, 1990.

NATT, M. P.; HERRICK, G. A. A new blood diluent for counting erythrocytes and leukocytes of the chicken. **Poultry Sci.**, v. 31, p. 735 - 738, 1952.

NEAL, G. E. JUDAH, D. J.; STIRPE, F.; PATTERSON, D. S. The formation of the 2,3-dihydroxy-2,3-dihydro-aflatoxin B1 by the metabolism of aflatoxin B1 by liver microsomes

isolated from certain avian and mammalian species and the possible role of this metabolite in the acute toxicity of aflatoxin B1. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 58, p. 431, 1981

NEAL, G. E.; NIELSCH, V.; JUDAH, D. J.; HULBERT, P. B. Conjugation of model substrate or microsomal-activated aflatoxin B1 with reduced glutathione, catalysed by cytosolic glutathione S-transferases in livers of rats, mice and Guinea pigs. **Biochem. Pharmacol.**, v. 36, p. 4269-4276, 1987

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 76, p. 5269-5273, 1979.

NELSON, P. E. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathol.**, v. 117, p. 29-36, 1992.

NELSON, P. E.; TOUSON, T. A. MARASAS, W. F. O. ***Fusarium* species. An illustrated manual for identification.** Pennsylvania, University Press, 1983. 193ps.

NETER, J.; KUTNER, M. K.; NACHTSHEIM, C. J.; WASSERMAN, W. Applied linear statistical models, 4 Ed. Irwin: Chicago. 1996.

NEWBERNE, P.M. Chronic Aflatoxicosis. **J.A.V.M.A.**, v. 163, n. 1, p. 1262:1267, 1973.

NIRENBERG, H. I.; O'DONNELL, K. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia.** v. 90, p. 434-458, 1998.

NORRED, W. P. Liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in poultry meat. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 70(1): 121-126, 1987.

NOVAS, M. V.; CABRAL, D. Association of mycotoxin and sclerotia production with compatibility groups in *Aspergillus flavus* from peanut in Argentina. **Plant Dis.**, v. 86, p. 215-219, 2002.

OGUZ, H.; KURTOGLU, F.; KURTOGLU, V.; BIRDANE, Y. O. Evaluation of biochemical characters of broiler chickens during dietary aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure, **Research in Veterinary Science**, v. 73, p. 101-103, 2002.

OGUZ, H.; KURTOGLU, V.; Effect of clinoptilolite on performance of broiler chickens during experimental aflatoxicosis. **Brit. Poultry Sci.**, v. 41, p. 512-517, 2000.

OKUNO, E. **Radiação: Efeitos, riscos e benefícios.** São Paulo: Harbra, 1988, 81p.

OLIVEIRA, C. A. A.; CORREA, B.; CASTRILLON, A. L.; CORTEZ, A. C. A. Occurrence of filamentous fungi and aflatoxins in poultry feedstuffs. **Rev. Microbiol.**, 29(2):138-142, 1998.

OLIVEIRA, C. A.; ROSMANINHO, J.; ROSIM, R. Aflatoxin M1 and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in São Paulo, Brazil. **Food Addit. Contam.**, v. 23, n. 2, p. 196-201, 2006.

OLIVEIRA, J. A. A. Ocorrência de fungos filamentosos e de micotoxinas em ração destinada a alimentação de aves. Tese de Mestrado. Universidade do Amazonas, 1995

- ONO, E. Y. S. *et al.* Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly corn harvested of the State of Paraná, Brazil. **Mycopathol.a**, v. 147, p. 139-148, 2001.
- ONYENEKWEE, P. C.; OGBADU, G. H.; HASHIMOTO, S. The effect of gamma radiation on the microflora and essential oil of Ashanti pepper (*Piper guineense*) berries. **Postharvest Biol. Technol.**, v. 10, p. 161-167, 1997.
- ORSI, R. B.; CORREA, B.; POZZI, C. R.; SCHAMMASS, E. A.; NOGUEIRA, J. R.; DIAS, S. M. C.; MALOZZI, M. A. B. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **J. Stored Products Res.**, v. 36, p. 75-87, 2000.
- ORTATLI, M.; OGUZ, H.; HATIPOGLU, F.; KARAMAN, M. Evaluation of pathological changes in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. **Res. Vet. Sci.**, v. 78, p. 62-68, 2005.
- OSWEILER, G. D. Mycotoxins and livestock: What role do fungal toxins play in illness and production losses? **Vet.Med.**, v.85, p.89-94, 1990
- PAMPHILE, J. A.; AZEVEDO, J. L. Molecular characterization of endophytic strains of *Fusarium verticillioides* (= *Fusarium moniliforme*) from maize (*Zea mays*.L). **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 18, p. 391-396, 2002.
- PAPA, K. E. Heterokaryon incompatibility in *Aspergillus flavus*. **Mycologia**, v. 78, p. 98-101, 1986.
- PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In: KLAASSEN, C.D. ed. **Toxicology; the Basic Science of Poisons**. New York, Mc Graw-Hill, 1996. p.113-186.
- PASTER, N.; BARKAI-GOLAN, R.; PADOVA, R. Effect of gamma radiation on ochratoxin production by the fungus *A. ochraceus*. **J. Sci. Food Agric.**, v. 36, p. 445-449, 1985.
- PASTER, N.; BULLERMAN, L. B. Mould spoilage and mycotoxins formation in grains as controlled by physical means. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 7, p. 257-65. 1988.
- PATEL, U. D.; GOVINDARAJAN, P.; DAVE, P. J. Inactivation of aflatoxin B1 by using the synergistic effect of hydrogen peroxide and gamma radiation. **Appl. Environm. Microbiol.**, v. 55, n. 2, p. 465-467. 1989.
- PATIÑO, B.; MIRETE, S.; GONZÁLEZ-JAÉN, M. T.; MULÉ, G.; RODRÍGUEZ, M. T.; VÁZQUEZ, C. PCR detection assay of fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* strains. **J. Food Protection**, v. 67, n.6, p. 1278-1283, 2004.
- PEDROZA, A. V. B.; DENZEN, R. B. O milho: características do mercado e perspectivas. **Preços Agríc.**, v.55, p. 1-4, 1991.
- PIER, A. C. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. **J. Anim. Sci.**, v.70, 3964-3967, 1992.

- PINAZZA, L. A. **Perspectivas da cultura do milho e do sorgo no Brasil**. In: Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Potafos, 1993, p.1-10.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Aspergillus* and related teleomorphs. In: PITT, J. **Fungi and food spoilage**. London: Chapman & Hall, 1997. p.339-416.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2 ed. Gaithersburg, Aspen Pub., Inc., p. 593, 1999.
- POZZI, C. R.; CORREA, B.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; CHACON-RECHE, N. O.; MEIRELES, M. C. A. Post-harvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxins occurrence. **Food Add. Contam.**, v. 12, n. 3, p. 313-319, 1995.
- PRADO, G.; CARVALHO, E. P.; OLIVEIRA, M. S.; GAZZINELLI, J.; MORAIS, V. D.; CORREA, R. F.; CARDOSO, V. N.; SOARES, T. V.; SILVA, J. F. M.; GONÇALVES, R. C. P. Effect of gamma irradiation on the inactivation of aflatoxin B1 and fungal flora in peanut. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, n. 1, p. 138-140, 2003.
- PRINGLE, A.; BAKER, D. M.; PLATT, J. L.; LATGE, J. P.; TAYLOR, J. W. Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal humn pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Evolution**, v. 59, p. 1886-1899, 2005.
- RAJ, H. G.; LOTLIKAR, P. D. Urinary excretion of thiol conjugates of aflatoxin B1 in rats and hamsters. **Cancer Letters**, 22:125, 1984.
- RAJU, M. V. L. N.; DEVEGOWDA, G. Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin. **British Poultry Sci.**, v. 41, p. 640-650, 2000.
- RAMAKRISHNA, N.; LACEY, J.; SMITH, J. E. Effects of water activity and temperature on the growth fungi interacting on barley grain. **Mycol Res**, v. 97, n. 11, p. 1393-1402, 1993..
- RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore, Willians & Wilkins, 1965. 686ps.
- REFAI, M. K.; AZIZ, N. H.; FERIAL, EL-FAR; HASSAN, A. A. Detection of ochratoxin produced by *A. ochraceus* in feedstuffs and its control by gamma radiation. **Appl. Rad. Isot.**, v. 47, n. 7, p. 617-621. 1996.
- REIS, R. A.; RODRIGUES, L. R. A. Aditivos para produção de fenos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 35, 1998, **Anais...**Botucatu:SBZ, 1998, p. 109-152.
- REITMAN, S. E FRANKEL S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase. **Am. J. Clin. Path.**, v. 28, p. 56-63, 1957.
- RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F.O.; VISMER, H. F. Production of fumonisina analogs by *Fusarium* species. **Appli. Environm. Microbiol.**, v. 68, n. 2, p. 2101-2105, 2002.

RIBEIRO, S. A. L.; CAVALCANTI, M. A. Q.; FERNANDES, M. J. S.; LIMA, D. M. M. Fungos filamentosos isolados de produtos derivados do milho comercializados em Recife, Pernambuco, **Rev.Bras. Bot.**, v. 26, n. 2, p. 223-229, 2003.

RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slid culture. **Mycologia**, v. 42, p. 265-70, 1950.

RIDLEY, M. **Evolução**. Porto Alegre, Artmed, 2006. 751ps.

RIZK, M. A.; BOTROS, H. W. Effect of gamma-irradiation on the seeds mycoflora of some Egyptian food crops. **J. Food Agricult. Environm.**, v. 4, n. 1, p. 91-99. 2006.

ROBERTS, T.; WEESE, J. Food Irradiation. Alabama Cooperative Extension System. HE-727. Alabama A&M and Auburn University: Alabama, 1995.

ROCHA, L. O.; NAKAI, V. K.; BRAGHINI, R.; REIS, T. A.; KOBASHIGAWA, E.; CORREA, B. Mycoflora and co-occurrence of fumonisins and aflatoxins in freshly harvested corn in different regions of Brazil. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 10, n. 11, p. 5090-5103. 2009.

ROSMANINHO, J. F.; OLIVEIRA, C. A. F.; BITTENCOURT, A. B. F. Efeitos das micotoxícoses crônicas na produção avícola. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.68, n.2, p.107-114, jul./dez., 2001

ROSS, P. F.; RICE, L. G.; PLATTNER, R. D.; OSWEILER, G. D.; WILSON, T. M.; OWENS, D. L.; NELSON, H. A. ; RICHARD, J. L. Concentrations of fumonisin B₁ in feeds associated with animal health problems. **Mycopathologia**, v. 114, p. 129-135, 1991.

ROSS, P. F.; NELSON, P. E.; RICHARD, J. L.; PLATTNER, R. D.; RICE, L. G.; OSWEILLER, G.D.; WILSON, T.M. Production of fumonisin by *Fusarium verticillioide* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome swine. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 56, p. 3224-6, 1990.

ROSTAGNO, H. S. Tabelas Brasileiras para aves e suínos.: composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa: UFV, 2000. 141 p.

ROY, A. V. Rapid method for determining alkaline phosphatase activity in serum with thymolphthalein monophosphate **Clin. Chem.**, v. 16, p. 431-436, 1970

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

SABINO, M. Aflatoxinas B₁, M₁ e aflatoxicol: extração, caracterização em tecidos e urina. Sao paulo, 1990, 113p. (Tese de doutorado – Faculdade de Ciencias Farmaceuticas da USP)

SAITO, M.; TSURUTA, O.; SIRIACHA, P.; KAWASUGI, S.; MANABE, M.; BUANGSUMON, D. Distribution and aflatoxin productivity of the atypical strains of *Aspergillus flavus* isolated from soils in Thailand. **Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol.**, v. 24, p. 41-46, 1986.

SAITO, M.; TSURUTA, O.; SIRIACHA, P.; KAWASUGI, S.; MANABE, M.; BUANGSUMON, D. Atypical strains of *Aspergillus flavus* isolated in maize fields. **Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol.**, v. 23, p. 151-154, 1989.

SAITON, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, v.4, n.4, p.406-425, 1987.

SALEH, N. A.; AZIZ, N. H. Incidence of mycotoxins in feedstuffs and effects of gamma irradiation and sodium propionate on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. **J. Egypt. Med. Assoc.**, v. 56, p. 281-299, 1996.

SALGADO, J. M.; CARVALHO, P. C.T. Fungos toxigênicos associados a cereais. I – Levantamento da microbiota do milho, trigo e arroz. **Revista de Microbiologia**, v. 11, p. 60-63, 1980.

SALHAB, A. S.; ABRAMSON, F. P.; GEELHOED, G. W.; EDWARDS, G. S. Aflatoxicol M1 a new metabolite of aflatoxicol. **Xenobiotica**, v. 7, p. 401, 1977.

SANTURIO, J. M. Impacto das aflatoxinas sobre a produção animal. Perspectiva Latino-americana. In: CONFERENCIA APINCO DE CIENCIA E TECNOLOGIA AVICOLA. 1996. Campinas. Anais...Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996. p. 149-156.

SANTURIO, J.M. Micotoxinas na produtividade avícola: tipos; seus efeitos; como detecta-las e preveni-las. Conferencia APINCO 97 de Ciencia e Tecnologia Avicolas, 1997 p. 224-257.

SANTURIO, J.M. Mycotoxins and Mycotoxicosis in poultry. **Rev. Bras. Ciência Avícola**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2002.

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

SCF (Scientific Committee on Food). Revision of the opinion of the Scientific Committee on food on the irradiation of food. European Commission – Health and Consumer Protection Directorate - General, 2003.

SCHABERLE, F. A. ; SILVA, N. C. **Introdução à Física da Radioterapia**, Universidade Federal de Santa Catarina Centro de Ciências Físicas e Matemática Departamento de Física, Apostila, 2000

SCHIMIDT, H.; NIESSEN, L.; VOGEL, R. F. AFLP analysis of *Fusarium* species in the section *Sporotrichiella*- evidence for *Fusarium langsethiae* as new species. **Int. J. Food Microbiol.** v. 95, p. 297-304, 2004.

SCOTT, P. M. Industrial and farm detoxification processes for mycotoxins. **Rev. Med. Vet.**, v. 149, p. 543-548, 1998.

SCUDAMORE. K. A.; HETMANSKI, M. T.; CHAN, H. K.; COLLINS, E. Occurrence of mycotoxins in raw ingredients used for animal feeding stuffs in the United Kingdom in 1992. **Food Add. Contam.s**, v. 14, n. 2, p. 157-173, 1997.

- SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em Alimentos**. Florianópolis:Insular,1998. 144p.
- SHARMA; SALUNKHE. Introduction to mycotoxins. In: SHARMA; SALUNKHE **Mycotoxins and Phytoalexins**. Londres: CRC Press, 1991. 775ps.
- SHARMA, A.; BEHERE, A. G.; PADWAL-DESAI, S .R.; NADKARNI, G. B. Influence of inoculums size os *Aspergillus parasiticus* spores on aflatoxin production. **Appli. Environm. Microbiol.**, v. 40, n. 6, p. 989-993. 1980.
- SHARMA, A.; PADWAL-DESAI, S. R.; NAIR, P. M. Aflatoxin-producing ability of spores of *Aspergillus parasiticus* exposed to gamma radiation. **J. Food Sci.**, v. 55, n. 1, p. 275-276. 1990.
- SHOTWELL, O. L.; HESSELTINE, C. W.; STUBBLEFIELD, R. D.; SORENSON, W. G. Production of aflatoxin on Rice. **Appli. Microbiol.**, v. 14, n. 3, p. 425-427, 1966.
- SIMS, F. H.; HORN, C., Some observations on powells method for the determination of serum bilirubin. **Am. J. Clin. Path.**, v. 29, p. 412-417, 1958
- SMITH, J. S.; PILAI, S. Irradiation and Food Safety. *Food Technology*, 58(11):48-55, 2004.
SMITH, J. E. **Biotechnology Handbooks – Aspergillus**. New York: Plenum Press, 1994, p.1-4., 1994.
- SMITH, J. E.; MOSS, M. O. **Mycotoxins: formation, analysis and significance**. John Wiley & Sons: Great Britain, 1985.
- SOARES, L. M., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **J. Assoc Off Anal Chem.**, v. 72, p. 22-26, 1989.
- SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. S. **Patologia de Sementes**. Ed. Fundação Cargill: Campinas, São Paulo, 1987. p.325-327.
- SPOLAORE, A. J. G.; GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M.L. Irradiação de alimentos. In: GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos – Qualidade das matérias primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos**. 2ª ed. São Paulo: Varela, 2003.
- STACK, M. E.; EPPLEY, R. M. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn and cron products. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 72, p. 834-837, 1992.
- STEENKAMP, E. T.; WINGFIELD, B. D.; COUTINHO, T. A.; ZELLER, K. A.; WINGFIELD, M. J.; MARASAS, W. F. O.; LESLIE, J. F. PCR – based identification of *Mat-1* and *Mat-2* in the *Giberella fujikuroi* species complex. **Appli. Environm. Microbiol.** v. 66, n.10, p. 4378-82, 2000.
- STROHECKER, R.; HENNING, H. M. Vitaminbestimmungen. Verlag Chemie, Weinheim, 1963:

SWOFFORD, D. **PAULP: Phylogenetic analysis using parsimony**. Version 4, Massachusetts: Sinauer Associates, 1998.

SYDENHAM, E. W.; THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O.; SHEPARD, G. S.; VAN SCHALKWYK, D. J.; KOCH, K. R. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei Southern Africa. **J. Agricult. Food Chem.**, v. 38, p. 1900-19003, 1990.

SYDENHAM, E. W.; MARASAS, W. F. O.; SHEPARD, G. S.; THIEL, P. G.; HIROOKA, E. Y. Fumonisin concentrations in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicosis. **J. Agricult. Food Chem.**, v. 40, p. 994-997, 1992.

SZEKELY, J. G.; CHELACK, W. S.; DELANEY, S.; MARQUARDT, R. R.; FROHLICH, A. A. Scanning electron microscope observations of growth and ochratoxin A production of *Aspergillus alutaceus* variety *alutaceus* (formerly *A. ochraceus*) on gamma-irradiated barley. **Food Struct.**, v.10, p. 295-302, 1991.

TARDIN, A. Nutrição de poedeiras em clima quente. **Avicul. Suinocult. Indust.**, v.79, n.949, p.25-31, 1989

TARIN, A.; ROSELL, M. G.; GUARDINO, X. Use of high-performance liquid chromatography to assess airborne mycotoxins aflatoxins and ochratoxin A. **J. Chromat. A.**, v. 1047, p. 235-240, 2004.

TAUHATA, L.; SALATI, I. P. A.; PRINZIO, R.; PRINZIO, A. R. Radioproteção e dosimetria: Fundamentos. 5ª Ed. Rio de Janeiro: IRD/CNEN. 242p.

TESSARI, E. N. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; CARDOSO, A. L. S.P.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G.E. Efeito da aflatoxinas B₁ e fumonisina B₁ sobre os níveis séricos de Aspartato amino-transferase e proteína total de frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 924-929, 2006a.

TESSARI, E. N. C.; OLIVEIRA, C.A. F.; CARDOSO, A. L. S. P.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E. **Br. Poultry Sci**, v. 47, n. 3, p. 357-364, 2006b.

THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O.; SYDENHAM, W. E. SHEPARD, G.S.; GELDERBLUM, W. C. A.; NIEUWENHUIS, J. J. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. **Appl. Environm. Microbiol.**, v. 57, n. 4, p. 1089-1093, 1991.

TIMM, L. L. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. **Caderno La Salle XI**, v. 2, n. 1, p. 231-239, 2005.

TOONEN, R. J.; HUGHES, S. Increased throughput for fragment analysis on an ABI 377 Automated Sequencer using a 100-lase Rapid Load membrane combination and STRand software. **Bio Techniques**. v.31, p.1320-1324, 2001.

TRAN-DINH, N.; KENNEDY, I.; BUI, T.; CARTER, D. Survey of Vietnamese Peanuts, Corn and Soil for the Presence of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*.

Mycophatologia, 2009 (no prelo). Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/tuwq0558h3778733>>. Acesso em 08 set 2009.

TRINDER, D. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Ann. Clin. Biochem.**, v. 6, p. 24-25, 1969.

TUNG, H. T.; WYATT, R. D.; THAXTON, P.; HAMILTON, P. B. Concentrations of serum proteins during aflatoxicosis. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 34, p. 320-326, 1975.

URANO, T.; TRUCKSESS, M. W.; BREAVER, R. W.; WILSON, D. M.; DORNER, J. W.; DOWELL, F.E. Co-ocorrurrence of cyclopiazonic acid and aflatoxins in corn and peanuts. **J. AOAC Int.**, v. 75, n. 5, p. 838-841, 1992.

VAN DYCK, P. J.; TOBBACK, P.; FEYS, M.; VOORDE, H. Sensitivit of Aflatoxin B1 to ionizing radiation. **Appl. Environm. Microbiol.**, v. 43, n. 6, p. 1317-1319, 1982.

VAN RENSBURG, C. J.; VAN RENSBURG, C. E. J.; VAN RYSSEN, J. B. J.; CASEY, N. H.; ROTTINGHAUS, G. E. In vitro and in vivo assessment of humic acid as an aflatoxin binder in broiler chickens. **Poultry Sci.**, v. 85, p. 1576-1583, 2006.

VENEZUELA, M. K.; BOTTER, D. A.; SANDOVAL, M. C. Diagnostic techniques in generalized estimating equations. **J. Stati. Comput. Simulation**, v. 77, p. 879-888. 2007.

VILLAVICENCIO, A. L. C. H.; MANCINI-FILHO, J.; DELINCEE, H.; BOGNAR, A.. Effect of gamma irradiation on the thiamine, riboflavin and vitamin B6 content in two varieties of Brazilian beans **Rad. Physics Chem.**, v. 57, p. 299-303, 2000.

VISCONTI, A.; DOKO, M. B. Occurrence of fumonisin B1 and B2 in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. **Food Add. Contam.**, v. 11, n. 4, p. 433-439, 1994.

VISCONTI, A.; SOLFRIZZO, M. ; GIROLAMO, A. Determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity column cleanup: collaborative study. **Food Chem. Contam.**, v. 84, p. 1828-1837, 2001.

VOSS, K. A.; HOWARD, P. C.; RILEY, R. T.; SHARMA, R. P.; BUCCI, T. J.; LORETZEN, R. J. Carcinogenicity and mechanism of action of fumonisin B1: a mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme* (= *F. verticillioides*). **Cancer Detec. Prevent.**, v. 26, p. 1-9, 2002.

WANG, E.; NORRED, W.; BACON, C.W.; RILEY, R.T.; MERRILL, A.H. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. **J. Biolog. Chem.**, v. 266, n. 22, p. 14486-14490, 1991.

WEIBKING, T. S.; LEDOUX, D. R.; BERMUDEZ, A. J.. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁, on the young broiler chick. **Poultry Sci.**, v. 72, p. 456-466, 1993.

WEST, S.; WYATT, R. D.; HAMILTON, P.B. Improved Yield of aflatoxin by incremental increases of temperature. **Appl. Microbiol.**, v. 25, n. 6, p. 1018-1019, 1973.

WHITLOW, L.W.; HAGLER, W.M. Mycotoxin in feeds. **Feedstuffs**, v. 74, n. 28, p. 1-10, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Mycotoxins Environmental Health Criteria**. Geneva: WHO, 1979. v. 11, p. 21-84.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Safety and nutritional adequacy of irradiated food**. Geneva, p.1-17, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Safety evaluation of certain mycotoxins in food – Prepared by the fifty-sixth meeting of the joint FAO/WHO Expert Committee on food Additives (JECFA) – FAO Food and Nutrition Paper 74, 2001.

WICKLOW D. T.; HORN, B. W.; BURG, W. R.; COLE, R. J. Sclerotium dispersal of *Aspergillus flavus* and *Eupenicillium ochrosalmoneum* from maize during harvest. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v. 83, p. 299-303, 1984.

WICKLOW, D. T. Taxonomic features and ecological significance of sclerotia. In: **Aflatoxin and Aspergillus flavus in Corn**. Southern Cooperative Series Bulletin. Auburn: Auburn University, 1983. v. 79, p. 6-12.

WIDIASTUTI, R.; MARYAM, R.; BLANEY, B. J.; STOLTZ, D. Corn as a source of mycotoxins in Indonesian poultry feeds and the effectiveness of visual examination methods for detecting contamination. **Mycopathol.**, v. 102, p. 45-49, 1988.

WILLIAMS, D. A. Generalized linear model diagnostic using the deviance and single case deletion. **Appl. Stat.**, v. 36, p. 181-191. 1987.

WONG, Z. A.; HSIEH, D. P.H. Aflatoxicol, major aflatoxin B1 metabolite in rat plasma. **Science**, v. 200, p. :325-327, 1978.

WYATT, R. D. Poultry. In: SMITH, E. J.; HENDERSON, S.R. editors. **Mycotoxins and animal foods**. Boca Raton: CRC Press, 1991.p. 553-612.

YAMAGUCHI, M. M. *et al.*, Fumonisin em milho no Estado do Paraná. In: **Encontro de Micotoxinas**, 7, São Paulo, 1992, p. 27.

YI, H.; BOJJA, R. S.; FU, J.; DU, L. Direct evidence for the function of FUM13 in 3-ketoreduction of mycotoxins fumonisins in *Fusarium verticillioides*. **J. Agricult. Food Chem.**, v. 53, p. 5456-5460, 2005.

YIANNIKOURIS, A.; JOUANY, J.P. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. **Animal Res.**, v. 51, p. 81-99, 2002.

YOUSSEF, M. B.; MAHROUS, S. R.; AZIZ, N. H. Effect of gamma-irradiation on aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus* in ground beef stored at 5°C. **J. Food Safety**, v. 19, p. 231–239. 1999.

ZEINAB, E. M. EL-BAZZA; HALA, A. F.; MOHIE, E. D. Z. EL-FOULY; SEHAM, Y. M. EL-TABLAWY. Inhibitory effect of gamma radiation and *Nigella sativa* seeds oil on growth,

spore germination and toxin production of fungi. **Rad. Physics Chem.**, v. 60, p. 181-189. 2001.

ZERINGUE J. R., H.J.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E. C₁₅H₂₄ volatile compounds unique to aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 2264-2270, 1993.

ZEVADA, M. Z. Producción de aflatoxinas por cepas aisladas de maíz. **Rev. Lat-Am. Microbiol.**, v. 13, p. 263-6, 1971