

FABIANE LUCY FERREIRA CASTRO

**Interação entre fungos toxigênicos (*Aspergillus flavus* e
Fusarium verticillioides) e carunchos (*Sitophilus zeamais*) em
amostras de grãos de milho**

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Benedito Corrêa

Versão Original

**São Paulo
2011**

RESUMO

FERREIRA-CASTRO, F. L. **Interação entre fungos toxigênicos (*Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*) e carunchos (*Sitophilus zeamais*) em amostras de grãos de milho.** 2011. 111 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Foi pesquisada a habilidade de carunchos *Sitophilus zeamais* em veicular esporos de *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* e a conseqüente produção de micotoxinas. Grãos de milho foram mantidos em frascos conectados por uma mangueira formando um sistema fechado (lados A e B) e divididos em seis grupos: G1 (milho + caruncho-Lado A); G2 (Milho + *A. flavus* – Lado A); G3 (milho + *A. flavus* + caruncho – Lado A); G4 (milho + *F. verticillioides* – Lado A), G5 (milho + *F. verticillioides* + caruncho – Lado A) e G6 (milho + *A. flavus* + *F. verticillioides* + caruncho – Lado A). O lado B continha grãos estéreis. Após 10, 20 e 30 dias de incubação foram realizadas: pesagem, atividade de água, micobiota, determinação de micotoxinas, análise nutricional, microscopia eletrônica de varredura e *PCR-RT em tempo real*. Frente aos resultados obtidos, constata-se a importância do *Sitophilus zeamais* como vetor de fungos e a importância de boas práticas de manipulação e armazenamento de grãos, visando reduzir os riscos de contaminação e deterioração.

Palavras chave: Milho. *Aspergillus flavus*. *Fusarium verticillioides*. *Sitophilus zeamais*.

Aflatoxinas. Fumonisinias. Interação.

ABSTRACT

FERREIRA-CASTRO, F. L. **Interaction between toxigenic fungus (*Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*) and weevils (*Sitophilus zeamais*) in samples of maize grains.** 2011. 111 p. Ph. D. thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The weevils *Sitophilus zeamais* ability were examined to propagate spores of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* and the production of mycotoxins. Corn grains were conserved in flasks connected by a rubber to form a *closed system* (side A and B) and were divided in to six groups: G1 (corn + weevil- side A); G2 (corn + *A. flavus* – side A); G3 (corn + *A. flavus* + weevil – side A); G4 (corn + *F. verticillioides* – side A), G5 (corn + *F. verticillioides* + weevil – side A) e G6 (corn + *A. flavus* + *F. verticillioides* + weevil – side A). The side B contained sterile grains. After 10, 20 and 30 days of incubation were realized: weighing, activity water, mycoflora, determination of mycotoxins, nutritional analysis, scanning electron microscope and *Real time PCR-RT*. In front of the results were observed the importance of *Sitophilus zeamais* like a fungus vector and the importance of Good Manufacturing Practices and Stores of grains, to reduce the risks of contamination and deterioration.

Keywords: Corn. *Aspergillus flavus*. *Fusarium verticillioides*. *Sitophilus zeamais*. Aflatoxins. Fumonisin. Interaction.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Milho

Antes do descobrimento da América o milho constituía, dentre os vegetais, a base alimentícia dos indígenas que aqui viviam, sendo cultivado desde a Argentina até o Canadá. Logo após a descoberta da América, o milho foi levado para a Espanha, Portugal, França e Itália, onde, a princípio, era cultivado em jardins, como planta exótica e ornamental. Uma vez conhecido seu valor alimentício, passou a ser produzido em escala comercial e difundiu-se para o resto da Europa, Ásia e Norte da África. Hoje é produzido praticamente no mundo todo, exceto nas regiões que apresentam limitações climáticas (MOURA e OLIVEIRA, 1980).

A composição média em base seca do grão é de 72% amido, 9,5% proteínas, 4% lipídeos, 9% fibras, além de minerais (ferro, fósforo, potássio e cálcio) e vitaminas (A e complexo B) (PAES, 2010). Esta constituição faz com que este cereal seja utilizado no preparo de produtos alimentícios diversificados, sendo relevante fator sócio econômico para muitas regiões no mundo (NOGUEIRA JÚNIOR; NOGUEIRA; TSUNECIRO, 1987).

É considerado o terceiro cereal mais cultivado no mundo, seguido do trigo e arroz (FAO, 2008). A produção do milho no Brasil cresce a cada ano, sendo que, na safra 2007/2008, a colheita foi 14% superior à safra 2006/2007 e, atualmente, é considerado o terceiro maior exportador mundial deste grão, estando atrás dos Estados Unidos e China (BRASIL, 2008, 2009). Representa uma das principais culturas da agricultura brasileira, não somente no aspecto quantitativo, como também no que diz respeito à sua importância estratégica por ser base da alimentação animal e, conseqüentemente, humana (OVEJERO et al., 2003).

Esta cultura pode ser afetada por muitos problemas, destacando-se: fertilidade do solo, época de semeadura, potencial produtivo do híbrido e ataque de agentes nocivos como plantas daninhas, pragas e doenças. As principais doenças associadas ao milho, no Brasil, são causadas por vírus, bactérias e fungos, sendo os últimos representados, principalmente pelos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (PEREIRA, 1997; CASA e REIS, 2003).

O crescimento de fungos em grãos durante o desenvolvimento da planta, armazenamento e transporte pode levar a uma série de alterações, dentre as quais se destacam:

redução do poder germinativo, fungos visíveis, descoloração, odores desagradáveis, alterações químicas e nutricionais, queda de qualidade e produção de micotoxinas (SAUER, 1988).

1.2 Micotoxinas

As micotoxinas compreendem um conjunto complexo de substâncias tóxicas produzidas por fungos filamentosos (bolors) que, dependendo da concentração presente nos alimentos e rações, causam graves problemas à saúde humana e animal (MOSS, 1998). O termo micotoxina tem sua origem da palavra grega “mykes”, que significa fungo, e do latim “toxicum”, que significa veneno ou toxina (BULLERMAN, 1979; GOLDBLATT, 1972). Cerca de 400 tipos de micotoxinas são conhecidos, embora, somente algumas delas tenham sido profundamente estudadas (ETZEL, 2002).

O problema da presença de micotoxinas já existia há muito tempo e, provavelmente, vários surtos de micotoxicoses foram confundidos com pragas, envenenamentos e epilepsia. No Antigo Testamento, as 10 pragas do Egito, quando Moisés tentava libertar os hebreus do domínio faraônico, evidenciaram o problema destes metabólitos. Também há indícios na peste que dizimou os rebanhos e induziu tumores e úlceras nos animais e no povo egípcio (SABINO, 2004). Em, 1850, ocorreu o episódio chamado de “Fogo de Santo Antônio”, no qual a ingestão de centeio infectado por *Claviceps purpurea* foi relacionado com característica de ergotismo, levantado a possibilidade do perigo de metabólitos tóxicos produzidos por fungos (SANTURIO, 2000). No Japão, muitas mortes foram associadas à ingestão de arroz contaminado por *Penicillium* spp. (SAITO et al., 1971); e na Rússia, por *Fusarium sporotrichioides*, que causou ulcerações necróticas nos lábios e mucosa oral da população (CAMPBELL e STOLOFF, 1974).

No que se refere às formas de exposição às toxinas, elas ocorrem predominantemente pela ingestão de alimentos contaminados utilizados em dietas, tais como o milho (matéria prima básica na formulação das rações), o amendoim, o trigo, o caroço de algodão e o sorgo, entre outros (CHU, 1991). Desta forma, as micotoxinas podem entrar na dieta humana e animal, por meio de contaminação direta ou indireta destes alimentos. Os fungos produtores de micotoxinas podem crescer e produzir toxinas, seja em produtos agrícolas, no campo, por ocasião do armazenamento, durante o transporte, na industrialização ou ainda em qualquer momento na fase de consumo, desde que as condições de temperatura e de umidade sejam favoráveis (RAMAKRISHNA; LACEY; SMITH, 1991).

Além disso, a contaminação de grãos por micotoxinas pode acarretar perdas substanciais à economia, que são associadas ao impacto para a saúde humana, produtividade animal e/ou bem como também ao comércio internacional destes produtos, pois muitos países estabelecem limites para micotoxinas em alimentos. De acordo com a FAO, as perdas mundiais de alimentos contaminados por micotoxinas estão em torno de 1000 milhões de toneladas por ano (CAST, 2003).

Todavia, as micotoxinas também podem ser benéficas aos seres humanos, como na produção de antibióticos (penicilinas), drogas imunossupressoras (ciclosporinas) e no controle de hemorragias pós-parto e dores de cabeça (alcalóides de Ergot) (ETZEL, 2002).

Considera-se que os três grandes grupos de micotoxinas e seus respectivos fungos produtores podem ser assim distribuídos: (1) Aflatoxinas, metabólitos biossintetizados por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. pseudotamari* e *A. nomius*; (2) Fusariotoxinas, produzidas por espécies do gênero *Fusarium*, cujos principais representantes são a zearalenona, as fumonisinas e os tricotecenos; (3) Ocratoxinas, produzidas por *A. ochraceus* (*A. alutaceus*) e por muitas espécies do gênero *Penicillium* (ETZEL, 2002; MOSS, 1998).

1.2.1 Aflatoxinas

1.2.1.1 Conceitos Gerais

O primeiro relato sobre as aflatoxinas foi realizado por Stevens et al. em 1960, que descreveram a morte de aproximadamente 100.000 perus na Inglaterra, apresentando sintomas típicos de ingurgitamento e congestão renal com hemorragia ou necrose do fígado. O episódio foi atribuído a uma nova doença, denominada por Blount (1961) de “Turkey X Disease”. Verificou-se que o fator comum em todos os surtos era a ingestão de rações contendo farelo de amendoim de procedência brasileira (BLOUNT, 1961; ASPLIN e CARNAGHAN, 1961).

No grupo das aflatoxinas são conhecidas pelo menos 18 substâncias, porém, as mais comuns nos alimentos são as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, de ocorrência natural em vários produtos (SMITH e ROSS, 1991). São designadas conforme a fluorescência que emitem quando expostas à luz ultravioleta (360 nm), sendo que fluorescência azul (blue) é representada pelas aflatoxinas B₁ e B₂, e a fluorescência verde (green) pelas aflatoxinas G₁ e G₂ (HARTLEY e O’KELLY, 1963). As outras aflatoxinas, como M₁, M₂, P₁ e Q₁ e aflatoxicol, ocorrem como produtos do metabolismo fúngico ou da biotransformação hepática (DIENER et al., 1987; SMITH e ROSS, 1991). Quimicamente, as aflatoxinas possuem uma

estrutura policíclica derivada de um núcleo cumarínico, ligado a um sistema bifurânico de um lado e de outro a uma pentona (aflatoxina da série B) ou uma lactona de seis membros (aflatoxinas da série G) (ANEXO A, Fig. A.1) (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 1996).

As aflatoxinas possuem baixo peso molecular, sendo pouco solúveis em água e muito solúveis em solventes moderadamente polares, como clorofórmio, metanol e dimetilsulfóxido. Neste caso, são relativamente sensíveis à luz, particularmente à radiação ultravioleta. Quando secas são estáveis em temperaturas elevadas e o ponto de fusão da AFB₁ é de 269 °C, sendo destruídas por autoclavagem, na presença de amônia e em tratamento com hipoclorito (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1979).

A aflatoxina B₁ constitui em uma das substâncias mais tóxicas, de ocorrência natural, sendo classificadas na classe 1 dos carcinógenos humanos pela International Agency for Research on Cancer (IARC, 2002). A primeira evidência do efeito carcinogênico foi relatada em 1961, quando ratos ingeriram ração contaminada com a toxina em níveis abaixo daqueles que causam sintomas de intoxicação aguda e desenvolveram tumores malignos (LANCASTER; JENKINS; PHILLIPS, 1961).

Desde a descoberta das aflatoxinas muitos países estabeleceram regulamentos para proteger o consumo de alimentos pelo homem e animais (YAMAMOTO, 1997). No Brasil, a presença de aflatoxinas no milho é regulamentada pelo Ministério da Agricultura, através da portaria 183 de 21 de março de 1996 (BRASIL, 1996) e pela resolução nº 274 de 15 de outubro de 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabelecendo o limite máximo de 20 µg/Kg para a somatória das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (BRASIL, 2002).

1.2.1.2 Efeitos biológicos

Os efeitos da exposição às aflatoxinas podem ser agudos ou crônicos, dependendo da dosagem e frequência de exposição, podendo ser letal aos animais. A exposição por longos períodos leva à incidência de tumores em várias espécies animais (CAST, 2003).

A aflatoxina B₁ representa a mais tóxica de todas as aflatoxinas e quase todas as informações sobre a bioatividade das aflatoxinas em animais focam essa micotoxina (COULOMBE, 1991).

As aflatoxinas, individualmente ou em mistura, induzem toxicidade aguda e crônica em animais, agindo também como carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas e supressoras do sistema imune (NEWBERNE e BUTLER, 1969; BILGRAM e SINHA, 1992; YOSHIKAWA, 1997). Estes efeitos dependem primariamente do sistema testado, dose e

frequência de exposição. A sensibilidade às aflatoxinas varia conforme a espécie, idade e sexo do animal, bem como a composição da dieta, a rota da ingestão e o estado nutricional (BILGRAM e SINHA, 1992; BULLERMAN, 1979; YOSHIZAWA, 1997).

Todas aflatoxinas possuem efeito carcinogênico (LEGATOR, 1966), sendo que a aflatoxina B₁ é especialmente relacionada à hepatocarcinogênese (BENNET e FRENHOLZ, 1978). A aflatoxina B₁ é considerada uma das substâncias mais carcinogênicas conhecidas, sendo também a mais comumente encontrada em alimentos contaminados com aflatoxinas (SHARMA e SALUNKE, 1991; ZERINGUE; BHATNAGAR; CLEVELAND, 1993).

A ingestão de aflatoxinas pode levar a um quadro de intoxicação aguda ou crônica, dependendo da concentração ingerida. Seus efeitos toxicológicos ocorrem somente após ativação metabólica de suas moléculas pelas enzimas hepáticas (HUSSEIN e BRASEL, 2001).

Os sinais clínicos da aflatoxicose em diversas espécies animais incluem falta de apetite, perda de peso, anormalidade neurológica, icterícia da membrana mucosa, diarreia sanguinolenta, convulsões e morte. Os danos no fígado são evidentes, apresentando palidez ou descoloração com necrose, aumento de tamanho e acúmulo de gordura. Também há acúmulo de fluidos na cavidade do corpo e hemorragia dos rins e trato intestinal. Exposição crônica sub letal resulta em icterícia na carcaça e cirrose com proliferação do ducto biliar e fibroses. Exposições prolongadas de baixos níveis resultam em tumores no fígado em várias espécies, sendo a truta a mais sensível (BULLERMAN, 1979; SMITH e HENDERSON, 1991; BILGRAMI e SINHA, 1992).

A ação tóxica e carcinogênica da AFB₁ está relacionada com a sua conversão em um ou mais metabólitos em vários tecidos do animal exposto. A maior parte da conversão da AFB₁ é catalizada pela citocromo P450 presente no fígado e outros tecidos; esta conversão também pode ocorrer via reações de cooxidação pela prostaglandina H sintetase (COULOMBE, 1991). Ligações extra DNA são formadas quando a AFB₁ se liga a resíduos de guanina de sequências alternadas G-C do DNA. Isso pode levar a mutações com alteração de estrutura causadas pela interação da AFB₁ ativada, podendo gerar transversões G-C para A-T (YU; BENDER; GERONIMO, 1990; COULOMBE, 1991; BILGRAMI e SINHA, 1992). A forma ativada da AFB₁ induz a expressão de vírus e a formação de tumor associado a oncogenes em rãs (BILGRAMI e SINHA, 1992).

1.2.1.3 Generalidades sobre o fungo *A. flavus*

O gênero *Aspergillus* foi inicialmente descrito em 1729 pelo botânico Pier Antonio Michelli, no entanto, Johann Heinrich Friedrich Link em 1809 foi o primeiro a definir o gênero de forma clara (MACKENZIE, 1988; SMITH e ROSS, 1991). Com o advento da microscopia óptica, em 1856, Rudolf Virchow apresentou as características micromorfológicas de *Aspergillus* spp. associado a lesões pulmonares em papagaios, falcões e no homem (MACKENZIE, 1988; BENNETT, 2009).

Aspergillus é um gênero composto por mais de 180 espécies anamórficas aceitas com o telemorfismo descrito em nove gêneros diferentes (PITT e SAMSOM, 2000). Este gênero é dividido em 7 subgêneros, que são posteriormente divididos em seções (KLICH, 2002). Embora o gênero contenha mais de 260 espécies já estudadas por vários séculos, sua sistemática ainda está em estado de fluxo sempre evoluindo (SAMSOM e VARGA, 2009). O gênero é facilmente identificado pelas características do conidióforo, mas a identificação das espécies e diferenciação é complexa, sendo tradicionalmente realizada através das características morfológicas (RODRIGUES et al., 2007).

Macroscopicamente, as colônias pertencentes ao gênero *Aspergillus* caracterizam-se pelo desenvolvimento de colônias coloridas e brilhantes. As colônias de *A. flavus* são caracteristicamente verdes a amarelo-oliva, embora eventualmente possam apresentar coloração amarelo puro, tornando-se acinzentadas com a idade (ANEXO A, Figura A.2-1) (GEISEN, 2000).

Os conidióforos de *A. flavus* e *A. parasiticus* surgem a partir de hifas vegetativas septadas. As fiálides podem surgir diretamente de uma vesícula globosa (condição unisseriada) ou a partir da métula que envolve a superfície da vesícula (condição bisseriada). A vesícula, a métula quando presente, as fiálides, e as cadeias de conídios compreendem a cabeça conidial, que no *A. parasiticus* é predominantemente unisseriada, enquanto que no *A. flavus*, a seriação é mais variável (KOKALIS-BURELLE et al., 1997). Este gênero é conhecido por produzir conídios em cabeças do tipo escovão e são amplamente distribuídos pelo mundo (ANEXO A, Fig. A.2-2) (PITT e HOCKING, 1997).

A. flavus se desenvolve bem em substratos oleaginosos, aumentando o nível de produção de aflatoxinas. Também são encontrados, com menor frequência, em substratos ricos em amido, como o milho, podendo produzir aflatoxinas (LACEY e MAGAN, 1991; XAVIER et al., 1991; POZZI et al., 1995; CASTRO; SOARES; FURLANI, 1995).

Umidade relativa do ar entre 80% e 90% e temperatura acima de 25 °C favorecem o desenvolvimento de *A. flavus*, caracterizando-o como fungo de armazenamento. Todavia, esta classificação não é apropriada para regiões tropicais, pois esta espécie também pode ser isolada de grãos provenientes do campo durante o desenvolvimento da planta (CHRISTENSEN e SAUER, 1982; CAST, 2003). Em geral, o desenvolvimento ótimo dos fungos ocorre em temperaturas entre 25 °C e 30 °C (CARLILE e WATKINSON, 1994), sendo que o crescimento do *A. flavus* ocorre a uma temperatura ótima de 35 °C (ANEXO B, Quadro B.2).

A atividade de água (Aa) de um alimento é descrita por Taniwaki e Silva (2001), refletindo a quantidade de água livre disponível, ou seja, a água não comprometida com ligações químicas, dissolução de solutos e outros. A facilidade com que a porção fracamente ligada pode ser removida depende do conteúdo de água no substrato (LACEY, 1988). Os valores de atividade de água oscilam entre 0 e 1, sendo 1 o valor encontrado na água pura (ANEXO B, Quadro B.3). Todos os fungos toxigênicos apresentam valores mínimo, ótimo e máximo para seu crescimento (JAY, 1994) sendo que a maioria cresce a uma Aa de 0,85 (TANIWAKI e SILVA, 2001). Os fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* requerem valores mínimos de Aa entre 0,76 e 0,94, conforme a espécie (ANEXO B, Quadro B.4).

A contaminação por fungos do gênero *Aspergillus* e a produção de aflatoxinas nos campos de colheita está frequentemente associada aos danos causados por insetos e ao “stress” da planta (RICHARD et al., 1993). A espécie *A. flavus* destaca-se por ser a mais importante produtora destas micotoxinas, sendo capaz de sintetizar as aflatoxinas B₁ e B₂ (PITT e HOCKING, 1997).

1.2.2 Fumonisinias

1.2.2.1 Conceitos Gerais

As fumonisinias, descobertas em 1988, constituem um grupo de micotoxinas estruturalmente relacionadas, produzidas por espécies do gênero *Fusarium*, principalmente *Fusarium verticillioides* (= *F. moniliforme*) e *F. proliferatum*, fungos amplamente distribuídos na natureza, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical (BEZUIDENHOUT et al., 1988).

Até o presente momento, 28 diferentes moléculas análogas às fumonisinias (FB) foram descritas. Destas, as fumonisinias B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) e B₃ (FB₃) são produzidas naturalmente. A FB₁ é a mais importante do grupo, constituindo, aproximadamente, 70% do total de fumonisinias (ANEXO A, Fig. A.3). No que diz respeito às concentrações de FB₂ e de FB₃, elas são menores que as de FB₁, contribuindo com cerca de 15 a 30% das toxinas do grupo (SHEPHARD et al., 1996; PITTET, 1998; REEDHER; MARASAS; VISMER, 2002).

As fumonisinias são compostos fortemente polares, solúveis em água, porém apresentam maior solubilidade em acetoneitrila-água ou metanol e insolúveis em solventes orgânicos. Não absorvem luz visível ou ultravioleta, portanto não são fluorescentes, requerendo derivação química para sua detecção (SCOTT, 1995; MURPHY et al., 1996).

As análises de ressonância nuclear magnética e espectrometria de massa revelaram que a fumonisina B₁ é um diéster de propano 1, 2, 3 - ácido tricarbóxico e 2 - amino -12, 16 dimetil - 3, 5, 10, 14, 15 -pentahidroxicosano em que nos C₁₄ e C₁₅ os grupos hidroxilas são esterificados com o grupo carboxiterminal de propano 1, 2 3 - ácido tricarbóxico (BEZUIDENHOUT et al., 1988).

Os limites legais para contaminação por fumonisinias ainda não foram estabelecidos, porém, o “Mycotoxin Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians” recomenda valores máximos de 5, 10, 50 e 50 mg/Kg para rações de equinos, suínos, bovinos e de aves, respectivamente (MUNKVOLD e DESJARDINS, 1997). No caso dos produtos destinados ao consumo humano, a “Food and Drug Administration” (FDA) recomenda níveis máximos de 2,0 mg/kg de fumonisinias (FB₁ + FB₂ + FB₃) para farelo de milho; 3,0 mg/kg, para milho de pipoca e 4,0 mg/kg ao milho destinado à produção de massas. Na Suíça, propõe-se limite de tolerância de 1 mg/Kg, na somatória de FB₁ e FB₂, para derivados de milho destinado ao consumo humano (VISCONTI e BOENKE, 1995).

1.2.2.2 Efeitos Biológicos

A ocorrência natural de fumonisinas em milho e subprodutos tem sido relacionada aos problemas na saúde de animais e humanos que consumiram produtos contaminados (REDDY et al., 1996).

Diversos estudos realizados demonstram que a FB₁ é a principal causa de síndrome neurotóxica, em eqüinos, a Leucoencefalomálica - LEME (BULLERMAN, 1996; KELLERMAN et al., 1990; MALLMANN; SANTURIO; DILKIN, 1999; MARASAS, 1995; NELSON; DESJARDINS; PLATTNER, 1993; NORRED e VOSS, 1994), o hidrotórax e edema pulmonar em suínos – EPS (BULLERMAN, 1996; DILKIN et al., 2003; MARASAS, 1995; NELSON; DESJARDINS; PLATTNER, 1993; NORRED e VOSS, 1994; OSWEILER et al., 1992; ROTTER et al., 1996), imunodepressão em aves, nefrose em ovinos, trombose cardíaca em babuínos, arterosclerose em primatas não humanos, toxicose em peixes (HIROOKA, 1996). Em ratos alimentados com milho contaminado com fumonisinas, os órgãos alvo são o fígado e os túbulos renais proximais (NORRED, 1992). A FB₁ é responsável pelos efeitos hepatocarcinogênicos e hepatotóxicos em ratos (GELDERBLOM et al., 1991). Uma dieta contendo 50 mg/Kg de FB₁, administrada em ratos durante 26 meses, resultou em hepatocarcinoma celular e nefrite crônica (NAIR, 1998). A diminuição do peso dos rins, a indução de apoptose, a hiperplasia de ductos biliares e de células hepáticas e renais de ratos foram demonstradas por Tolleson et al. (1996). Em aves há relatos de redução no desenvolvimento, problemas cardíacos, imunossupressão, degeneração e necrose hepática (LEDOUX et al., 1992), sendo que patos jovens são mais susceptíveis quando comparados a frangos e perus; contudo, nas três espécies já foram relatadas alterações cardíacas e hepáticas (NORRED e VOSS, 1994). Má formação, mortalidade embrionária e reabsorção fetal foram descritas por Floss et al. (1994) em hamsters sírios inoculados com FB₁ e FB₂.

As fumonisinas parecem ter uma afinidade por fígado e rins, e demonstram um rápido acúmulo de resíduos em dietas contendo 2 a 3 ppm de FB₁ (PRELUSKY et al., 1996).

Esta toxina, classificada no grupo 2B, segundo a IARC – International Agency for Research on Cancer (IARC, 2002), também já foi associada a casos de incidência de câncer esofágico em humanos, na África do Sul, na China, no nordeste da Itália e no sudeste dos Estados Unidos (BULLERMAN, 1996) e há uma forte correlação entre câncer de esôfago – CE, milho e subprodutos contaminados com *F. verticillioides* (HIROOKA, 1996; NAIR, 1998; REEDHER et al., 1992). Contudo outros fatores, como o fumo, álcool, dieta e

condições ambientais, podem estar envolvidos na etiologia da doença; estudos recentes revelam que as fumonisinas podem responder por uma parcela da responsabilidade (NORRED e VOSS, 1994). Entretanto o CE não foi reproduzido em modelos animais infectados com cultura de *F. verticillioides* ou FB₁ pura (MARASAS, 1995).

Segundo Merrill, Liotta e Riley (1996), o mecanismo de carcinogenicidade das fumonisinas ainda não é conhecido, contudo sabe-se de a FB₁ não é genotóxica. A citotoxicidade pode estar envolvida, já que os promotores de tumores geralmente são tóxicos para células normais. Tolleson et al. (1996), demonstraram aumento da apoptose em cultura de células, oriundas do epitélio esofágico de humanos, tratadas com FB₁. Huang et al. (1995) revelaram que a FB₁, em cultura de células de fígado de macaco verde, reduziu a expressão da proteína quinase. Os autores sugeriram que a habilidade da FB₁ em alterar sinais de transdução é um caminho pelo qual pode ocorrer a carcinogênese.

Em estudo sobre os efeitos toxicológicos “in vitro” das fumonisinas, Norred et al. (1992) concluíram que as fumonisinas são potentes inibidoras da biossíntese de esfingolípídeos (ANEXO A, Figura A.4). Estes são responsáveis por uma série de funções, incluindo a comunicação célula-célula, crescimento, diferenciação, transformação celular (NORRED et al., 1992), morte celular (apoptose e necrose) e respostas imunes (RILEY et al., 1998). Apesar do mecanismo de ação das fumonisinas ainda não ser perfeitamente conhecido, a semelhança estrutural destas toxinas com as bases esfingóides livres, em particular a esfinganina (ANEXO A, Figura A.5), levou alguns autores a formularem a hipótese de que o mecanismo de ação das fumonisinas poderia estar relacionado à inibição ou à quebra do metabolismo dos esfingolípídeos. Esta inibição, que ocorre na enzima ceramida sintetase, resulta no aumento dos níveis das bases esfingóides (esfinganina e esfingosina) no soro de animais expostos à toxina (ENONGENE et al., 2000).

Em 2000, Enongene observou inibição da ceramida sintetase em camundongos inoculados com FB₁, via subcutânea, bem como aumento de esfinganina nos rins, fígado e células epiteliais. Shephard et al. (1996), além da esfinganina, verificou um aumento de esfingosina no soro e na urina de primatas não humanos submetidos a uma alimentação contendo $\leq 1\%$ da cultura de *F. moniliforme*, em um período de 106 meses.

A descoberta de que as fumonisinas são inibidoras específicas da enzima envolvida no metabolismo de esfingolípídeos tem levantado a possibilidade de se utilizar esta micotoxina como terapêutico em doenças que envolvam defeitos no metabolismo de esfingolípídeos, como no caso da doença de Farber's (NORRED et al., 1992) e doença de Niemann-Pick (NAIR, 1998).

1.2.2.3 Generalidades sobre o fungo *Fusarium verticillioides*

Fusarium verticillioides é o mais prevalente fungo associado com alimentos pertencentes à dieta humana e animal, em especial milho e subprodutos (NELSON, 1992). São cosmopolitas e tem grande importância por serem toxigênicos (NELSON; TOUSSOUN; MARASAS, 1983).

A publicação de Wollenweber & Reinking, em 1935, foi o mais importante trabalho clássico, organizando as espécies de *Fusarium* em 16 seções, que incluem 65 espécies, 55 variedades e 22 formas. As espécies do gênero *Fusarium* são muito variáveis devido a sua composição genética e variações em sua morfologia, decorrentes de alterações no meio ambiente (NELSON; TOUSSOUN; MARASAS, 1983). A mutação das culturas pode ocorrer quando o fungo se desenvolve em meios ricos em carboidratos, como no caso do ágar dextrose batata (PDA); os “mutantes” podem sofrer alterações o micélio, perda da virulência ou mesmo da capacidade de produzir micotoxinas (NELSON, 1992).

De acordo com o sistema taxonômico de Nelson, Marasas e colaboradores, além da espécie *F. verticillioides*, seis espécies do gênero *Fusarium* tem sido reportadas como produtoras de fumonisinas: *F. anthophilum*, *F. dlamini*, *F. napiforme*, *F. nygamai*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* (NELSON; DESJARDINS; PLATTNER, 1993). Além da fumonisina, outras micotoxinas podem ser produzidas pela espécie *F. verticillioides*, tais como, ácido fusárico, fusarinas, giberelinas e moniliformina (NELSON, 1992).

F. verticillioides é um nome que tem sido atribuído a um grupo de 6 espécies biológicas, “mating populations”, que se apresentam como *Gibberella fujikoi* quando no estágio teleomórfico (estágio sexual). Dois destes grupos, denominados, “A” e “D”, são reconhecidos como produtores de fumonisinas. Cepas pertencentes ao grupo “A” crescem de forma endofítica em grãos de milho e compreendem mais de 90% dos isolados de *Fusarium* encontrados em grãos de milho aparentemente sadios (LESLIE, 1996); além disso, podem ser considerados os mais importantes produtores de fumonisinas, devido a sua associação com grãos de milho e sorgo e sua habilidade de produzir altas concentrações de fumonisinas em grãos de milho (DESJARDINS; PLATTNER; PROCTOR, 1996). A infecção pode ocorrer através de fissuras ou buracos no pericarpo¹ do milho, ou mesmo no momento da emergência das sementes, resultando em infecção sistêmica (NELSON, 1992).

¹ Pericarpo: parede do grão; o pericarpo comporta, nos frutos bem desenvolvidos, três partes de dentro para fora: endocarpo, mesocarpo e epicarpo (FERREIRA, 1986).

F. verticillioides é o mais prevalente fungo associado aos alimentos pertencentes à dietas humana e animal, em especial milho e subprodutos (NELSON, 1992).

Para se obter o melhor crescimento das culturas de *F. verticillioides*, a temperatura de incubação não deve ser superior a 32 - 37 °C, nem inferior a 2,5 - 5 °C (PIT e HOCKING, 1997). A faixa ótima de crescimento fica entre 22 e 28 °C (ANEXO B, Quadro B.5). A atividade de água (Aa), além de exercer grande influência no desenvolvimento fúngico, também tem importante participação na produção de fumonisinas; é necessária uma Aa superior a 0,87 para que ocorra o desenvolvimento do fungo e superior a 0,90 para a produção de fumonisinas (ANEXO B, Quadro B.6) (LEITÃO, 1988; LACEY et al., 1991; CAHAGNIER; MELCION; RICHARD-MOLARD, 1995).

As colônias gigantes de *F. verticillioides*, em PDA, apresentam inicialmente micélio aéreo branco, crescem rapidamente e freqüentemente tornam-se roxas. Esporodóquios² podem estar presentes ou ausentes, e quando presentes variam de castanho a alaranjado. O esclerócio³ pode também se desenvolver e geralmente apresentam coloração azul escuro, podendo ser abundantes e modificando a coloração da superfície das colônias. O verso apresenta uma coloração roxa escura (ANEXO A, Figura A.6 -1) (NELSON; TOUSSOUN; MARASAS, 1983).

Microscopicamente diferenças no formato dos *macroconídeos*⁴ representam o centro de identificação de muitas espécies de *Fusarium*, contudo há outras características que auxiliam na diferenciação das espécies (ANEXO A, Figura A.6-2) (LESLIE; ZELLER; SUMMERELL, 2001).

O *F. verticillioides* apresenta raros macroconídeos, em forma de foice reta, com superfície ventral e dorsal quase paralela, e paredes finas e delicadas. Os *microconídeos*⁵ são abundantes; a princípio são unicelulares, apresentando o formato de bastão oval, com extremidades afiladas. São formados em longas cadeias e em falsas cabeças (NELSON; TOUSSOUN; MARASAS, 1983).

² Esporodóquios: estroma ou massa de hifas entrelaçadas em forma de almofada, coberto por conidióforos com conídios apicais (LACAZ et al., 1998).

³ Esclerócio: são massas firmes constituídas de hifas, com ou sem presença de tecido hospedeiro, geralmente globosos, distituídos de esporos em seu interior (LACAZ et al., 1998).

⁴ Macroconídeo: o maior entre dois diferentes tamanhos de conídios produzidos por um fungo (LACAZ et al., 1998).

⁵ Microconídeo: o menor entre dois conídios de tamanhos diferentes produzidos por um único fungo (LACAZ et al., 1998).

1.3 Carunchos

A qualidade dos grãos de milho é dada pela aparência, uniformidade, condições sanitárias, status nutricional e características industriais. Danos causados por insetos, fungos ou manipulação inadequada resultam em perdas de qualidade e/ou quantidade (KENKEL et al., 1997).

Os principais prejuízos causados por pragas são: perda de peso e desvalorização comercial, perda do valor nutritivo dos grãos alimentícios (CAMPOS, 2005), perda do poder germinativo das sementes (CANEPPELE et al., 2003), deterioração dos grãos pela atividade dos insetos, provocando emboloramento pela condensação da umidade (CAMPOS, 2005) e contaminação dos alimentos pela penetração de outros organismos (ácaros e fungos) através de aberturas deixadas pelos insetos (BETI; PHILLIPS; SMALLEY, 1995).

Dentre as pragas dos grãos, os carunchos (gorgulhos) *Sitophilus zeamais* e *S. oryzae* apresentam-se entre as mais importantes, sendo o primeiro de maior ocorrência na cultura do milho (ROSSETO, 1969). Essa praga é tão nociva ao milho que, quando o ataque atinge a ordem de 25,9%, de perda de peso, o valor nutricional do milho é praticamente nulo (IRABAGON, 1959).

Os carunchos (pertencentes a ordem Coleóptera, família Curculionidae) são pequenos besouros que possuem alta capacidade de reprodução e conseguem facilmente penetrar na massa dos grãos. São classificados como pragas primárias, onde o adulto rompe a película protetora dos grãos e deposita um ovo no interior do mesmo; posteriormente a cavidade é coberta por uma substância gelatinosa, selando o ovo no grão. Os ovos eclodem em aproximadamente seis dias, as larvas se alimentam no interior do grão e só o deixam quando atingem a fase adulta (ANEXO A, Figura A.7) (BORROR e DELONG, 1988).

As larvas apresentam canibalismo sobre os indivíduos fracos ou pequenos; como resultado, raramente emerge mais que um indivíduo adulto de um simples grão de trigo ou arroz, enquanto dois ou três podem emergir de um único grão de milho. O desenvolvimento completo é possível em temperaturas compreendidas entre 15 °C e 35 °C, e levam 35 dias em condições ótimas, que são 27 °C, 70% UR. Em grãos com teor de umidade abaixo de 13%, aumenta a mortalidade; os ovos não são geralmente colocados em grãos com umidade abaixo de 10%. O desenvolvimento é acelerado em grãos com teor de umidade entre 14 e 16% (NEWMAN, 1927).

Ao se alimentar, o adulto deixa típicos orifícios nos grãos, primeiro sinal de infestação. Frequentemente causam quase completa destruição dos grãos em armazéns, navios ou em lugares onde as condições são favoráveis ao seu desenvolvimento (NEWMAN, 1927).

A espécie *S. zeamais* é a mais importante e tem preferência por grãos de milho (CAMPOS, 2005). Os adultos desta espécie são caracterizados por apresentar cabeça projetada à frente dos olhos, formando um *rostro*⁶ bem definido e, na sua extremidade, encontra-se um aparelho bucal mastigador. O abdômen é coberto por *élitros*⁷, que variam da cor café a negro e medem de 2,5 a 4 mm de comprimento (NEWMAN, 1927).

Gallo et al. (2002) descreveu os principais parâmetros biológicos do *S. zeamais*, são eles: período médio de pré oviposição de 6 dias; número médio de ovos por fêmea de 282; período médio de oviposição de 104 dias; média de 3 ovos/fêmea/dia; longevidade das fêmeas de 140 dias; longevidade dos machos de 142 dias; período médio de emergência de ovo a adulto de 34 dias; viabilidade do ovo a adulto de 27%.

1.4 Interações

Os fungos estão sempre presentes nos grãos armazenados, constituindo, juntamente com os insetos, as principais causas de deteriorações e perdas constatadas durante o armazenamento. A infestação de insetos provoca danos ao tegumento dos grãos, produz gás carbônico (CO₂) e água (H₂O), contribuindo para o aumento do teor de umidade que, por sua vez aumenta a respiração dos grãos e, conseqüentemente, a temperatura, facilitando a multiplicação dos fungos (SANTOS, 2006).

Os danos provocados por insetos nos grãos ocorrem devido a alimentação e oviposição. Ambas ações destroem o pericarpo, ou envelope do grão, permitindo a entrada de fungos. Muitas espécies de insetos escavam grandes porções do endosperma ou cotilédones, a fim de se alimentar, promovendo uma área adicional para o crescimento de estruturas fúngicas. As espécies de carunchos de armazenamento, *S. granarius* (L), *S. oryzae* (L) e *S. zeamais* Motschulsky, promovem o crescimento e a disseminação de fungos de armazenamento na massa de grãos provavelmente pela combinação da inoculação de esporos durante a oviposição e atividades metabólicas e alimentação das larvas (DUNKEL, 1988).

⁶ *Rostró*: Aparelho bucal, em Hemiptera, constituído por um tubo articulado (lábio inferior), que se encerra aos estiletos; (2) extensão rígida da cabeça, em forma de bico, em Coleoptera (JAHNE et al., 2007)

⁷ *Élitro*: asa anterior de Coleoptera (JAHNE et al., 2007).

Dix (1988) relatou carunchos *S. zeamais* naturalmente contaminados com esporos de *Aspergillus flavus* dentre outras espécies fúngicas de importância econômica (por exemplo, *Penicillium* spp.) em grãos de milho. Segundo o autor, esses carunchos contaminados com esporos de *A. flavus* foram hábeis em carrear os esporos sem sofrer por uma aflatoxicose, o que leva a crer que grãos livres de contaminação fúngica em locais que existam carunchos podem facilmente ser contaminados com *A. flavus* e aflatoxinas.

Lillehoj et al. (1980) descreveram a ocorrência de aflatoxinas em amostras de milho contaminadas com *A. flavus*. Segundo os pesquisadores houve um aumento dos níveis de aflatoxinas nas amostras que apresentaram danos causados por insetos. Um estudo semelhante foi realizado por Beti, Phillips e Smalley (1995), onde foi comparada a produção de aflatoxinas em amostras de milho contaminadas com *A. flavus* e milho contaminado com *A. flavus* e *S. zeamais*. Os resultados demonstraram que os carunchos favoreceram o crescimento fúngico e produção da micotoxina, devido a uma maior área susceptível ao desenvolvimento fúngico e ao aumento da umidade em decorrência da atividade metabólica dos carunchos.

A interação entre fungos toxigênicos com outras espécies de insetos também está descrita na literatura. Franzolin et al. (1999), estudaram a habilidade de ácaros *Tyrophagus putrescentiae* em propagar esporos de fungos *A. flavus* de um lote de milho contaminado para um lote esterilizado. Os resultados confirmaram a eficiência dos ácaros em carrear esporos de *A. flavus*.

1.5 Radiação Ionizante

A atividade das pragas no substrato deprecia o produto visualmente e aceleram a sua deterioração. Ingram e Farkas (1977) relatam que a utilização da radiação gama isoladamente ou associada a outras técnicas, em muitos casos, podem desinfestar produtos de origem vegetal.

A irradiação de alimentos, nos dias atuais, contribui imensamente no controle dos perigos microbiológicos (AN-HUNG; SEBRANEK; MURANO, 1995). Pode ser empregado para inibir o brotamento de tubérculos e raízes, retardar o amadurecimento e a deterioração de frutas, retardar a senescência de flores, promover a radiodesinfestação (insetos) e a radiodesinfecção (patógenos) e esterilizar embalagens. Em tecnologia de alimentos se preconiza a consonância de técnicas para preservação de alimentos e, neste sentido, a irradiação é um processo que pode ser empregado isoladamente ou conjuntamente com outras

tecnologias, tais como resfriamento, aquecimento, congelamento e embalagem (WIENDL, 1997).

As radiações (partículas ou não) 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 rádio, TV, microondas, radiação infravermelha, luz visível) 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. Nem todos os tipos de radiação são adequados para a irradiação de alimentos, porque não tem penetração suficiente no material (por exemplo: partículas alfa).

O Comitê da Junta de Especialistas sobre Irradiação de Alimentos (formado pelos seguintes órgãos das Nações Unidas: FAO, AIEA e OMS e o Codex Geral de Padrões para Alimentos Irradiados) fazem a seguinte recomendação sobre os tipos de radiação ionizante, considerados adequados para a irradiação de alimentos (DIEHL, 1992; FAO/ IAEA, 1982):

- Radiação gama originados dos seguintes radionuclídeos: Cobalto 60 (^{60}Co) e Césio (^{137}Cs).
- Raios-X com energias de até 5 MeV.
- Elétrons com energias de até 10 MeV.

Os isótopos liberam radiação gama constantemente e não podem ser “ligados ou desligados” como uma máquina de raio X. No entanto, a radiação gama tem sido utilizada para esterilizar alimentos e equipamentos médicos previamente acondicionados, e equipamentos comerciais (ANEXO A, Figura A.8) tem sido projetados com essa finalidade (PELECZAR JR; CHAN; KRIEG, 1996).

Os *radioisótopos*⁸ tipicamente usados na obtenção de radiação gama são o cobalto-60 (^{60}Co) e o césio-137 (^{137}Cs). O ^{60}Co é produto de reatores nucleares usados para produção de eletricidade. É formado quando o ^{59}Co absorve naturalmente um nêutron adicional, criando

⁸ Radioisótopos: é um nuclídeo (átomo caracterizado pelo número de prótons e nêutrons no núcleo) radioativo, ou seja, aquele que emite radiação espontaneamente (OKUNO, 1998).

assim o radioisótopo ^{60}Co . Devido ao decaimento do radioisótopo, é necessário, periodicamente, reabastecer o radioisótopo para manter sua capacidade (DIEHL, 1995).

O ^{60}Co é mais comumente usado na indústria para a esterilização por sua disponibilidade e a radiação gama oriunda do Cobalto-60 tem como vantagem alta penetrabilidade e uniformidade da dose (permitindo tratar produtos de diferentes tamanhos e formatos), alta disponibilidade de fontes deste material e baixo risco ambiental associado, como por exemplo, uma meia vida de 5,3 anos (JARRETT, 1982).

Os alimentos são dispostos em caixas de alumínio e, em seguida, colocados no interior do irradiador. A radiação gama proveniente do ^{60}Co penetra no alimento e em sua embalagem porém, a maior parte dela, simplesmente passa através do produto, similar às microondas, sem deixar resíduos (SPOLAORE; GERMANO; GERMANO, 2003). Os alimentos irradiados com raios gama emitidos por uma fonte de ^{137}Cs ou ^{60}Co não se tornam radioativos (OKUNO, 1998).

O parâmetro utilizado para se mensurar a radiação se fundamenta na quantidade de energia depositada no material irradiado, referida como dose absorvida. A unidade de dose de absorção adotada é o gray (Gy), onde 1 Gy é equivalente à absorção de 1 joule/Kg (DIEHL, 1992).

Quando a radiação ionizante é absorvida em materiais biológicos, ocorre uma possibilidade de atuar diretamente sobre alvos críticos da célula. As moléculas de ácido nucléico podem ser ionizadas ou excitadas e, por meio disso, iniciar a cadeia de eventos que induzem a mudança biológica e a morte celular, se a mudança é suficientemente séria. Este é o *efeito direto da radiação*, o qual é o processo dominante quando esporos (microorganismos formadores de esporos) são irradiados. Alternativamente, a radiação pode interagir com outros átomos ou moléculas no interior da célula, particularmente água, e produzir radicais livres, os quais podem se difundir extensivamente, atingindo e danificando o DNA. Este *efeito indireto* da radiação é importante em células vegetativas, cujos citoplasmas contêm cerca de 80% de água (DIEHL, 1995).

Segundo Corre 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 de DNA (quando não existe um sistema de reparação adequado), paralisação da síntese de proteína, quando o RNA mensageiro reencontra um códon radiomodificado, para o qual não existe um RNA de transferência. Enfim todos estes

processos têm como consequência a inibição da reprodução e crescimento dos microorganismos.

A dose capaz de eliminar a microflora natural de uma espécie de pimenta (*Piper guineense*) foi investigada por Onyenekwe, Ogbadu e Hashimoto (1997). Foram isolados fungos dos gêneros *Fusarium* e *Aspergillus*, e bactérias dos gêneros *Clostridium*, *Staphylococcus* e *Bacillus*. As doses utilizadas variaram de 2,5 a 10 kGy. A alta incidência de *Fusarium* spp. em amostras tratadas com 5 kGy foi justificada por sua maior resistência aos efeitos da radiação quando comparadas com os demais contaminantes do condimento. Concluíram então que, doses de 10 kGy foram necessárias para total descontaminação do condimento, sem alterar seus valores nutricionais.

Amostras de trigo e farinha de trigo foram coletadas em mercados no Egito e foram submetidas à análise quanto à presença de micotoxinas (desoxinivalenol-DON, zearalenona-ZEA e toxina T-2), produzidas por fungos do gênero *Fusarium*, e quanto ao uso de radiação gama como medida de controle na produção de micotoxinas. Doses de 6 kGy foram satisfatórias na eliminação da flora fúngica presente nas amostras. Uma redução nas concentrações de DON, ZEA e toxina T-2 foram observadas em doses de 4 kGy, porém a eliminação completa das micotoxinas foi obtida em doses de 8 kGy (Aziz; Attia; Farag, 1997).

Aziz e Moussa (2002), analisando micotoxinas em frutas, revelaram a ocorrência de ácido penicílico, patulina, ácido ciclopiazônico, citrina, ocratoxina A e aflatoxina B₁. As frutas foram irradiadas com doses de 1,5 e 3,5 kGy, onde foi verificado um decréscimo na contagem do número de células viáveis fúngicas e, em doses de 5 kGy, as micotoxinas não foram detectadas.

Ferreira- Castro et al. (2007) e Aquino et al. (2005) empregaram doses de 20 kGy em amostras de milho eliminando, assim, possíveis contaminantes, em estudo sobre os efeitos da radiação em amostras de milho contaminadas com *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus flavus*, respectivamente.

1.6 PCR em Tempo Real

Técnicas baseadas na análise molecular tem sido utilizadas com êxito na identificação de espécies fúngicas e na detecção de genes responsáveis pela biossíntese de micotoxinas. Alguns autores citam a utilidade destas técnicas para a identificação de fungos, como Patiño et al. (2004) e Jurado et al. (2005) que utilizaram as regiões IGS (*Inntergenic Spacer Region*) e ITS (*Internal Transcribed Spacer Sequence*) do DNA para a identificação de *Fusarium* spp. O uso da técnica de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism*) para a identificação de espécies e verificação da variabilidade genética entre populações fúngicas tem demonstrado grande repetibilidade e eficiência (LESLIE e SUMMERELL, 2006; CHULZE et al., 2000; LEE; LIOU; YUAN, 2004, ABD-ELSALAM et al., 2003).

Dentre as técnicas atualmente utilizadas na detecção de genes responsáveis pela produção de micotoxinas, inclui-se o seqüenciamento, que analisa as seqüências de bases nitrogenadas presentes nos genes, podendo identificar mutação em apenas uma única base. Entretanto, essas mutações podem ser silenciosas, podendo não afetar a estrutura do aminoácido ou a atividade da proteína produzida (ZAHA, 1996).

A complexidade na correlação entre as seqüências de DNA e os níveis de produção de micotoxinas contribuiu para o desenvolvimento de técnicas para análise da expressão dos genes envolvidos na biossíntese de micotoxinas. Dentre estas, destacam-se os microarranjos de DNA (*Microarrays*) e a PCR em tempo real (*Real Time PCR*) (MAYER; FABER; GEISEN, 2003). Segundo López-Errasquín et al. (2007), a detecção e quantificação da expressão de genes reguladores da biossíntese de micotoxinas constitui-se de uma ferramenta importante para o estudo da capacidade genética do fungo em produzir diferentes níveis destas toxinas. Sabe-se que diversos fatores bióticos e abióticos podem influenciar fortemente a produção de micotoxinas, assim, a análise da expressão gênica também pode contribuir para a identificação de fatores que possuem preponderância na produção dessas toxinas (NICHOLSON et al., 2003). Neste sentido, a PCR em tempo real tem sido utilizada amplamente, pois garante rapidez e elevada especificidade, além de propiciar a quantificação da expressão dos genes analisados (MAYER; FABER; GEISEN, 2003; LOPÉZ-ERRASQUIN et al., 2007).

1.6.1 Genes relacionados à produção de aflatoxinas

Estudos extensivos em bioquímica e genética tem permitido a compreensão dos processos moleculares da biossíntese das aflatoxinas, envolvendo 25 genes agrupados em uma região do DNA com 80 kb, próxima ao telômero no cromossomo três (PAYNE et al., 2006; GALLO et al., 2010).

Existem dois genes regulatórios presentes no *cluster* responsável pela produção de aflatoxinas que apresentam um papel essencial. Estes, *AflR* e *AflS*, estão situados adjacentes um em relação ao outro com promotores distintos. O gene *AflR* codifica uma proteína binuclear de zinco ($Zn(II)_2Cys_6$), que se liga à uma sequência promotora específica do DNA, atuando como regulador transcricional de muitos genes estruturais presentes no *cluster*, como *AflE*, *AflC*, *AflJ*, *AflM*, *AflK*, *AflP* e *AflG* (CHANG et al., 1993; CHANG et al., 1995). O gene *AflS* codifica uma proteína que interage com o gene *AflR*, com função de acentuar a expressão dos genes estruturais regulados por *AflR* (CHANG, 2003; GALLO et al., 2010).

A produção de aflatoxinas não é regulada apenas por fatores transcricionais específicos ao *cluster*, existe também um mecanismo de controle global relacionado aos metabólitos secundários fúngicos em geral. O outro, considerado epigenético, é capaz de regular múltiplos processos fisiológicos em resposta ao meio ambiente e fatores nutricionais, como pH, temperatura, luz, fonte de carbono e nitrogênio (GEORGIANNA e PAYNE, 2009; SCHMIDT-HEYDT et al., 2009).

A proteína LaeA, por exemplo, é responsável pela regulação da produção de penicilina e lovastatina por *A. nidulans*. A interrupção deste gene resulta em baixos níveis de metabólitos secundários em *Aspergillus* spp., reduzindo a produção de aflatoxinas por *A. flavus* em função da diminuição da expressão de *AflR* (BOK e KELLER, 2004; KALE et al., 2008).

A luz atua no controle epigenético, exercendo função na expressão do gene regulatório *AflR*. O gene *veA*, necessário para a formação dos esclerócios, codifica um proteína denominada Velvet A (Vea) que influencia na expressão de *AflR*. A presença de luz vermelha ou branca inibe o gene *veA*, diminuindo a produção de micotoxinas, enquanto a luz azul a estimula. A interrupção de *veA* em *A. flavus* demonstrou que os níveis de expressão de *AflR* diminuem na ausência deste gene (GEORGIANNA e PAYNE, 2009).

O estudo dos genes envolvidos na produção de aflatoxinas continua em evolução, principalmente no que se concerne a compreensão dos mecanismos de regulação global, que além de influenciar na biossíntese das aflatoxinas, influenciam no metabolismo secundário fúngico como um todo, apresentando interações extremamente complexas (GEORGIANNA e PAYNE, 2009).

1.6.2 Genes relacionados à produção de fumonisinas

Os genes relacionados à produção de fumonisinas estão localizados no cromossomo 1 de *Gibberella moniliformis* (anamorfo de *F. verticillioides*), formando um grupo (*cluster*) de 15 genes (XU e LESLIE, 1996; PROCTOR et al., 1999; SEO; PROCTOR; PLATTNER, 2001; JURGENSON; ZELLER; LESLIE, 2002).

O gene *FUM1* codifica uma poliketídeo sintetase que cataliza o primeiro passo da biossíntese das fumonisinas. A interrupção deste gene resulta na redução de mais de 99% da produção de fumonisinas na cultura.

O gene *FUM3* produz uma dioxigenase que catalisa a oxigenação do carbono 5; *FUM6* possui elevada similaridade com membros da enzima citocromo P450 monooxigenase, ligada a uma P450 redutase NADPH dependente. *FUM8* codifica uma proteína semelhante ao grupo das aminotransferases, que catalisa a condensação dos aminoácidos em acetil coenzima A. Os genes *FUM7*, *FUM10*, *FUM11* e *FUM14* estão envolvidos na esterificação do ácido tricarbóxico ou na biossíntese desses grupos presentes na estrutura química das fumonisinas. *FUM13* codifica uma proteína similar às desidrogenases/redutases com cadeia curta, apresentando atividade carbonil redutase. Essa enzima catalisa a redução da carbonila presente no carbono 3 a uma hidroxila. Todos estes nove genes são estritamente ligados à biossíntese das fumonisinas. A interrupção dos mesmos proporciona a interrupção da produção dessas toxinas (DESJARDINS, 2006).

Os genes *FUM12* e *FUM15* codificam monooxigenases do citocromo P450; *FUM17* e *FUM18* codificam fatores que garantem longevidade e podem estar associados à proteção. Os outros genes *FUM11* e *FUM19* codificam transportadores, sendo que a enzima produzida por *FUM19* pode atuar como uma bomba de efluxo, reduzindo a concentração celular de toxinas (PROCTOR et al., 2003; DESJARDINS, 2006).

1.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) consiste de uma coluna óptica, um sistema de vácuo e um sistema eletrônico. Em uma visão moderna da matéria, um átomo consiste de um núcleo pesado carregado positivamente rodeado por um número de orbitais eletrônicos. O elétron, gerado no filamento de tungstênio, pode interagir com o núcleo, dos átomos do material analisado, e pode ser retro-espalhado, com uma energia virtualmente diminuída; ou pode interagir com os elétrons dos orbitais, podendo um elétron ser ejetado de um átomo (este é o elétron secundário). Para restaurar seu *status quo*, o átomo emite seu excesso de energia na forma de um quantum de raio X ou de um fóton de luz. Os elétrons retro-espalhados ou secundários são detectados, convertidos em um sinal elétrico, amplificados e convertidos em imagem em uma tela fluorescente. A preparação das amostras requer desidratação e amostras não condutoras necessitam de cobrimento com uma camada condutora, que normalmente pode ser de ouro ou carbono (WELTON, 1984).

A microscopia eletrônica oferece maior resolução, maior aumento, maior profundidade de campo e maior versatilidade que a microscopia óptica. Para se comparar a MEV à microscopia de luz, é preciso conhecer os fatores que controlam a sua resolução, que é definida como o menor espaço entre dois pontos que podem ser claramente vistos através do microscópio como sendo entidades diferentes. Notar que isto não é necessariamente o menor ponto a ser visto no microscópio, o qual irá sempre ser menor que o limite de resolução.

A óptica do elétron é a mesma da óptica de luz. Para muitos propósitos é adequado pensar na luz como uma radiação eletromagnética com um comprimento de onda λ e de elétrons como partículas sub-atômicas. Ambos os tipos de descrição, onda e partícula, podem ser aplicados tanto para a luz quanto para elétrons: então a luz pode ser descrita, em termos de fótons, como uma radiação de comprimento de onda de 400 a 700 nm, enquanto que os elétrons podem ser considerados uma radiação com comprimento de onda, usual em microscopia, de cerca de 0,001 a 0,01 nm. O comprimento de onda do elétron depende da voltagem aplicada no filamento de tungstênio. Geralmente aplica-se uma voltagem de 15 KeV (GOODHEW e HUMPHREYS, 1988).

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo, é possível confirmar o papel dos carunchos como pragas de grande relevância na agricultura. Em um curto período de incubação (máximo de 30 dias) foram verificadas perdas de peso de até 5%, o que, do ponto de vista comercial, representaria uma perda econômica de grande importância. Além disso, em conformidade com a literatura, também foi observado que o dano mecânico provocado pela ação do caruncho favorece a contaminação por outros microrganismos, neste caso, pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*.

O sistema fechado nos permitiu verificar a veiculação de esporos fúngicos, pela ação dos carunchos, de um lote contaminado artificialmente para um lote esterilizado de milho.

As amostras contaminadas apenas com *Aspergillus flavus* apresentaram aumento progressivo nas concentrações de aflatoxinas no decorrer do período de incubação (Grupo 2). Entretanto, o mesmo experimento, na presença de carunchos (Grupo 3), revelou níveis mais elevados de aflatoxinas. O mesmo perfil foi verificado para as fumonisinas, nos tratamentos envolvendo *F. verticillioides* e carunchos (Grupos 4 e 5).

Na interação entre as duas espécies fúngicas e carunchos (Grupo 6) foi constatado níveis mais elevados de aflatoxinas. Tais resultados, provavelmente, estão diretamente relacionados a competição entre os fungos e a uma maior eficiência dos carunchos em carrear esporos de *A. flavus*.

A análise nutricional nos grãos de milho inoculados e não inoculados com carunchos não revelaram alterações relevantes. Tais achados podem estar relacionados ao baixo número de insetos inoculados e/ou curto período de incubação das amostras.

Na avaliação dos genes envolvidos na produção das micotoxinas foi observada uma correlação inversa entre os níveis de fumonisinas e a expressão dos genes *FUM1* e *FUM19* no decorrer do período de incubação. O mesmo não ocorreu para as aflatoxinas, onde não foi possível realizar nenhuma correlação.

Frente aos resultados obtidos, constata-se a importância de *Sitophilus zeamais* (principal caruncho isolado no milho) como vetores de fungos toxigênicos e a importância de boas práticas de manipulação e armazenamento de grãos, visando a sua conservação e minimização de riscos de contaminação e deterioração.

REFERÊNCIAS⁹

ABD-ELSALAM, K .A. et al. Use of AFLP fingerprinting to analyze genetic variation within and between populations of *Fusarium* spp. Derived from Egyptian cotton cultivars. **J. Plant Pathol.**, v. 85, n. 2, p. 99-103, 2003.

ALMEIDA FILHO, A. J.; FONTES, L. S.; ARTHUR, V. Determinação da perda de peso do milho (*Zea mays*) provocada por *Sitophilus oryzae* e *Sitophilus zeamais*. **Ecosistema**, v. 27, n. 1,2, Jan-Dez, 2002.

AN-HUNG, Fu; SEBRANEK, J. G.; MURANO. E. A. Survival of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* and quality attributes of cooked pork chops and cured ham after irradiation, Reprinted from **J. Food Sci.**, v. 60, n. 5, p. 1001-1005,1008, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS INTERNATIONAL. **AOAC Official Method 991.31**: Aflatoxin in Corn, Raw Peanuts, and Peanut Butter: immunoaffinity column (aflatest) method. Washington, DC, 2000. p. 49.2.18.

AQUINO, S. et al. Evaluation of viability of *Aspergillus flavus* and aflatoxins degradation. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 36, p. 352-356, 2005.

ASPLIN. F. D.; CARNAGHAN, R. B. A. The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens. **Vet. Rec.**, v.73, n. 46, p. 1215-1219, 1961.

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

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

⁹ De acordo com:

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

BENNET, J. W. *Aspergillus*: a primer for the novice. **Med. Mycol.**, v. 47, p. S1-S8, 2009.

BETI, J. A.; PHILLIPS, T. W., SMALLEY, E. B. Effects of maize weevils (Coleóptera: Curculionidae) on production of aflatoxin B1 by *Aspergillus flavus* in stored corn. **J. Econ. Entomol.**, v. 88, n. 6, p. 1776-1782, Dec. 1995.

BERJAK, P. Stored seeds: the problem caused by microorganisms (with particular reference to the fungi). In: NASSER, L. C.; WENTZEL, M. M.; FERNANDERS, J. M. (Eds.) **Seed Pathology International**. Advanced Course. Brasília, D.F.: Abrates, 1987. p. 38-50.

BEZUIDENHOUT, S. C. et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **J. Chem. Soc. Chem. Commun.**, v. 11, p. 743-745, 1988.

BILGRAMI, K. S.; SINHA, K. K. Aflatoxins: their biological effects and ecological significance. In: **Handbook of applied mycology**: mycotoxins in ecological systems. New York: Marcel Dekker, 1992, v. 5, p. 59-78.

BLOUNT, W. P. Turkey "X" Disease. **Turkeys**, v. 9, n. 2, p. 52-67, 1961.

BOK, J. W.; KELLER, N. P. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. **Eukaryotic Cell**, v. 3, p. 572-535, 2004.

BORROR, D. J.; DELONG, D. M. **Introdução ao estudo dos insetos**. São Paulo. Ed. Edgard Blücher Ltda, 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 183, de 21 de março de 1996. Art 1. Adotar regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho, aprovada pela resolução do Grupo Mercado Comum do Sul nº 56/94, de 01 de janeiro de 1995. **Diário Oficial da União**, Brasília. DF, 25 mar 1996.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 274, de 15 de outubro de 2002. Aprova o regulamento técnico sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim e no milho. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 de outubro de 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Companhia Nacional do Abastecimento (CONAB). Avaliação da safra 2007/2008. 2008. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php>>. Acesso em: 12 maio 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Companhia Nacional do Abastecimento (CONAB). Monitoramento da safra de grãos do Brasil, 2009/2010 – Terceiro Levantamento – Dezembro/2009. 2009. Disponível em: <<http://conab.gov.br/conabweb/index.php>>. Acesso em: 19 jan. 2010.

BULLERMAN, L. B. Significance of mycotoxins to food safety and human health. **J. Food Prot.**, v. 42, n. 1, p. 65-86, 1979.

BULLERMAN, L. B. Occurrence of *Fusarium* and fumonisins on food grains and in foods. **Adv. Envir. Med. Biol.**, v. 32, p. 27-38, 1996.

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. **Appl. Microbiol.**, v. 20, p. 274-251, 1995.

CAMPBELL, C.; STOLOFF, L. Implication of mycotoxins for human health. **J. Agric. Food Chem.**, v. 22, p. 1006-1015, 1974.

CAMPOS, T. B. Pragas em grãos armazenados. In: REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO - Pragas Agroindustriais. **Anais**, p. 93, Ribeirão Preto, São Paulo: , 2005.

CANEPPELE, M. A. B. et al. Correlation between the infestation level of *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleóptera, Curculionidae) and the quality factors of stored corn, *Zea mays* L. (Poaceae). **Rev. Bras. Entomol.**, v. 47, n. 4, p. 625-630, 2003.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. **The Fungi**. Londres: Academic Press, 1994.

CASA, R. T.; REIS, E. M. Doenças na cultura do milho. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO, D. Neto (Eds) **Milho: estratégias de manejo e alta produtividade**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Departamento da Produção Vegetal, 2003. p. 1-18.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (CAST). **Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems**. Task Force Report, Ames, Iowa, USA, n. 139, 2003.

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

CHANG, P. K. et al. Cloning of the *Aspergillus parasiticus* *apa-2* gene associated with the regulation of aflatoxin biosynthesis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 3273-3279, 1993.

CHANG, P.K. et al. Increased expression of *Aspergillus flavus* *AflR*, encoding a sequence-specific DNA-binding protein, relieves nitrate inhibition of aflatoxin biosynthesis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 2372-2377, 1995.

CHANG, P. K.; The *Aspergillus parasiticus* protein AFU interacts with the aflatoxin pathway-specific regulator AFLR. **Mol. Genet. Genom.**, v. 268, p. 711-19, 2003.

CHRISTENSEN, C. M.; SAUER, D. B. Mycoflora. In: CHRISTENSEN, C. M. (Ed). **Storage of cereal grains and their products**. Minnesota: American Association of Cereal Chemists, 1982. p. 219-240.

CHU, F. S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potencial and preventive measures. **Mutat. Res.**, v. 259, n. 3-4, p. 291-306, 1991.

CHULZE, S. N. et al. Genetic variation in *Fusarium* section *Liseola* from no-till maize in Argentina. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 66, p. 5312-315, 2000.

CORRE, F. L.; VENAILLE, L. Tratamientos con radiaciones ionizantes In: BOURGEOIS, C. M.; MESCLE, J. F.; ZUCCA, J. **Microbiología Alimentaria 1: Aspectos Microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria**. España: Acribia, 1988. Cap. 4, p. 357-381.

COULOMBE, R. A. Aflatoxins. In: SHARMA, R. P.; SALUNKHE, D. K. (Ed) **Mycotoxins and Phytoalexins**. London: CRC Press, 1991. p. 103-144.

CUNNIF, P. (Ed.) **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16. ed. Arlington, V. A. AOAC International, 1998.

DESJARDINS, A. E. ***Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics and biology**. Minnesota: APS Press, 2006.

DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D.; PROCTOR, R. H. Genetic and biochemical aspects of fumonisin production. In: JACKSON, L.; DEVRIES, J.W.; BULLERMAN, L.B.

(Ed.) **Fumonisin in Food**: Advances in Experimental Medicine and Biology, New York: Plenum Press, 1996. v. 392, Chapter 15, p. 165-173.

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

DIEHL, J. F. **Safety of irradiated foods**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1995.

DIENER, U. L.; COLE, R. J.; SANDERS, T. H.; PAYNE, G. A.; LEE, S. L.; KLICH, M. L. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v. 25, p. 249 – 270, 1987.

DILKIN, P. et al. Toxicological effects of chronic low doses of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁-containing *Fusarium moniliforme* culture material in weaned piglets. **Food Chem. Toxicol.**, v. 41, p. 1345-1353, 2003.

DIX, D. E. Interactive Bionomies of the Maize Weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, and *Aspergillus flavus* Link. Ph.D. Tesis, University of Georgia, Athens, GA, 129p. In: DUNKEL, F.V. The relationship of insects to the deterioration of stored grain by fungi. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 7, p. 227-244, 1988.

DUNKEL, F. V. The relationship of insects to the deterioration of stored grain by fungi. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 7, p. 227-244, 1988.

ENONGENE, E. N. et al. Disruption of sphingolipid metabolism in small intestines, liver and Kidney of mice dosed subcutaneously with fumonisin B₁. **Food Chem. Toxicol.**, v. 38, p. 793-799, 2000.

ETZEL, R. A. **Mycotoxins**. JAMA, v. 287, n. 4, p. 425-427, Jan. 2002.

FANDOHAN, P et al. Impact of indigenous storage systems and insect infestation on the contamination of maize with fumonisins. **African J. Biothechnol.**, v. 5, n. 7, p. 546-552, Apr. 2005.

FERREIRA, A. B. de H. **Novo Dicionário da Língua Portuguesa**. 2. ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1986. 1838p.

FERREIRA-CASTRO, F. L. et al. Effects of gamma radiation on maize samples contaminated with *Fusarium verticillioides*. **Appl. Rad. Isotopes**, v. 65, p. 927-933, 2007.

FLOSS, J. L. et al. Developmental toxicity of fumonisin in Syrian hamsters. **Mycopathologia**, v. 128, p. 33-38, 1994.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO)/ International Agency of Energy Atomic (IAEA) – **Training Manual on Food Irradiation Technology and Techniques** – 2nd ed. Vienna: IAEA, 1982.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) – **The state of food agriculture**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2008.

FOOD QUALITY CONTROL. **Primary pests of cereals**.

Available from:

<<http://foodquality.wfp.org/FoodSafetyandHygiene/PestManagement/tabid/263/Default.aspx?PageContentID=187>>. Acesso em: 25 Abr. 2011.

FRANZOLIN, M. R. et al. Interaction between toxigenic *Aspergillus flavus* Link and mites (*Tyrophagus putrescentiae* Schrank) on maize grains: effects on fungal growth and aflatoxin production. **J. St. Prod. Res.**, v. 35, n. 3, p. 215-224, 1999.

GALLO, D. et al. **Entomologia Agrícola**. São Paulo: FEALQ, 2002. 920 p.

GALLO, A. et al. Analysis of genes early expressed during *Aspergillus flavus* colonization of hazelnut. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 137, p. 111-115, 2010.

GEDERBLOM, W. C. A. et al. Toxity and carcinogenity of the *Fusarium moniliforme* metabolite fumonisin B₁ in rats. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 4, p. 1247-1251, 1991.

GEISEN, R. PCR Methods for detection of Mycotoxin – producing Fungi. In: BRIDGE, P.D.; ARORA, D.K.; REDDY, C.A.; ELANDER, R.P. (Eds). **Applications of PCR in mycology**. 2nd ed. UK, Cambrige: University Press, 2000. p. 242-263.

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

GIZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Exp. Hematol.**, v. 30, p. 503-512, 2002.

GOLDBLATT, L.A. Implications of mycotoxins. **Clin. Toxicol.**, v. 5, p. 453-458, 1972.

GOODHEW, P. J.; HUMPREYS, F. J. **Electron Microscopy and Analysis**. London: Taylor e Francis, 1988..

HARTLEY, R. D.; O' KELLY, J. Toxicity and fluorescence properties of aflatoxins. **Nature**, v. 196, p. 1001, 1963.

HIROOKA, E. Y. et al. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Addit. Contam.**, v. 13, p. 173-183, 1996.

HUANG, C. et al. Repression of protein kinase C and stimulation of cyclic AMP response elements by fumonisin, a fungal encoded toxin which is a carcinogen, **Cancer Res.**, v. 55, p. 1655-1659, 1995.

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

INGRAM, M.; FARKAS, J. Microbiology of foods pasteurised by ionising radiation. **Acta Aliment.**, v. 6, p. 123-184, 1977.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans and their supplements: a complete list, v. 82, some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, International Agency for Search on Cancer, World Health Organization; Lyon, France, 2002.

IRABAGON, T. A. Rice weevil damage to stored corn. **J. Econ. Entomol.**, v. 52, n. 5, p. 155-156, 1959.

JAHNE, S. M.; DEL PONTE, E. M.; COLPO, J. F. **Glossário de entomologia** - Laboratório Biologia, ecologia e Controle biológico de Insetos, UFRGS. 2007.

Disponível em: <<http://www6.ufrgs.br/agronomia/fitossan/entomologia/index.php>>.

Acesso em: 20 mar. 2011.

JARRETT, R. D. Isotope (gamma) radiation sources. In: JOSEPHSON, E. S.; PETERSON, M. S. (Ed.) **Preservation of food by ionizing radiation**. Boca Ratón: CRC Press, 1982. v. 1. p. 137-163.

JAY, J. M. **Microbiologia Moderna de los Alimentos**. 3. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994.

JURADO, M. et al. PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. **Syst. Appl. Microbiol.** v. 28, p. 562-568, 2005.

JURGENSON, J. E.; ZELLER, K. A.; LESLIE, J. F. Expanded genetic map of *Giberella moniliformis* (*Fusarium verticillioides*). **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 1972-1979, 2002.

KALE, S.P. et al. Requirement of LaeA for secondary metabolism and sclerotial production in *Aspergillus flavus*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 45, p. 1422-1429, 2008.

KELERMAN, T. S. et al. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B₁. Onderstepoort **J. Vet. Res.**, v. 57, n. 4, p. 269-275, 1990.

KENKEL, P. et al. Biological preservation of grain quality; losses in storage and handling. In: STEELE, J. L.; CHUNG, O. K. (Ed.) **Proceedings of International Wheat Quality Conference**, Manhattan, Kansas, USA: Grain Industry Alliance, May. 1997.

KLICH, M. A. **A identification of common *Aspergillus* Species**. Netherlands: CBS, 2002.

KOKALIS-BURELLE, N. et al. **Compendium of peanut diseases**. 2nd ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1997.

LACAZ et al. **Guia para a identificação de fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo: Savier, 1998. 497 p.

LACEY, J. Water availability and occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in stored products. In; **International Iupac Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**, 6. Anais, Tokio, 1988. p. 186-189.

LACEY, J. Pre-and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. **J. Appl. Bact. Supp.**, v. 67, p. 11-25, 1989.

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

LACEY, J. et al. Grain fungi. In: DILIP, K. et al. (Ed). **Handbook of Applied Mycology: foods and feeds**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 121-77.

LANCASTER, M. D.; JENKINS, F. D.; PHILLIPS, J. M. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. **Nature**. v. 192, p. 1095-1096, 1961.

LEDOUX, D. R. et al. Fumonisin toxicity in broile chicks. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 4, n. 3, 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.

LEGATOR, M. Biological effects of aflatoxin in cell culture. **Bacteriol. Ver.**, v. 30, p. 471-477, 1966.

LEITÃO, M. F. Microbiologia dos Alimentos. In: ROTTMAM, I. et al. **Tratado de Microbiologia**. São Paulo:Manole, 1988. p. 1-81.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* Laboratory Manual**. Iowa: Blackwell Publishing, 2006.

LESLIE, J. F. Introductory biology of *Fusarium moniliforme*. In: JACKSON, L.; DEVRIES, J. W.; BULLERMAN, L. B. (Ed.) **Fumonisin in Food: Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 392, New York: Plenum Press, 1996. Chapter 14, p. 153-164.

LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; SUMMERELL, B. A. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. **Physiol. Molec. Plant Pathol.**, v. 59, p. 107-117, 2001.

LILLEHOJ, E.B. et al. Aflatoxin Contamination of Preharvest Corn: Role of *Aspergillus flavus* Inoculum and Insect Damage. **Cereal Chem.**, v. 57, n. 4, p. 255-257, 1980.

LÓPEZ-ERRASQUÍN, E. et al. Real-time RT-PCR assay to quantify the expression of *fum1* and *fum19* genes from the fumonisin-producing *Fusarium verticillioides*. **J. Microbiol. Meth.**, v. 68, p. 312-317, 2007.

MACKENZIE, D. W. R. Reynote lecture: *Aspergillus* in man. In: VANDEN BOSSCHE, H. et al. (Ed.). ***Aspergillus and Aspergilosis***. New York: Plenum Press, 1988. p. 332.

MALLMANN, C. A.; SANTURIO, J. M.; DILKIN, P. Equine leukoencephalomalacia associated with ingestion of corn contaminated with fumonisin B₁. **Rev. Microbiol.**, v. 30, p. 249-252, 1999.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e Micotoxicoses em suínos**. Santa Maria: Santa Maria, 2007.

MARASAS, W. F. O. Fumonisin: their implications for human and animal health. **Nat. Toxins**, v. 3, p. 193-198, 1995.

MAYER, Z.; FÄRBER, P.; GEISEN, R. Monitoring the production of aflatoxin B₁ in wheat by measuring the concentration of *nor-1* mRNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 2, p. 1154-1158, 2003.

MERRILL, A. H.; LIOTTA, D. C.; RILEY, R. T. Fumonisin: fungal toxins that shed light on sphingolipid function. **Cell. Biol.**, v. 6, p. 218-233, June 1996.

MORENO, E. C. et al. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. **Food Chemistry**, v. 116, p. 220-226, 2009.

MOURA, P. A. M.; OLIVEIRA, A. C. S. Aspectos econômicos da cultura do milho. **Inf. Agropec.**, v. 6, n. 72, p. 3-5, 1980. Suppl.

MOSS, M. O. Recent studies of mycotoxins. **J. Appl. Microbiol.**, v. 84, n. 27, p. 62S-76S, 1998. Suppl.

MUNKVOLD, G. P.; DESJARDINS, A. E. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence?. **Plant Disease**, v. 81, p. 556-565, 1997

MURPHY, P. A. et al. Effect of processing on fumonisin content of corn. In: JACKSON, L.; DEVRIES, J. W.; BULLERMAN, L. B. (Ed.) **Fumonisin in Food: Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York: Plenum Press, 1996. v. 392, Chapter 28, p. 323-334.

NAKAI, V. K. et al. Distribution of fungi and aflatoxins in stored peanut variety. **Food Chem.**, v. 106, p. 285-290, 2008.

NAIR, M. G. Fumonisin and human health. **Ann. Trop. Paediatr.**, v. 18, p. S47-S52, 1998.

NELSON, P. E.; DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D. Fumonisin, mycotoxin produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 31, p. 233-252, 1993.

NELSON, P. E. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**. v. 117, n. 1-2, p. 29-36, 1992.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium* Species: an illustrated manual for identification**, Pennsylvania: University Press, 1983.

NEWBERNE, P. M.; BUTLER, W. H. Acute and chronic effects of aflatoxins on the liver of domestic and laboratory animals: a review. **Cancer Res.**, v. 29, p. 236-250, 1969.

NEWMAN, L. J. Grain weevils (*Calandra oryzae* e *C. granaria*). **J. Agricult.**, Oxford, v. 4, p. 538-545, 1927.

NICHOLSON, P. et al. Molecular tools to study epidemiology and toxicology of *Fusarium* head blight of cereals. **Eur. J. Plant Pathol.** v. 109, p. 691-703, 2003.

NOGUEIRA-JUNIOR, S.; NOGUEIRA, E. A.; TSUNECHIRO, A. **Considerações sobre a agroindústria do milho**. São Paulo: Instituto Agronômico de Agricultura, 1987. v. 27, p. 1-18. Relatório de Pesquisa.

NORRED, W. P.; VOSS, K. A. Toxicity and role of fumonisin in animal diseases and human esophageal cancer. **J. Food Protect.**, v. 57, n. 6, p. 522-527, 1994.

NORRED, W. P. et al. In vitro toxicology of fumonisin and the mechanistic implications. **Mycopathologia**, v. 117, p. 73-78, 1992.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996.

OKUNO, E. **Radiação: Efeitos, riscos e benefícios**. São Paulo: Harbra, 1998.

ONYENEKWE, 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.

OSWEILER, G. D. et al. Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with fumonisins in corn screenings. **J. Vet. Diag. Invest.**, v. 4, n. 1, p. 53-59, 1992.

OVEJERO, R. L. et al. Manejo de plantas daninhas na cultura do milho. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO, D. Neto. (Ed.) **Milho: estratégias de manejo e alta produtividade**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Departamento de produção vegetal, 2003. p. 47-49.

PAES, M. C. D. **Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho**. Circular Técnica, n. 75, p. 1-6, 2010. Disponível em:

<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2006/circular/Circ_75.pdf>.

Acesso em: 06 jun. 2010.

PATIÑO, B. et al. PCR detection assay of fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* strains. **J. Food Protect.**, v. 67, n. 6, p. 1278-1283, 2004.

PAYNE, G.A. et al. Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*. **Medical Mycol.**, v. 44, p. 9-11, 2006.

PELECZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Controle de Microorganismos: Fundamentos e Agentes Físicos. In:_____. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. I, Cap. 7, p. 198-200.

PEREIRA, O. A. P. Doenças do milho. In: KIMATI, H. et al. (Ed.) **Manual de fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 538-555.

PESTKA, J. J.; ABOUZIED, M. N.; SUTIKNO, T. Immunological assays for mycotoxin detection. **Food Technol.**, v. 2, p. 120-128, 1995.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. **Nucl. Ac. Res.**, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

PITT, J. I.; SAMSOM, R. A. In: SAMSOM, R. A.; PITT, J. I. (Ed.) **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. Hardwood: Academic Publishers Reading, 2000. p. 51-72.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. Gaithersburg: Aspen Pub., Inc., 1997.

PITTET, A. Natural occurrences of mycotoxins in food and feeds- an updated review. **Rev. Med. Vet.**, v. 149, n. 6, p. 479-492, 1998.

POZZI, C. R. et al. Post- harvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxins occurrence. **Food Add. Cont.**, v. 12, p. 313-319, 1995.

PRELUSKY, D. B. et al. Biological fate of fumonisins B₁ in food-producing animals.. In: JACKSON, L.; DEVRIES, J. W.; BULLERMAN, L. B. (Ed) **Fumonisin in Food: Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York: Plenum Press, 1996. v.392, Chapter 23, p. 265-278.

PROCTOR, R. H. et al. A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. **Fungal Genet. Biol.**, v. 27, p. 100-112, 1999.

PROCTOR, R. H. et al. Co-expression of 15-contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene in *Gibberella fujikuroi*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 38, p. 237-249, 2003.

RAMAKRISHNA, N.; LACEY, J.; SMITH, J. E. Effect of surface sterilization, fumigation and gamma irradiation on the microflora and germination of barley seeds. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 13, p. 47-54, 1991.

REDDY, R. V. et al. Developmental effects of fumonisin B₁ in mice. **Mycopathologia**, v. 134, p. 161-166, 1996.

REEDHER, J. P. et al. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkey. **Phytopathology**, v. 82, n. 3, p. 353-357, 1992.

REEDHER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; VISMER, H. F. Production of fumonisins analogs by *Fusarium* species. **Appl. Env. Microbiol.**, v. 68, n. 5, p. 2101-2105, May 2002.

RICHARD, J. L. et al. Analysis of naturally occurring mycotoxins in feedstuffs and food. **J. Anim. Sci.**, v. 71, p. 2563-2574, 1993.

RILEY, R. T. et al. Fumonisin: mechanism of mycotoxicity. **Rev. Med. Vet.**, v. 149, n. 6, p. 617-626, 1998.

ROCHA, L. O. et al. Mycoflora and Co-Occurrence of Fumonisin and Aflatoxins in Freshly Harvested Corn in Different Regions of Brazil **Int. J. Mol. Sci.**, v. 10, p. 5090-5103, 2009.

RODRIGUES, P. et al. Identification and characterization of *Aspergillus flavus* e aflatoxins. In: MENDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**. [S. l.]: Formatex, 2007. p. 527-534.

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

ROSSETTO, C. J. O complexo de *Sytophilus* spp.(Coleoptera, Curculionidae) no Estado de São Paulo. **Bragantia**, v. 28, p. 127-148, 1969.

ROTTER, B. A. et al. Response of growing swine to dietary exposure to pure fumonisin B₁ during an eight-week period: growth and clinical parameters. **Nat. Toxins**, v. 4, p. 42-50, 1996.

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. Suppl.

SABINO, M. Retrospectiva e situação atual das micotoxinas. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, XI, 2004, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba: Laboratório de Micotoxinas, LAN/ESALQ-USP, 2004. p. 10-12.

SAITO, M. et al. Yellowed rice toxins. In: CIEGLER, A.; KADIS, S.; AHL, S. J. (Eds.). **Microbial Toxins, a Comprehensive Treatise: Fungal Toxins**. London: Academic Press, 1971. v. 6, p. 299-380.

SAMSOM, R. A.; VARGA, J.; "What is a species in *Aspergillus* ?. **Med. Mycol.**, v. 47, p. 13-20, 2009.

SANCHIS, V. et al. Mycotoxins-producing fungi isolated from bin-stored corn. **Mycopathologia**, v. 80, p. 89-93, 1982.

SANTOS, J. P. **Controle de pragas durante o armazenamento de milho.** EMBRAPA: Circular técnica: 84, 2006. p. 1679-1150.

SANTURIO, J. M. Micotoxinas e micotoxicoses na aviculture. **Rev. Bras. Cienc.**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2000.

SAUER, D. B. Effects of fungal deterioration on grain: nutritional, value, toxicity, germination. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 7, p. 267-275, 1988.

SCHMIDT-HEYDT, M. et al. Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 135, p. 231-237, 2009.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. **Nature Protocols**, v. 3, p. 1101-1108, 2008.

SCOTT, P. M. Mycotovin methodology. **Food Add. Contam.**, v. 12, n. 3, p. 395-403, 1995.

SEO, J. A.; PROCTOR, P. H.; PLATTNER, R. D. Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 34, p. 115-165, 2001.

SHARMA, R. P.; SALUNKHE, D. K. Introduction of mycotoxins. In: SHARMA, R. P.; SALUNKHE, D. K. (Ed.). **Mycotoxins and Phytoalexins.** London: CRC Press, 1991. p. 775.

SHEPHARD, G. S. et al. Disruption of sphingolipid metabolism in non-human primates consuming diets of fumonisin-containing *Fusarium moniliforme* culture material. **Toxicon**, v. 34, n. 5, p. 527-534, 1996. Suppl.

SINHA, K. K.; SINHA, A. K. Effect of *Sytophilus oryzae* infestation on *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination in stored wheat. **J. Stored Prod. Res.**, v. 28, n. 3, p. 211-219, 1992.

SMITH, J. E.; HENDERSON, R. S. **Mycotoxins and animal foods.** London: CRC Press, 1991.

SMITH, J. E.; ROSS, I. C. The toxigenic *Aspergillus*. In: SMITH, J. E.; HENDERSON, R. S. (Ed.). **Mycotoxins and Animal Foods**. London: CRC Press, 1991. p. 31-61.

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. 2. ed. São Paulo: Varela, 2003.

STEVENS A. J. et al. Investigations into diseases of turkey poults. **Vet. Rec.**, v. 72, n. 31, p. 627-628, 1960.

SYDENHAM, E. N. et al. Liquid chromatographic determination of fumonisin B₁, B₂ e B₃ in corn: AOAC- IUPAC collaborativy study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. In.**, v. 79, p. 688-699, 1996.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. D. A. **Fungos em Alimentos: ocorrência e detecção**. Campinas: Núcleo de Microbiologia/ITAL, 2001. 82 p.

TARÍN, A.; ROSSEL, 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.

TOLLESON, W. H. et al. The mycotoxin fumonisin induces apoptosis in cultured human cells and in livers and kidneys of rats. . In: JACKSON, L.; DEVRIES, J. W.; BULLERMAN, L. B. (Ed.) **Fumonisin in Food: Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York: Plenum Press, 1996. v. 392, Chapter 21, p. 237-250.

VILELA, H. et al. Alterações do valor nutritivo do grão de milho (*Zea mays*, L) durante o armazenamento. **Rev. Bras. Zoot.**, v. 17, n. 5, p. 428-433, 1988.

VISCONTI, A.; BOENKE, A. Improvement of the determination of fumonisins (FB₁ e FB₂) in maize and maize-based feeds **European Commission BCR Information – Chemical Analysis**. Brussels: Belgium. 1995.

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. Cont.**, v. 84, n. 6, p. 1828-1837, 2001.

VITAL, M. V. C. et al. Insetos em experimentos de ecologia de populações: um exemplo de abordagem didática. **Acta Scient. Biol. Sci.**, v. 26, n. 3, p. 287-290, 2004.

WELTON, J. E. **SEM Petrology Atlas**, Oklahoma: The American Association of Petroleum Geologists, 1984.

WIENDL, F. M.. Irradiação de alimentos. **Biológico**, v. 59, n. 1, p. 75-76, 1997.

WINSTON, P. W.; BATES, D. H. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. **Ecology**, v. 41, n. 1, p. 232-236, 1960.

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

XAVIER, J. G. et al. Equine leukoencephalomalacia: Report of five cases. **Brazil. J. Vet. Res. Animal Sci.**, v. 28, p. 185-189, 1991.

XU, J. R.; LESLIE, J. F. A genetic map of *Gibberella fujikuroi* mating A (*Fusarium moniliforme*). **Genetics**, v. 143, p. 175-189, 1996.

YAMAMOTO, K. Sampling for aflatoxin analysis. In: **TEXBOOK for group training course in mycotoxin inspection food**. Japan: JICA, 1997. p. 8. 1-8, 53.

YOSHISAWA, T. General View on Mycotoxins. In: **TEXBOOK for group training course in mycotoxin inspection food**. Japan: JICA, 1997. p. 5. 1-5, 22.

YU, F. L.; BENDER, W.; GERONIMO, H. Base and sequence specificities of aflatoxin B1 binding to single and double-stranded DNAs. **Carcinogenesis**, v. 11, p. 475-478, 1990.

ZAHA, A. **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996.

ZERINGUE JR, 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.