

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.

**São Paulo
2011**

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**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Castro, Fabiane Lucy Ferreira.

Interação entre fungos toxigênicos (*Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*) e carunchos (*Sitophilus zeamais*) em amostras de grãos de milho / Fabiane Lucy Ferreira Castro. – São Paulo, 2011.

Orientador: Benedito Corrêa.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Micotoxinas.

Versão do título para o inglês: Interaction between toxigenic fungus (*Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*) and weevils (*Sitophilus zeamais*) in samples of maize grains.

Descritores: 1. Milho 2. *Aspergillus flavus* 3. *Fusarium verticillioides* 4. *Sitophilus zeamais* 5. Aflatoxinas 6. Fumonisinias I. Corrêa, Benedito II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB061/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Fabiane Lucy Ferreira Castro.

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

Orientador(a): Benedito Corrêa.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

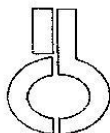
Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail:

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 150, referente ao projeto intitulado "*Estudo da interação entre fungos *Aspergillus glavus*, *Fusarium verticillioides* e carunchos *Sitophilus zeamais**" sob a responsabilidade de Fabiane Lucy Ferreira Castro, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEP SH - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 08 de maio de 2006.

Prof. Dr. MARÍLIA C.L. SEELAENDER
Coordenadora da CEEA - ICB/USP

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da CEP SH - ICB/USP

Ao meu eterno amor Ricardo pelo seu apoio incondicional e a
minha princesa Marjorie, luz da minha vida.

Aos meus pais Paulo e Aurora pela educação, apoio e exemplo de
vida.

Meus sogros Juan e Cleide pelo amor e carinho a mim dedicados.

Ao meu irmão Fábio, cunhados, cunhadas e sobrinhos pelo
carinho.

Amo todos vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Benedito Corrêa, mais que um orientador, um amigo franco e sincero, agradeço pela dedicação, incentivo e paciência.

Ao Instituto Biológico e ao Prof. Dr. Marcos Roberto Potenza pelos conhecimentos transmitidos na área de entomologia e pelo espaço oferecido para a manipulação dos insetos.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), pelo suporte necessário oferecido para a realização do projeto. Aos adoráveis engenheiros, Carlos Gaia da Silveira e Elizabeth Sebastiana Ribeiro Somessari, a tecnologista Yasko Kodama e o técnico Paulo, do Centro de Tecnologia de Radiações do IPEN-CNEN/SP, pela valiosa contribuição na irradiação das amostras.

Ao técnico Sebastião Aparecido Boleta, do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas III/USP, pela orientação na preparação das amostras e ao Laboratório de Filmes Finos, no departamento de Física Aplicada do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, onde foi realizada a Microscopia Eletrônica de Varredura.

A Tatiana Alves dos Reis, pelo auxílio técnico nas análises laboratoriais.

Aos amigos do Laboratório de Micotoxinas e do Instituto Biológico pelos bons momentos.

A Alice Mitsue Shimabuku, Anamaria França Amaral e Naíde Rodrigues Farripas, secretárias do Departamento de Microbiologia pelos esclarecimentos e atenção.

A equipe do laboratório de esterilização pelo auxílio.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

A todos que contribuíram de alguma maneira na realização deste projeto.

“Para conhecermos os amigos é necessário passar pelo sucesso e pela desgraça. No sucesso, verificamos a quantidade e, na desgraça, a qualidade.”

“A essência do conhecimento consiste em aplicá-lo, uma vez possuído.”

Confúcio

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

Fernando Pessoa

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.

LISTA DE FIGURAS

Figura A. 1 - Estrutura Química das Aflatoxinas	87
Figura A. 2 - Características macro e micromorfológicas de <i>A. flavus</i>	88
Figura A. 3 - Estrutura Química das Fumonisinias	88
Figura A. 4 - Inibição da biossíntese de esfingolipídeos.....	89
Figura A. 5 - Semelhança da estrutura química da fumonisina e esfingosina.....	89
Figura A. 6 - Características macro e micromorfológicas de <i>F. verticillioides</i>	90
Figura A. 7 - Caruncho <i>Sitophilus zeamais</i>	90
Figura A. 8 - Irradiador tipo Gammacell (Centro de Tecnologia das Radiações – IPEN)	91
Figura A. 9 - Sistema desenvolvido para estudo da interação.....	91
Figura A. 10 - Curva padrão de fumonisina B ₁	92
Figura A. 11 - Curva padrão de fumonisina B ₂	92
Figura A. 12 - Curva padrão de aflatoxina B ₁	93
Figura A. 13 - Curva padrão de aflatoxina B ₂	93
Figura A. 14 - Microscopia Eletrônica de Varredura	94
Figura A. 15 - Gráfico da eficiência obtida entre o gene alvo (<i>FUM1</i>) e controle.....	95
Figura A. 16 - Gráfico da eficiência obtida entre o gene alvo (<i>FUM19</i>) e controle endógeno (<i>TUB</i>), com slope variando de -0,1 a 0,1.....	95
Figura A. 17 - Curva de dissociação obtida para <i>FUM1</i> , com temperatura de melting..	96
Figura A. 18 - Curva de dissociação obtida para <i>FUM19</i> , com temperatura de melting	96
Figura A. 19 - Curva de dissociação obtida para <i>TUB</i> , com temperatura de <i>melting</i> (T _m)	97
Figura A. 20 - Gráfico da eficiência obtida entre o gene alvo (<i>AflR</i>) e controle endógeno (<i>TUB</i>), com <i>slope</i> variando de -0,1 a 0,1	97
Figura A. 21 - Gráfico da eficiência obtida entre o gene alvo (<i>AflP</i>) e controle endógeno (<i>TUB</i>), com <i>slope</i> variando de -0,1 a 0,1	98
Figura A. 22 - Quantificação relativa dos níveis de transcritos para o gene <i>FUM1</i>	98
Figura A. 23 - Quantificação relativa dos níveis de transcritos para o gene <i>FUM19</i>	99
Figura A. 24 - Quantificação relativa dos níveis de transcritos para <i>AflR</i>	99

Figura A. 25 - Quantificação relativa dos níveis de transcritos para *AflP*..... 100

LISTA DE QUADROS

Quadro B. 1- Esquema de Inoculação	41
Quadro B. 2 - Temperaturas necessárias para o crescimento e produção de micotoxinas das principais espécies toxigênicas do gênero <i>Aspergillus</i>	101
Quadro B. 3 - Valores de atividade de água em diferentes substratos e valores mínimos para o desenvolvimento de alguns fungos.	101
Quadro B. 4 - Níveis mínimos de atividade de água necessários para o crescimento e produção de micotoxinas das principais espécies toxigênicas do gênero <i>Aspergillus</i>.	102
Quadro B. 5 - Temperaturas necessárias para o crescimento e produção de micotoxinas das principais espécies toxigênicas do gênero <i>Fusarium</i>.	102
Quadro B. 6 - Níveis mínimos de atividade de água necessários para o crescimento e produção de micotoxinas das principais espécies toxigênicas do gênero <i>Fusarium</i>.	102

LISTA DE TABELAS

Tabela C. 1 - Preparação das soluções para a curva de calibração	103
Tabela C. 2 - Concentração das soluções para a curva de calibração (ng/mL)	103
Tabela C. 3 - Peso das amostras de grãos de milho, nos diferentes tratamentos, após 10, 20 e 30 dias de incubação	104
Tabela C. 4 - Atividade de água das amostras de grãos de milho, nos diferentes tratamentos, após 10, 20 e 30 dias de incubação.....	105
Tabela C. 5 - Microbiota fúngica das amostras de grãos de milho, nos grupos G2, G3, G4, G5 e G6, após 10, 20 e 30 dias de incubação, utilizando os meios AFPA e DRBC. .	106
Tabela C. 6 - Microbiota fúngica dos carunchos, dos grupos G3, G5 e G6 após 10, 20 e 30 dias de incubação, utilizando os meios AFPA e DRBC.....	107
Tabela C. 7 - Níveis de fumonisinas B ₁ e B ₂ nos diferentes tratamentos realizados.....	108
Tabela C. 8 - Níveis de aflatoxinas B ₁ e B ₂ nos diferentes tratamentos realizados.....	109
Tabela C. 9 - Análise Nutricional das amostras de milho dos diferentes tratamentos ..	110
Tabela C. 10 - Quantificação relativa dos níveis de transcritos para os genes <i>FUM1</i> e <i>FUM19</i> e produção de fumonisinas nos diferentes tratamentos.	111
Tabela C. 11 - Quantificação relativa dos níveis de transcritos para os genes <i>AflR</i> e <i>AflP</i> e produção de aflatoxinas nos diferentes tratamentos.	111

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Milho	18
1.2 Micotoxinas	19
<i>1.2.1 Aflatoxinas</i>	20
<i>1.2.1.1 Conceitos Gerais</i>	20
<i>1.2.1.2 Efeitos Biológicos</i>	21
<i>1.2.1.3 Generalidades sobre o fungo <i>Aspergillus flavus</i></i>	23
<i>1.2.2 Fumonisinias</i>	25
<i>1.2.2.1 Conceitos Gerais</i>	25
<i>1.2.2.2 Efeitos Biológicos</i>	26
<i>1.2.2.3 Generalidades sobre o fungo <i>Fusarium verticillioides</i></i>	28
1.3 Carunchos	30
1.4 Interações	31
1.5 Radiação Ionizante	32
1.6 PCR em Tempo Real	36
<i>1.6.1 Genes relacionados à produção de aflatoxinas</i>	37
<i>1.6.2 Genes relacionados à produção de fumonisinias</i>	38
1.7 Microscopia Eletrônica de Varredura	39
2 OBJETIVOS	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Amostras de grãos de milho	41
3.2 Irradiação	41
3.3 Cepas de <i>F. verticillioides</i> e <i>A. flavus</i>	42
3.4 Avaliação do potencial toxigênico das cepas de <i>A. flavus</i> e <i>F. verticillioides</i>	42
3.5 Carunchos <i>Sitophilus zeamais</i>	42
3.6 Frascos de Incubação	42
3.7 Umidade Relativa e Temperatura	43
3.8 Atividade de água	43

3.9 Preparo das Suspensões de Esporos Fúngicos.....	43
3.10 Inoculação das amostras de milho com a suspensão de esporos de <i>Fusarium verticillioides</i> e <i>Aspergillus flavus</i>.....	44
3.11 Inoculação das amostras de milho com carunchos.....	43
3.12 Peso das Amostras.....	44
3.13 Microbiota dos carunchos.....	44
3.14 Microbiota dos grãos de milho.....	44
3.15 Determinação de Micotoxinas.....	45
3.15.1 Aflatoxinas.....	45
3.15.1.1 Extração de aflatoxinas.....	45
3.15.1.2 Detecção e quantificação de aflatoxinas.....	45
3.15.1.3 Condições cromatográficas.....	46
3.15.2 Fumonisinias.....	46
3.15.2.1 Extração de fumonisinias.....	46
3.15.2.2 Detecção e quantificação de fumonisinias.....	47
3.15.2.3 Condições cromatográficas.....	47
3.15.3 Avaliação das metodologias analíticas.....	48
3.15.3.1 Construção da curva de calibração para as fumonisinias B ₁ e B ₂ e avaliação da recuperação.....	48
3.15.3.2 Construção da curva de calibração para as aflatoxinas B ₁ e B ₂ e avaliação da recuperação.....	49
3.16 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	50
3.17 Análise Nutricional.....	51
3.17.1 Determinação de Matéria Seca.....	51
3.17.2 Determinação de Fibra Bruta.....	51
3.17.3 Determinação de Nitrogênio Total.....	52
3.17.4 Determinação de Extrato Etéreo.....	53
3.17.5 Determinação de Matéria Mineral ou Cinzas.....	53
3.17.6 Determinação de Cálcio.....	54
3.17.7 Determinação de Fósforo.....	54
3.17.8 Determinação de Amido.....	54
3.18 Análise da expressão dos genes <i>FUM 1</i> e <i>FUM 19</i> de <i>Fusarium verticillioides</i> por Real Time RT-PCR	55

3.18.1 Isolamento do RNA e Transcrição reversa.....	55
3.18.2 Análise por Real Time RT-PCR.....	55
3.19 Análise da expressão dos genes <i>AflR</i> e <i>AflP</i> de <i>Aspergillus flavus</i> por Real Time RT-PCR.....	56
3.19.1 Isolamento do RNA e Transcrição reversa.....	56
3.19.2 Análise por Real Time RT-PCR.....	57
3.20 Análise Estatística.....	57
3.21 Delineamento Experimental.....	58
4 RESULTADOS.....	59
4.1 Peso das amostras de milho.....	59
4.2 Atividade de Água.....	59
4.3 Microbiota dos grãos e carunchos.....	60
4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	60
4.5 Determinação de Aflatoxinas e Fumonisinas.....	61
4.6 Análise Nutricional.....	62
4.7 Análise da expressão dos genes <i>FUM1</i> e <i>FUM19</i> de <i>F. verticillioides</i> por Real Time RT-PCR	62
4.8 Análise da expressão dos genes <i>AflR</i> e <i>AflP</i> de <i>A. flavus</i> por Real Time RT-PCR	63
5 DISCUSSÃO.....	64
6 CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS.....	71
ANEXO A - FIGURAS.....	88
ANEXO B - QUADROS.....	102
ANEXO C – TABELAS.....	105

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; YOSHIZAWA, 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 acetonitrila-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 tricarboxílico 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 tricarboxílico (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 (VISCANTI 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 (GELDERBLUM 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. verticilloides 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).

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

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

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).

extremidades afiladas. São formados em longas cadeias e em falsas cabeças (NELSON; TOUSSOUN; MARASAS, 1983).

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

⁶ *Rostro*: 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).

armazenamento na massa de grãos provavelmente pela combinação da inoculação de esporos durante a oviposição e atividades metabólicas e alimentação das larvas (DUNKEL, 1988).

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 (⁶⁰Co) e o céσιο-137 (¹³⁷Cs). O ⁶⁰Co é produto de reatores nucleares usados para produção de eletricidade. É formado quando o ⁵⁹Co absorve naturalmente um nêutron adicional, criando assim o radioisótopo ⁶⁰Co. Devido ao decaimento do radioisótopo, é necessário, periodicamente, reabastecer o radioisótopo para manter sua capacidade (DIEHL, 1995).

O ⁶⁰Co 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 ⁶⁰Co 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 ¹³⁷Cs ou ⁶⁰Co 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).

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).

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).

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve, como objetivo geral, avaliar a ação do caruncho como veiculador e facilitador do desenvolvimento fúngico e conseqüente produção de micotoxinas. Os objetivos específicos, por sua vez, foram os seguintes:

- ✓ Verificar a passagem de carunchos e a veiculação de fungos (*Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*) isolados e associados, de um lote de milho contaminado artificialmente para um lote esterilizado, em condições controladas de umidade e temperatura;
- ✓ Avaliar a micobiota e a presença de fumonisinas e aflatoxinas nas amostras de milho;
- ✓ Verificar as alterações decorrentes da ação dos carunchos sobre os grãos de milho e demonstrar a presença de estruturas fúngicas nos grãos e carunchos através do uso da Microscopia Eletrônica de Varredura;
- ✓ Avaliar o perfil nutricional das amostras de milho empregadas no estudo;
- ✓ Analisar a expressão dos genes *FUM1* e *FUM19* de *F. verticillioides* e dos genes *AflR* e *AflP* de *A. flavus* por *Real Time RT-PCR*;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras de grãos de milho

Foram utilizadas 60 amostras de grãos de milho (*Zea mays* L) híbrido simples semiduro – BRS 1010 para cada período de inoculação (10, 20 e 30 dias), totalizando 180 amostras. As amostras, contendo 200 gramas cada, acondicionadas em sacos plásticos, envoltas em sacos de papel e vedadas com fita crepe, foram divididas em seis grupos: G1(Controle), G2, G3, G4, G5 e G6. Todos os grupos foram tratados inicialmente com doses de 20 kGy, objetivando a eliminação da microbiota natural do milho. Cada grupo, subdividido em dois subgrupos (A e B), foram inoculados com *Sitophilus zeamais*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*, conforme esquema de inoculação proposto no Quadro B.1. As amostras analisadas foram previamente submetidas a pesquisa de aflatoxinas (AOAC, 2000; TARÍN; ROSSEL; GUARDINO, 2004) e de fumonisinas (VISCONTI; SOLFRIZZO; GIROLAMO, 2001).

Quadro B. 1- Esquema de Inoculação

GRUPO (n=6)	TRATAMENTOS	
	LADO A	LADO B
Grupo 1(Controle)	Milho + carunchos	Milho
Grupo 2	Milho + <i>Aspergillus</i>	Milho
Grupo 3	Milho + <i>Aspergillus</i> + carunchos	Milho
Grupo 4	Milho + <i>Fusarium</i>	Milho
Grupo 5	Milho + <i>Fusarium</i> + carunchos	Milho
Grupo 6	Milho + <i>Fusarium</i> + <i>Aspergillus</i> + carunchos	Milho

3.2 Irradiação

As amostras de milho foram irradiadas no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN – CNEN/SP). Para irradiação foi utilizada uma Fonte GammaCell de Cobalto 60, aplicando-se taxa dose variando de 4,74 kGy/h a 4,84 kGy/h.

3.3 Cepas de *F. verticillioides* e *A. flavus*

Foram utilizadas cepas toxigênicas de *F. verticillioides* - MRC 826, obtida junto ao *Programme on Mycotoxins and Experimental Carcinogenesis (PROMECC)* do *National Research Institute For Nutritional Diseases, Medical Research Council*, da África do Sul. Por sua vez, as cepas toxigênicas de *Aspergillus flavus* – IMI 190 foram provenientes do *International Micological Institute*, Londres, Inglaterra.

3.4 Avaliação do potencial toxigênico das cepas de *A. flavus* e *F. verticillioides*

Antes do início dos experimentos, a capacidade toxigênica das cepas de *A. flavus* e *F. verticillioides*, previamente liofilizadas, foi avaliada de acordo com as metodologias preconizadas por Nakai et al. (2008), para aflatoxinas, e por Sydenham et al. (1996), para fumonisinas.

3.5 Carunchos *Sitophilus zeamais*

Foi utilizada a espécie de caruncho *Sitophilus zeamais*, considerada predominante em grãos de milho (CANEPPELE et al., 2003), proveniente do Instituto Biológico – São Paulo, Brasil. Estes carunchos foram mantidos em frascos de vidro com tampa telada e alimentados com milho previamente desinfetado. No momento do uso, os carunchos foram imersos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por 2 minutos e lavados com água destilada estéril (BETI; PHILLIPS; SMALLEY, 1995).

3.6 Frascos de Incubação

O sistema para o estudo da interação foi desenvolvido utilizando-se dois frascos de vidro, com tampas plásticas, conectados por uma mangueira de borracha formando um sistema fechado (lado A e lado B). No interior de cada um dos frascos foi colocado um pote contendo solução de sulfato de potássio 30% (K_2SO_4), a fim de obter uma atividade de água favorável ao desenvolvimento fúngico. Ao redor dos potes foram adicionados 200 gramas de milho, previamente desinfetado, e realizada a inoculação, conforme o esquema descrito no item 3.1.

Este conjunto (ANEXO A, Figura A.9) foi incubado em estufa BOD, a 25 °C, por 10, 20 e 30 dias.

3.7 Umidade Relativa e Temperatura

As amostras foram mantidas em estufas BOD, ajustadas a 25 °C, sob umidade relativa de 97,5% a 99,0%, obtida por meio do emprego de solução salina saturada de sulfato de potássio a 30% (K₂SO₄), de acordo com Winston e Bates (1960).

3.8 Atividade de Água

As determinações de atividade de água foram realizadas utilizando-se equipamento AQUALAB CX-2, da Decagon Devices Inc.

3.9 Preparo das Suspensões de Esporos Fúngicos

As suspensões de esporos fúngicos, utilizadas para contaminar as amostras de milho, foram obtidas por meio de lavagens das cepas de *F. verticillioides* e *A. flavus* utilizando-se água destilada estéril com *tween* 80, com sete dias de cultivo a 25 °C (FERREIRA-CASTRO et al., 2007). Em seguida, foi realizada a contagem dos esporos em câmara de Neubauer. A suspensão final foi corrigida para 8 x 10⁶ esporos/mL.

3.10 Inoculação das amostras de milho com a suspensão de esporos de *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus flavus*

Foram inoculados 5 mL da suspensão de esporos fúngicos em 8 gramas de farelo de milho (previamente tratado com 20 kGy de radiação gama). Este foi adicionado aos frascos contendo as amostras de milho, nos tratamentos correspondentes, segundo o esquema de inoculação. O sistema foi mantido em estufa, a 25 °C, durante 10, 20 e 30 dias, sob umidade relativa e temperatura controlada por termoigrômetro.

3.11 Inoculação das amostras de milho com carunchos

Cerca de 200 carunchos, previamente selecionados e desinfetados com solução de hipoclorito de sódio 0,5%, durante 2 minutos e enxaguados com água destilada estéril, foram depositados sobre as amostras de milho, conforme o esquema de inoculação. Em seguida, os frascos foram unidos por mangueiras estéreis e incubados em estufa BOD, a 25 °C, por 10, 20 e 30 dias.

3.12 Peso das Amostras

O milho utilizado no experimento foi fracionado em amostras, de 200 gramas cada, pesadas em balança semi-analítica (Shimadzu – UX4200H). Após o término do período de incubação (10, 20 e 30 dias), todas as amostras foram novamente pesadas, a fim de se avaliar as possíveis perdas decorrentes da ação dos carunchos.

3.13 Micobiota dos carunchos

O isolamento dos fungos presentes na superfície dos carunchos foi realizado pelo plaqueamento direto do caruncho em placa de Petri contendo os meios de AFPA (Agar *Aspergillus flavus - parasiticus*), meio seletivo recomendado para o isolamento de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e DRBC (Agar Dicloran Rosa de Bengala), recomendado para o isolamento de fungos em substrato com alta atividade de água (PITT e HOCKING, 1997; BETI; PHILLIPS; SMALLEY, 1995).

3.14 Micobiota dos grãos de milho

As amostras de milho foram analisadas segundo a metodologia descrita por Berjak (1987), onde 30 gramas de milho foram desinfetados, por imersão em hipoclorito de sódio (2%), por 3 minutos, e lavados, por três vezes, com água destilada estéril. Trinta e três grãos foram selecionados ao acaso e semeados diretamente em placas de Petri contendo AFPA e DRBC. Foram utilizadas 3 placas contendo 11 grãos cada, para cada uma das amostras. Todas as placas foram incubadas em estufa BOD, a 25 °C, por 5 dias e os resultados expressos em porcentagem do total de grãos inoculados infectados por fungos.

3.15 Determinação de Micotoxinas

3.15.1 Aflatoxinas

3.15.1.1 Extração de aflatoxinas

A extração das aflatoxinas foi realizada utilizando-se a metodologia descrita pela AOAC (2000) onde uma alíquota de 25 gramas de cada amostra, previamente triturada, foi transferida para um frasco e adicionados 5 gramas de NaCl e 125 mL de metanol:água (70:30, v/v). Após agitação, por 30 minutos em agitador mecânico horizontal, o conteúdo do frasco foi filtrado em papel filtro, uma alíquota de 15 mL do extrato foi diluído em 30 mL de água destilada e filtrado em filtro de microfibras. Em seguida, 15 mL do extrato foi transferido para uma coluna de imunoafinidade (Aflatest, Vican, USA) a um fluxo de 1-2 gotas por segundo até que o ar passasse pela coluna. Completada a operação, a coluna foi lavada com 10 mL de água destilada a um fluxo de 1-2 gotas por segundo e eluída com 1 mL de metanol grau CLAE a um fluxo de 1-2 gotas por segundo. Após a eluição, o extrato foi recolhido, evaporado até obtenção de resíduo e armazenado a -4 °C até o momento da eluição.

3.15.1.2 Detecção e quantificação de aflatoxinas

As aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ presentes no extrato metanólico foram detectadas e quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para isso, as amostras foram derivatizadas antes de serem aplicadas no cromatógrafo segundo Tarín et al. (2004), onde 200 µL de hexano (grau HPLC) a 40 °C e 50 µL de ácido trifluoracético (TFA) foram acrescentados ao extrato e mantidos sob agitação manual por 15 minutos. Após essa manobra as amostras foram evaporadas e armazenadas sob refrigeração até o momento de serem aplicadas no cromatógrafo, onde foram ressuspensas com 200 µL de acetonitrila:água (1:9, v/v) e 20 µL foram injetados no equipamento nas condições descritas no item 3.15.1.3.

A quantificação foi baseada na área dos picos correspondentes a cada toxina, comparando-as com o padrão, de acordo com a seguinte fórmula:

$AF \text{ (ng/g)} = (ABC) \div (DE)$, onde:

A= área do pico correspondente a AF (ng/ μ L) da solução padrão;

B= concentração de AF (ng/ μ L) da solução padrão;

C= volume final da solução teste (μ L);

D= área do pico de AF da solução padrão;

E= peso da amostra representada pela solução em teste (g).

3.15.1.3 Condições cromatográficas

Para a realização da CLAE foi utilizado cromatógrafo líquido (Shimadzu, modelo CLASS-LC10), equipado com injetor fixo de *loop* fixo de 20 μ L. A separação foi realizada em coluna de fase reversa C-18 (5 μ ODS-20, 250 x 4,6 mm, Phenomenex). Os derivados de aflatoxinas foram detectados em detector de fluorescência (modelo RF-10AX), com comprimento de onda de 365 e 450nm (excitação e emissão, respectivamente). A fase móvel utilizada foi metanol: acetonitrila: água (1:1:3, v/v/v), fluxo de 0,79 mL por minuto e temperatura do forno 40 °C. Essa proporção permitiu a obtenção de pressão e viscosidade de fase móvel adequadas, com separação e tempos retenção ótimos: 7,6; 9,4; 13,2 e 17;8 minutos para G₁, B₁, G₂ e B₂, respectivamente.

3.15.2 Fumonisinias

3.15.2.1 Extração de fumonisinias

A extração das fumonisinias foi realizada utilizando-se a metodologia preconizada por Visconti, Solfrizzo e Girolamo. (2001) onde uma alíquota de 20 gramas de cada amostra, previamente triturada, foi transferida para um frasco e adicionados 50 mL de solução de extração (acetonitrila:metanol:água, 25:25:50, v/v/v), submetido à agitação por 20 minutos e centrifugação por 10 minutos, a 2500 x g (4000 rpm). Em seguida o sobrenadante foi filtrado em papel Whatmann n° 4 e, na porção sólida, adicionado 50 mL de solução de extração e submetido à agitação por 20 minutos e centrifugação por 10 minutos a 2500 x g (4000 rpm). O extrato foi filtrado no mesmo papel Whatmann n° 4 utilizado inicialmente, tendo assim dois extratos juntos. A partir deste, 10 mL foram pipetados, adicionados a 40 mL de PBS e, após

agitação, filtrado em filtro de microfibras. Uma alíquota de 10 mL foi transferida para uma coluna de imunoafinidade (FumoniTest, Vicam, USA). Esta foi posteriormente, lavada com 10 mL de PBS e a toxina foi eluída com 1,5 mL de metanol. O extrato foi evaporado, até obtenção do resíduo e, por fim armazenado a -4 °C, até o momento da quantificação.

3.15.2.2 Detecção e quantificação de fumonisinas

A quantificação de fumonisinas foi realizada conforme metodologia preconizada por Sydenham et al. (1996). As amostras foram redissolvidas em 200 µL de acetonitrila:água (50:50, v/v). A partir desta solução foi retirada uma alíquota de 100 µL e adicionado 200 µL de OPA (40 mg de *o*-ftaldialdeído dissolvidos em 1 mL de metanol e acrescidos 5 mL de tetraborato de sódio 0,1 M e 50 µL de 2-mercaptoetanol). Após 2 minutos, 20 µL do preparo foram injetados no cromatógrafo. A quantificação foi baseada na área dos picos correspondentes a cada toxina, comparando-as com o padrão, de acordo com a seguinte fórmula:

$FB\ (ng) = (ABC) \div (DE)$, onde:

A= área do pico correspondente a FB (ng/µL) da solução padrão;

B= concentração de FB (ng/µL) da solução padrão;

C= volume final da solução teste (µL);

D= área do pico de FB da solução padrão;

E= peso da amostra representada pela solução em teste (g).

3.15.2.3 Condições cromatográficas

Para a realização da CLAE foi utilizado cromatógrafo líquido (Shimadzu, modelo CLASS-LC10), equipado com injetor fixo de *loop* fixo de 20 µL. A separação foi realizada em coluna de fase reversa C-18 (5µ -ODS-20, 150 x 4,6 mm, Phenomenex). Os derivados de fumonisinas foram detectados em detector de fluorescência (modelo RF-10AX), com comprimento de onda de 335 e 440nm (excitação e emissão, respectivamente). A fase móvel utilizada foi acetonitrila:água:ácido acético (480:520:10, v/v/v), fluxo de 1 mL por minuto e temperatura do forno 30 °C. Essa proporção permitiu a obtenção de pressão e viscosidade de

fase móvel adequadas, com separação e tempos retenção ótimos: 6.7 e 17.7 minutos para FB₁ e FB₂, respectivamente.

3.15.3 Avaliação das metodologias analíticas

- Neste trabalho, foram avaliadas e otimizadas duas metodologias analíticas, sendo uma delas para a determinação de aflatoxinas e outra para determinação de fumonisinas em milho.
- Para a determinação das fumonisinas B₁ e B₂ utilizou-se colunas de imunoafinidade Fumonitest (Vican) e, em seguida, as amostras foram analisadas por CLAE, conforme trabalho proposto por Visconti, Solfrizzo e Girolamo (2001).
- Para a determinação das aflatoxinas B₁ e B₂ em milho utilizou-se colunas de imunoafinidade Aflatest (Vican). As amostras foram analisadas por CLAE, conforme metodologias propostas pela AOAC, 2000 e por Tarín, Rossel e Guardino (2004).
- Para a utilização das metodologias descritas neste trabalho, foram avaliados os seguintes parâmetros: recuperação, repetibilidade e limite de quantificação.

3.15.3.1 Construção da curva de calibração para as fumonisinas B₁ e B₂ e avaliação da recuperação

As soluções calibradoras de FB₁ e FB₂ foram preparadas em acetonitrila:água (50:50, v/v) com uma concentração de 100 µg/mL para FB₁ e 50 µg/mL para FB₂. Foram pipetados 500 µL da solução calibradora de fumonisina para um balão volumétrico de 5 mL para diluição com acetonitrila: água (50:50, v/v), as soluções foram agitadas para a obtenção de uma concentração de 10 ng/µL para FB₁ e 5 ng/µL para FB₂. Foram preparadas 4 soluções em balões volumétricos de 5 mL diluídas em acetonitrila: água (50:50, v/v) (ANEXO C, Tabela C.1) para a realização da curva de calibração e verificação da linearidade. As soluções tiveram limites variando entre 0,025 – 2,000 mg/Kg e 0,0125 – 1,000 mg/Kg para FB₁ e FB₂, respectivamente.

As Figuras A.10 e A.11 (ANEXO A) demonstram os dados e as curvas obtidos por CLAE. O coeficiente de correlação foi de 0,99277 para FB₁ e 0,995047 para FB₂.

A recuperação do método foi testada em triplicata, a partir de amostras artificialmente contaminadas com FB em diferentes níveis de contaminação. Os testes de recuperação apresentaram resultados variando de 81,35% (concentração de 300 µg/Kg) a 109,13% (25 µg/Kg) para FB₁. O maior valor de DPR foi de 13,86% para a concentração de 15 µg/kg, demonstrando que quanto mais próximo do limite de detecção, ocorre maior diferença entre as determinações.

As curvas padrão de fumonisinas apresentaram-se lineares nas faixas de concentrações e estão apresentadas nas Figuras A.10 e A.11 (ANEXO A).

Os testes de recuperação variaram de 81,35% (300 µg/Kg) a 109,13% (25 µg/Kg) para FB₁. O DPR foi maior (13,86%) no menor nível de concentração (15 µg/Kg), sendo que este dado também foi observado por Shundo (2004).

De acordo com o CEN (*European Committee for Standardization*) (1999), as recuperações para fumonisinas devem estar entre 70% a 110% apresentando DPR ≤ 20, quando as concentrações variam de 0,5 µg/g (500 µg/Kg) a 5 µg/g (5000 µg/Kg) e 60% a 120% com DPR ≤ 30, quando a concentração for inferior a 0,5 µg/g (500 µg/Kg). Assim, os resultados obtidos neste trabalho para a otimização do método para análise de fumonisinas em grãos de milho recém-colhido podem ser considerados satisfatórios.

3.15.3.2 Construção da curva de calibração para as aflatoxinas B₁ e B₂ e avaliação da recuperação

As soluções calibradoras de aflatoxinas foram preparadas em benzeno:acetonitrila (98:2, v/v) com uma concentração de 11,4; 9,35; 9,915; 9,44 µg/mL para AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, respectivamente. Foram pipetados 100 µL da solução calibradora de cada aflatoxina para um balão volumétrico de 10 mL para diluição com benzeno:acetonitrila (98:2, v/v), as soluções foram agitadas para a obtenção de uma concentração de 28,5; 23,625; 24,7875; 23,6 ng/mL para AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, respectivamente. Foram preparadas mais 4 diluições em balões volumétricos de 10 mL diluídas em benzeno:acetonitrila (98:2, v/v) (ANEXO C, Tabela C.2) para a realização da curva de calibração e verificação da linearidade. As soluções foram derivatizadas segundo Tarín et al. (2001) antes de ser injetadas. Os limites variaram de

1,781 a 28,5 ng/mL para AFB₁, 1,476 e 23,625 ng/mL para AFB₂, 1,55 e 24,7875 ng/mL para AFG₁ e 1,475 e 23,6 ng/mL para AFG₂.

O limite de detecção do método para amostras de milho foi de 1ng/g para AFB₁ e AFB₂, já o limite de quantificação foi < 1ng/g para AFB₁ e de 1 ng/g para AFB₂. Para determinação do limite de detecção e quantificação do aparelho, soluções derivatizadas de aflatoxinas B₁ e B₂, em concentrações decrescentes, foram injetadas. Observou-se que o aparelho era capaz de detectar e quantificar até o limite de < 0,46ng/mL. A curva de calibração foi realizada apresentando um coeficiente de correlação de 0,98 tanto para AFB₁ (ANEXO A, Figura A.12) quanto para AFB₂ (ANEXO A, Figura A.13).

O estudo da recuperação do método foi realizado pela adição de quantidades conhecidas de AFB₁ e AFB₂ a amostras de milho sem contaminação. Em 25 g de amostras de milho foram adicionados padrões de AFB₁ e AFB₂ em triplicata, nas seguintes concentrações: 143,36 ng/g e 9,69 ng/g, respectivamente. Em seguida, as amostras foram submetidas à metodologia proposta pela AOAC (2000). O percentual de recuperação das amostras de milho foi de 77,62% em média para ambas aflatoxinas.

3.16 Microscopia Eletrônica de Varredura

Após o período de incubação, foram selecionados 3 grãos de milho de cada amostra para a realização do teste. Os grãos foram fixados com uma solução karnovisky, pH 7,2, (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2,5%) durante 24 horas. Em seguida foram lavados com água destilada por 3 vezes e tratados com tetróxido de ósmio 1%, por 2 horas, a 3 °C. Os grãos foram novamente lavados com água destilada por 3 vezes e submetidos a um processo de desidratação gradual com álcool etílico. Para isso os grãos permaneceram submersos em soluções alcoólicas a 70%, 80%, 90%, 95% e absoluto (100%), por um período de 15 minutos cada, sendo, no caso do álcool absoluto repetido 4 vezes. Após a desidratação, as amostras foram submetidas a secagem em secador de ponto crítico, montadas em porta espécimes, metalizadas com ouro paládio e submetidas à análise em microscópio eletrônico de varredura 6460LV Jeol.

3.17 Análise Nutricional

Para a realização das análises foi selecionada uma amostra global de 250 gramas (contendo 50 gramas de cada uma das 5 repetições) representante de cada tratamento. A análise nutricional das amostras foi realizada utilizando-se métodos preconizados por Cunniff (1998). Foram analisados: matéria seca, fibra bruta, proteína bruta, extrato etéreo, matéria mineral, cálcio, fósforo, amido.

3.17.1 Determinação da Matéria Seca

Para a determinação da matéria seca um cadinho foi colocado em estufa a 103-105 °C por 4 horas e em seguida transferido para um dessecador, permanecendo por 30 minutos ou até seu resfriamento total. Este cadinho foi pesado em balança analítica, com precisão de $\pm 0,0001$ g, sendo posteriormente adicionado 1 a 2 g da amostra seca ao ar. A secagem deste conjunto foi realizada em estufa, à temperatura de 103-105 °C por 4 horas. Após este período, este material foi transferido para um dessecador para que esfriasse, e então pesado. A matéria seca foi calculada através de uma relação entre a amostra úmida e a amostra seca, fornecendo o resultado em percentual de matéria seca definitiva.

3.17.2 Determinação de Fibra Bruta

Para a determinação de fibra bruta 2 g de matéria seca previamente desengordurada foram transferidas para um becker e adicionados 200 mL de ácido sulfúrico a 1,25%. Este conjunto foi levado ao aparelho de Sebelin onde permaneceu em ebulição por 30 minutos. Ao término deste período, o material foi filtrado à vácuo em funil de Buckner e peneira com malha de 200 mesh, e lavado com água destilada aquecida até reação neutra. O resíduo insolúvel foi retornado ao becker, adicionados 200 mL de hidróxido de sódio a 1,25% e, deixado em ebulição por 30 minutos em aparelho de Sebelin. O material foi filtrado direto no cadinho de vidro com placa porosa (porosidade média ou fina), lavado com água destilada até reação neutra e o cadinho levado à estufa a 103-105 °C por 4 horas. Após o resfriamento, o cadinho foi pesado em dessecador e levado à mufla a 550 °C por mais 4 horas. Após esfriamento em dessecador, o cadinho foi submetido à nova pesagem.

A quantidade de fibra bruta existente na amostra foi dada subtraindo o peso do cadinho de vidro proveniente da mufla a 550 °C (A) do peso obtido para este mesmo cadinho, após secagem em estufa 103-105 °C por 4 horas (B). Em A observa-se cinzas e em B cinzas e fibra bruta. Assim, através de uma regra de três simples foi calculada a porcentagem de fibra bruta na amostra.

3.17.3 Determinação do Nitrogênio Total

A determinação de proteína bruta foi realizada pesando-se 1 grama de amostra em papel filtro, transferindo para um balão de Kjeldahl e adicionados 15 g da mistura (9:1) de sulfato sódio anidro e sulfato de cobre, e 24 a 30 mL de ácido sulfúrico concentrado. A digestão teve início lentamente no aparelho digestor de Kjeldahl. Após esfriar, foi adicionado água ao conteúdo do balão sob jato de água fria de torneira. Pérolas de vidro foram adicionadas e o volume aumentado com água destilada (300 mL), sendo também adicionadas 2 a 3 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína 0,1%.

Para a preparação do erlenmeyer receptor foram transferidos 30 mL de ácido bórico a 5%, e adicionadas 3 a 4 gotas do indicador misto vermelho de metila 0,2% (em solução alcoólica 60%) mais azul de metileno 0,2% (e solução alcoólica 60%) e completado o volume para 150 mL com água destilada.

O bico do destilador foi mergulhado no conteúdo do erlenmeyer receptor. No balão de Kjeldahl foram acrescentadas pitadas de zinco em pó adicionando-se, pela parede, cerca de 80 mL de solução de hidróxido de sódio a 40%, que após a agitação resultou em coloração violácea ou azulada. A destilação foi realizada ligando a água de refrigeração do condensador. Após cerca de 60 minutos, uma gota do destilado foi colocada sobre papel indicador universal, quando a coloração resultante era azul ou esverdeada indicava que o hidróxido de amônio ainda estava sendo destilado, se a coloração era constantemente amarela significava que a destilação havia terminado. A titulação era realizada na bureta de ácido sulfúrico 0,1 N de fator conhecido, anotando o volume gasto em mL. O seguinte cálculo era, então, realizado:

$$N \% = \frac{(VGA - VGB) \times N \times FC \times 14,007 \times 100}{PA} \quad , \text{ onde:}$$

VGA: mL gasto de HCl na amostra;
 VGB: mL de HCl gasto no branco;
 N: normalidade do ácido;
 FC: fator de correção do ácido;
 PA: peso da amostra (mg);
 14,007: equivalente grama do nitrogênio;
 100: porcentagem.

Cálculo de porcentagem de proteína na amostra: multiplicar o valor percentual de nitrogênio da amostra pela constante 6,25; pelo fato da proteína conter 16% de nitrogênio.

$$\frac{100 (P) \text{-----} 16 (N)}{x \text{-----} 1 (N)} \quad x: 6,25$$

Proteína Bruta: PB: N % × 6,25

3.17.4 Determinação de Extrato Etéreo

Para a determinação do extrato etéreo, a amostra foi pesada em cartucho extrator preparado com papel filtro. Foi feita a extração da gordura com solvente em conjunto de condensador e balão com ou copo extrator previamente tarado. Em seguida fez-se a recuperação do solvente e secagem do balão ou copo em estufa a 105 °C por 1 hora. As amostras foram esfriadas em dessecador até temperatura ambiente e, novamente pesada. O resultado foi expresso em %.

3.17.5 Determinação de Matéria Mineral ou Cinzas

Para determinação da matéria mineral, a amostra moída foi pesada em cadinho de porcelana previamente tarado, o qual foi colocado em mufla em temperatura gradualmente aumentada (500-600 °C) até obtenção de cinzas claras. Após o procedimento, o recipiente foi retirado da mufla, esfriado em dessecador até temperatura ambiente e novamente pesado. O resultado foi expresso em %.

3.17.6 Determinação de Cálcio

Para determinação de cálcio a amostra moída foi incinerada a 600 °C por 4 horas e as cinzas dissolvidas utilizando o ácido indicado para determinação de cálcio. A quantificação foi realizada através da absorção atômica e o resultado foi expresso em %.

3.17.7 Determinação de Fósforo

Para determinação de fósforo, a amostra moída foi incinerada a 600 °C por 4 horas e as cinzas dissolvidas utilizando o ácido clorídrico 50%, levado até ebulição. Adicionou-se à solução previamente obtida em balão volumétrico, o reagente de vanado-molibdato de amônio e água destilada para completar o volume. A leitura foi feita em espectrofotômetro (420 nm) e o resultado expresso em porcentagem.

3.17.8 Determinação de Amido

Para determinação de amido, 0,5 g da amostra moída foi colocada em tubo de centrífuga e adicionados 40 mL de álcool 80% e mantidos em banho maria a 80 °C por 30 minutos. Em seguida foi centrifugada a 300 x g por 10 minutos e desprezado o sobrenadante. A esse resíduo foi adicionado 40 mL de álcool 80% a 80 °C, agitado e centrifugado a 300 x g por 10 minutos e desprezado o sobrenadante (este processo foi realizado duas vezes). O tubo, contendo a amostra, foi seco em estufa a 65 °C. Após a secagem foi adicionado 2 mL de cloreto de cálcio e mantido em repouso por 1 hora. Os tubos receberam, então, 2 mL de água destilada, e seguiram para a autoclavagem por 1 hora (120 °C, 1 atm). Depois de serem autoclavados, foi adicionado 10 mL de solução tampão (ácido acético e acetato de sódio), agitados por 1 minuto, acrescido 80 µL de enzima e incubados em banho maria, a 65 °C por 15 horas (as amostras foram agitadas 2 horas após o início da incubação e 1 hora antes do término). Terminada a incubação, o volume do tubo foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL, sendo o tubo lavado com água destilada estéril até completar o volume. No mínimo, 30 mL do conteúdo do balão foi centrifugado a 300 x g por 15 minutos, retirando uma alíquota e submetido a determinação de glicose utilizando um Kit enzimático colorimétrico específico.

3.18 Análise da expressão dos genes *FUM1* e *FUM19* de *F. verticillioides* por Real Time RT-PCR

3.18.1. Isolamento do RNA e transcrição reversa

Foram selecionadas, para este estudo, as amostras tratadas com *F. verticillioides* (G4), *F. verticillioides* e carunchos (G5) e *A. flavus*, *F. verticillioides* e carunchos (G6), inoculados em sistema fechado, em duplicata. A partir dos grãos de milho incubados a 10, 20 e 30 dias, na presença e ausência de carunchos, o RNA total foi isolado utilizando o *Kit RNeasy* (Qiagen), de acordo com o manual de instruções, em seguida, o cDNA foi sintetizado utilizando o *Kit Sensiscript RT* (Qiagen). Cada 20 µL de reação continha 10 µL do produto de extração de RNA total, 2 µL de *Random primers* (3 µg/µL- *Invitrogen*), 2 µL de 10X RT-PCR *buffer*, 2 µL de dNTP *mix*, 1 µL de inibidor de RNase (40 U/µL - *Invitrogen*), 1 µL de *Sensiscript Reverse Transcriptase*. A síntese do cDNA foi realizada em termociclador *Applied Biosystems Thermocycler Gene Amp^R PCR System 9700* por 1 h a 37 °C. As amostras foram mantidas a – 20 °C.

3.18.2 Análise por Real-Time RT-PCR

A PCR em tempo real baseada nos genes *FUM1* e *FUM19* da cepa de *F. verticillioides* foi realizada pela utilização dos seguintes iniciadores: *FUM1*: PQF1-F (5'-GAGCCGAGTCAGCAAGGATT-3') e PQF1-R (5'-AGGGTTCGTGAGCCAAGGA-3'); *FUM19*: PQF19-F (5'-ATCAGCATCGGTAACGCTTATGA-3') e PQF19-R (5'-CGCTTGAAGAGCTCCTGGAT-3') (LÓPEZ-ERRASQUÍN et al., 2007). As condições para a termociclagem foram: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 2 minutos, 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos, e 60 °C por 30 segundos. O reagente *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix - UDG* (*Invitrogen*) foi utilizado na reação, adicionando 3 µL de água Milli Q estéril, 2.0 µL de cada iniciador e 5 µL da fita de cDNA, 12.5 µL do reagente *Sybr* e 0.5 µL de ROX, totalizando um volume de 25 µL. As amostras foram realizadas em duplicata em equipamento *7300 Real – Time PCR Systems (Applied Biosystems)*. Para a exclusão de possíveis contaminações, em todas as reações, utilizou-se um controle negativo apropriado. A quantificação do RNAm foi normalizada utilizando como controle endógeno o gene de expressão constitutiva da β tubulina (*TUB*), e este foi amplificado em todas as placas para todas

as amostras. Foram utilizados os seguintes pares de iniciadores: TUB1-F (5'-CCGGTATGGGTACTCTGCTC-3') e TUB2-R (5'-CTCAACGACGGTGTCAGAGA-3'). A quantificação relativa baseada nos valores de $\Delta\Delta Ct$ foi a metodologia analítica de escolha para esse estudo.

Neste método, faz-se uma comparação entre o gene alvo (*FUM1* e *FUM19*) e o controle endógeno (*TUB*). A quantificação é realizada pela subtração do Ct alvo (ciclo em que a amostra ultrapassa o *threshold*) e o Ct do controle endógeno, obtendo-se o ΔCt . Cada ΔCt foi subtraído pelo ΔCt da amostra calibradora (no caso, G6- 30 dias, lado A, que apresentou o menor nível de expressão de *FUM1* e *FUM19*), obtendo-se o $\Delta\Delta Ct$. Os valores de $\Delta\Delta Ct$ foram transformados em \log_2 para gerar os níveis de expressão relativa (GIZINGER, 2002). Para a validação do método, foram feitas diluições seriadas em triplicata (1; 1:10; 1:100; 1:1000) do gene alvo (*FUM1* e *FUM19*) e do gene endógeno (*TUB*). A partir da curva gerada pelo software, calculou-se a eficiência do ensaio através da fórmula: $E=10^{(-1/slope)} -1$. Em seguida, verificou-se a compatibilidade das eficiências geradas para os ensaios do gene alvo e do controle endógeno. Após a realização das curvas de diluição tirou-se a média de Ct para as triplicatas de cada ponto da curva, em seguida calculou-se o ΔCt utilizando-se as médias de cada ponto e o log dos valores de diluição. Esses dados foram plotados em um gráfico para a verificação do *slope* da reta gerada, que deve ser entre -0,1 e 0,1 (PFAFFL, 2001; SCHMITTGEN e LIVAK, 2008).

3.19 Análise da expressão dos genes *AflR* e *AflP* de *A. flavus* por Real Time RT-PCR

3.19.1 Isolamento do RNA e Transcrição reversa

Foram selecionadas para este estudo as amostras tratadas com *A. flavus* (G2), *A. flavus* e carunchos (G3) e *A. flavus*, *F. verticillioides* e carunchos (G6), inoculados em sistema fechado, em duplicata.

A extração do RNA total e a transcrição reversa foram realizadas conforme item 3.18.1.

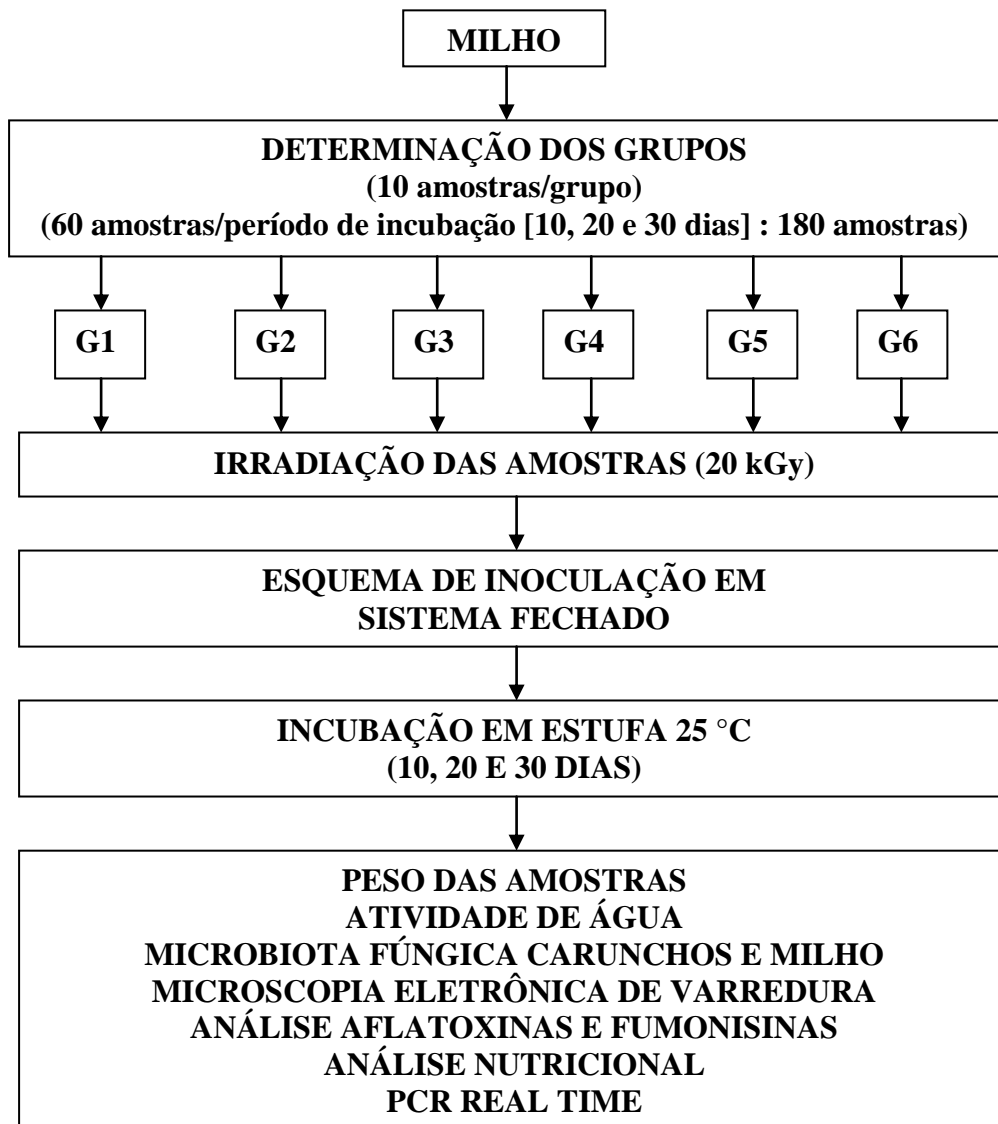
3.19.2 Análise por Real-time RT PCR

As reações de PCR em tempo real baseadas nos genes *aflR* e *aflP* das cepas de *A.flavus* isoladas, foram realizadas através da utilização dos seguintes iniciadores: *aflR*: *aflRtaq-1* (5'-TTTTTCGACGCGTTTTTGGGAAGTAG-3') e *aflRtaq-2* (5'-CGCCTGAAACGGTGGTAGT-3'); *aflP*: *aflPtaq-1* (5'-CGGCTGAGATGACCACGA-3') e *aflPtaq-2* (5'-GAGGAGATGTTTGATTTCAGCAGTCT-3'); Sondas com *quencher* não fluorescente (NFQ) em 3' e repórter em 5' marcado com FAM: *aflR*: (5'-ATCGACCCGTTCCCTCG-3'); *aflP*: (5'-CCGCCGCCGACATC-3') (MAYER; FABER; GEISEN, 2003). As amostras foram realizadas em duplicata em equipamento 7300 *Real – Time PCR Systems* (*Applied Biosystems*). As condições para a termociclagem foram: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos, e 60 °C por 1 minuto. Foi utilizado o *Kit TaqMan Gene Expression Master Mix* (*Applied biosystems*), conforme manual de instruções. O controle endógeno para a quantificação do RNAm foi o gene β tubulina, com os seguintes pares de iniciadores: *Tubasp-1* (5'-CGAGGCTCTGTATGACATTTGCAT-3') e *Tubasp-2* (5'-GTGGTTCAGGTCACCGTAAGAG-3') e sonda *TUB*: (5'-CACCTCAAGCTCTCC-3'). A quantificação relativa baseada nos valores de $\Delta\Delta C_t$ foi a metodologia analítica de escolha para esse estudo, conforme descrito no item 3.18.2.

3.20 Análise Estatística

As análises estatísticas deste trabalho foram realizadas utilizando-se os *softwares* R 2.9.1 pacote Gamlss e SAS 9.1.

3.21 Delineamento Experimental



4 RESULTADOS

4.1 Peso das amostras de milho

Nas amostras pertencentes ao Grupo 1 (Controle), contendo grãos de milho inoculados com carunchos (*S. zeamais*) no lado A, e grãos de milho no lado B, foi constatado decréscimo linear no peso das amostras no decorrer do período de incubação, decorrente da migração dos carunchos de um lado para o outro. Após 10, 20 e 30 dias de incubação, as amostras, inicialmente com 200 gramas, apresentaram peso médio de 197,1; 194,0; 190,0 gramas (Lado A) e 197,1; 193,5; 190,3 gramas (Lado B) (ANEXO C, Tabela C.3).

As amostras do Grupo 2, contaminadas apenas com *A. flavus* no Lado A, não revelaram alterações no peso das amostras. Durante todo o experimento o peso permaneceu constante (200 gramas).

Já as amostras pertencentes ao Grupo 3, inoculadas com carunchos e *A. flavus*, revelaram resultados semelhantes aos obtidos no Grupo 1 (Controle). Os valores encontrados, para Lado A e Lado B, após 10, 20 e 30 dias de incubação, foram de 198,0; 192,7; 190,5 gramas (Lado A) e de 198,4; 198,4; 187,8 gramas (Lado B).

Nas amostras do Grupo 4, cujos grãos de milho do Lado A foram contaminados com *F. verticillioides*, o peso das amostras também permaneceu constante (200 gramas).

No Grupo 5, onde os grãos de milho do lado A foram contaminados com *F. verticillioides* e carunchos (*S. zeamais*), os resultados foram similares aos verificados no Grupo 1 (Controle), onde as amostras foram inoculadas somente com os carunchos. O mesmo é válido para as amostras pertencentes ao Grupo 6, onde, no Lado A, houve a interação carunchos, esporos de *A. flavus* e de *F. verticillioides*.

4.2 Atividade de Água

O emprego da solução de K_2SO_4 a 30% nos seis grupos experimentais permitiu manter os níveis de atividade de água entre 0,82 e 0,86, considerados ideais para o crescimento de *A. flavus* e *F. verticillioides* (CAHAGNIER; MELCION; RICHARD-MOLARD, 1995) (ANEXO C, Tabela C.4).

4.3 Microbiota dos grãos e carunchos

Nas amostras pertencentes ao Grupo 1 constatou-se ausência de crescimento fúngico nos grãos e nos carunchos, nos meios de AFPA e DRBC, devido a não inoculação de fungos no milho utilizado como controle.

No Grupo 2, os resultados demonstraram 100% de crescimento de *A. flavus* nas amostras de grãos do Lado A, após 10, 20 e 30 dias de inoculação. Por outro lado, nas amostras do Lado B, não foi detectada a presença de fungos, conforme resultados expressos na Tabela C.5 (ANEXO C).

A veiculação de esporos de *A. flavus* da superfície corpórea de carunchos presentes no Lado A, para os grãos do Lado B, foi verificada nas amostras pertencentes ao Grupo 3. No Lado A, a frequência do fungo nos grãos de milho e na superfície corpórea dos carunchos foi de 100%. Por sua vez, no Lado B, a frequência variou entre 96,9% (10 dias de incubação) e 100% (20 e 30 dias de incubação) (ANEXO C, Tabelas C.5 e C.6).

De modo similar ao Grupo 2, as amostras de grãos do Grupo 4 (lado A) revelaram 100% de crescimento fúngico, após 10, 20 e 30 dias de inoculação (ANEXO C, Tabela C.5).

As amostras do Grupo 5, inoculadas previamente com esporos de *F. verticillioides* e carunchos, revelaram crescimento do fungo em 100% das amostras do Lado A. No Lado B, dos grãos de milho e carunchos examinados, 97,5 e 100% estavam contaminados com *F. verticillioides* (ANEXO C, Tabelas C.5 e C.6).

As amostras do Grupo 6, contaminadas com ambos os fungos (*A. flavus* e *F. verticillioides*) e carunchos no Lado A do sistema, apresentaram crescimento fúngico em 100% dos grãos e carunchos do Lado A. No Lado B a frequência variou de 97,5% (10 dias de incubação) a 100% (20 e 30 dias de incubação) (ANEXO C, Tabelas C.5 e C.6).

4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

Nas amostras do Grupo 1, as alterações na estrutura física dos grãos de milho foram progressivamente aumentadas com o período de incubação. As amostras de milho dos Grupos 2 e 4 demonstraram aumento progressivo no número de estruturas fúngicas de *A. flavus* e *F. verticillioides*, com o aumento de período de incubação. Já as amostras pertencentes aos Grupos 3 e 5 permitiram demonstrar experimentalmente a capacidade dos carunchos de carrear estruturas fúngicas na superfície corpórea. Nestes grupos, a migração dos carunchos

carreando esporos de *A. flavus* e *F. verticillioides* de um lado para o outro, resultou em alterações na estrutura física dos grãos de milho em ambos os lados. Por fim, o Grupo 6, onde os grãos de milho foram inoculados com carunchos, *A. flavus* e *F. verticillioides* no lado A, os resultados demonstraram um perfil semelhante ao observado nos Grupos 1, 3 e 5, onde foi constatado um aumento progressivo de alterações nas estruturas fúngicas no decorrer do período de inoculação, em ambos os lados (ANEXO A, Figura A.14).

4.5 Determinação de Aflatoxinas e Fumonisinas

A pesquisa de fumonisinas foi realizada nas amostras de milho dos Grupos 1, 4, 5 e 6. No Grupo 1 (controle) não foram detectadas Fumonisinas B₁ e B₂ (FB₁ e FB₂), após 10, 20 e 30 dias de incubação, em ambos os lados (ANEXO C, Tabela C.7).

Nas amostras do Grupo 4 foi constatado aumento progressivo nos níveis de fumonisinas, nas amostras do lado A. Os níveis médios de FB₁ e FB₂ detectados foram de 250,42 e 85,60; 252,52 e 120,15; e, 415,84 e 147,49 µg/Kg em 10, 20 e 30 dias de inoculação, respectivamente. No lado B, as toxinas não foram detectadas, nos três períodos de inoculação.

No Grupo 5 constatou-se aumento progressivo nos níveis de FB₁ e FB₂, em ambos os lados, devido à migração dos carunchos do lado A para o lado B, inicialmente isento de contaminação fúngica. Foram observados valores médios de 1402,1 e 705,28; 2406,71 e 1569,12; e, 3224,81 e 2647,91 µg/Kg para lado A e 1417,88 e 714,82; 2144,76 e 1256,19; e, 3117,3 e 1787,64 µg/Kg para lado B, de FB₁ e FB₂, após 10, 20 e 30 dias de incubação, respectivamente.

No Grupo 6 foi observado aumento nos níveis de FB₁ e FB₂, após 10, 20 e 30 dias de incubação, porém, inferiores aos detectados nas amostras do grupo 5, inoculadas somente com *F. verticillioides*. Os resultados revelaram valores médios de 855,41 e 432,48; 1428,46 e 809,86; e, 2127,50 e 1289,92 µg/Kg para lado A e 594,29 e 254,37; 1072,59 e 775,29; e, 1496,92 e 863,20 µg/Kg para lado B, de FB₁ e FB₂, em 10, 20 e 30 dias de inoculação, respectivamente.

As aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ foram analisadas nos grãos de milho dos Grupos 1, 2, 3 e 6 (ANEXO C, Tabela C.8). Semelhante ao constatado no mesmo grupo experimental, quando da pesquisa de fumonisinas, as amostras do Grupo 1 (controle) não apresentaram contaminação por aflatoxinas, porém, naquelas pertencentes ao Grupo 2 constatou-se aumento progressivo nos valores de aflatoxinas, nas amostras correspondentes ao lado A e ausência de

aflatoxinas no lado B. Os níveis médios de B₁ e B₂ encontrados no lado A foram 10,15 e 0,97; 33,28 e 4,42; e, 114,57 e 11,55 µg/Kg, após 10, 20 e 30 dias de inoculação, respectivamente.

O Grupo 3 revelou aumento nos níveis de aflatoxinas B₁ e B₂, em ambos os lados, devido à migração dos carunchos contendo esporos do fungo para o lado B, inicialmente isento de contaminação fúngica. Os valores médios de AFB₁ e AFB₂ foram de 27,66 e 1,30; 110,74 e 6,57; e, 285,96 e 15,53 µg/Kg (lado A) e 25,11 e 1,48; 106,53 e 10,44; e, 283,47 e 14,50 µg/Kg (lado B), após 10, 20 e 30 dias de inoculação, respectivamente.

O Grupo 6, formado por grãos de milho contaminados com fungos (*A. flavus* e *F. verticillioides*) e carunchos no Lado A, apresentou resultados semelhantes aos encontrados no Grupo 3. Os valores médios observados foram de 24,04 e 1,52; 113,17 e 9,44; e, 283,37 e 15,66 µg/Kg para lado A e 26,33 e 0,89; 93,52 e 10,50; e, 316,74 e 15,39 µg/Kg para lado B, de aflatoxinas B₁ e B₂, em 10, 20 e 30 dias de inoculação, respectivamente.

4.6 Análise Nutricional

A Análise Nutricional das amostras de milho, nos diferentes grupos estudados, não revelou alterações relevantes nos valores de matéria seca, fibra bruta, proteínas, extrato etéreo, cinzas, cálcio, fósforo e amido (ANEXO C, Tabela C.9).

4.7 Análise da expressão dos genes *FUM1* e *FUM19* de *F. verticillioides* por Real Time RT-PCR

As eficiências obtidas nas análises de Real Time RT-PCR quantitativas foram altas (acima de 90% para todos os genes) com *slopes* de -3,17, -3,15 e -3,13 para *TUB*, *FUM1* e *FUM19* respectivamente. Os valores de ΔC_t para *FUM1* e *FUM19* foram plotados contra o log dos valores de diluição, os gráficos obtidos geraram *slopes* de 0,02 (*FUM1* para em relação ao *TUB*) e -0,03 (*FUM19* para em relação ao *TUB*) (ANEXO A, Figura A.15 e A.16). Esses valores são considerados satisfatórios, uma vez que é preconizado um valor de *slope* entre -0,1 e 0,1 para compatibilidade das eficiências entre o gene alvo e controle endógeno. As curvas de dissociação para os produtos amplificados dos fragmentos de *FUM1*, *FUM19* e *TUB* demonstraram-se satisfatórias, uma vez que se observou a formação de um pico único quando 50% das fitas tornaram-se dissociadas (ANEXO A, Figuras A.17, A.18 e A.19). As

temperaturas de dissociação para *FUM1*, *FUM19* e *TUB* foram respectivamente: 79 °C, 83 °C e 81 °C.

Todos os tratamentos (G4, G5 e G6 - 10, 20 e 30 dias), apresentaram curva de amplificação para *FUM1* e *FUM19*. A amostra **G6, 30 dias, lado A** foi selecionada como amostra calibradora por apresentar os menores valores de expressão de *FUM1* e *FUM19*. A expressão relativa de *FUM1* variou de 46% (Grupo 5, 30 dias, lado B) a 125% (Grupo 5, 10 dias, lado B) e para *FUM19* variou de 45% (Grupo 5, 10 dias, lado B) a 136% (Grupo 5, 10 dias, lado B) (ANEXO C, Tabela C.10).

4.8 Análise da expressão dos genes *AflR* e *AflP* de *A. flavus* por Real Time RT-PCR

O sistema de escolha para a detecção dos produtos de PCR para *AflR* e *AflP* foi o *Taqman*, dispensando a etapa de curva de dissociação como no sistema SYBR Green I. Os iniciadores foram desenhados a partir das sequências depositadas no *GeneBank* (NCBI), com número de acesso L32576.1 para *AflR* e AY371490.1 para *AflP*.

As eficiências obtidas nas análises de Real Time RT-PCR quantitativas foram altas (acima de 85% para todos os genes) com *slopes* de -3,72 para *AflR* e *AflP* e -3,75 para *TUB*. Os valores de ΔC_t para *AflR* e *AflP* foram plotados contra o log dos valores de diluição, os gráficos obtidos geraram *slopes* de 0,02 (*AflR* em relação a *TUB*) e 0,075 (*AflP* em relação a *TUB*) (ANEXO A, Figuras A.20 e A.21).

Para a quantificação relativa utilizou-se como calibrador a amostra **G2, 10 dias, lado A**, que apresentou os menores níveis de expressão de *AflR* e *AflP*. A expressão relativa de *AflR* variou de 58% (Grupo 3, 10 dias, lado B) a 124% (Grupo 6, 20 dias, lado A) e para *AflP* variou de 10% (Grupo 3, 10 dias, lado B) a 155% (Grupo 2, 20 dias, lado A) (ANEXO C, Tabela C.11).

5 DISCUSSÃO

Na presente investigação, a escolha da radiação gama no processo de esterilização das amostras de grãos de milho baseou-se na eficácia da radiação ionizante, especialmente dos raios gama, no controle de fungos toxigênicos (AZIZ; ATTIA; FARAG, 1997; AZIZ e MOUSSA, 2002; AQUINO et al., 2005; FERREIRA-CASTRO et al., 2007). A escolha da dose de 20 kGy deveu-se a eficácia da referida dose demonstrada em estudos anteriores realizados com *A. flavus* e *F. verticillioides* em grãos de milho armazenados (AQUINO et al., 2005; FERREIRA-CASTRO et al., 2007).

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, como também pode retardar o amadurecimento ou maturação de certas frutas e legumes através da alteração dos processos fisiológicos dos tecidos da planta (SPOLAORE; GERMANO; GERMANO, 2003). Em nosso experimento, a ausência de fungos no Grupo 1 (Controle), confirmou a eficácia da esterilização dos grãos, sinalizando, também, que os frascos estavam hermeticamente fechados.

O peso médio das amostras nos Grupos 2 e 4 (não inoculadas com carunchos) mantiveram-se constantes, porém, nos Grupos inoculados constatou-se redução de 1,5%, 3% e 5% no peso médio das amostras, após 10, 20 e 30 dias de incubação, respectivamente. Perda de peso do milho infestado por carunchos também foi observado por Almeida Filho, Fontes e Arthur (2002), analisando diferentes variedades de milho. Os autores constataram, após 180 dias de incubação, redução entre 2,28% e 9,4% de peso.

A necessidade de água disponível para o desenvolvimento fúngico é variável, algumas espécies se desenvolvem de 0,97 até valores próximos de 0,58. É importante ressaltar que a atividade de água mínima para o crescimento dos principais fungos toxigênicos é de 0,76 (LACEY, 1988; LACEY e MAGAN, 1991; CAHAGNIER; MELCION; RICHARD-MOLARD, 1995). Em relação ao *A. flavus* e *F. verticillioides*, os valores mínimos de a_w necessários ao seu desenvolvimento são 0,78 e 0,82, respectivamente, com valores máximos em torno de 0,87 e 0,90 (LEITÃO, 1988; CAHAGNIER; MELCION; RICHARD-MOLARD, 1995).

A maioria dos fungos que infectam plantas é capaz de se desenvolver em temperaturas entre 0 °C e 30 °C. Alguns podem chegar a crescer a 35 °C e outros, próximo a temperatura de congelamento (LACEY, 1989). No caso dos fungos empregados neste experimento, valores entre 22 e 28 °C são considerados ideais para *F. verticillioides* e, de 35 °C para *A. flavus*. Já para o crescimento de carunchos *Sitophilus zeamais* as temperaturas giram em torno de 25 °C (VITAL et al., 2004). Por conta destas variáveis, para a realização do experimento, foi selecionada a temperatura de 25 °C.

A ausência de *A. flavus* e *F. verticillioides* nas amostras do lado B dos frascos inoculados apenas com os fungos (Grupos 2 e 4), indica que não houve passagem de esporos fúngicos, descartando uma possível veiculação dos esporos por meio de carunchos, ação de correntes de ar ou contato milho a milho. Tais resultados comprovaram que os carunchos veicularam os esporos para o frasco B (lado B) cujas amostras de milho foram inoculadas com *A. flavus*, *F. verticillioides* e carunchos. Nas amostras do lado B, a presença de fungos foi um indicativo de que houve passagem de esporos através dos carunchos oriundos do lado A. Por sua vez, a frequência de fungos na superfície corpórea dos carunchos obtida do Lado B, confirma a importância dos carunchos como veiculadores de esporos fúngicos e demonstrou que 10 dias de incubação foram suficientes para o isolamento de fungos em todas as amostras de grãos e insetos. Em 1995, estudos realizados por Beti, Phillips e Smalley (1995), demonstraram que carunchos *S. zeamais* se comportaram como facilitadores do crescimento de *A. flavus* e produção de aflatoxinas em grãos de milho.

Na agricultura, a ocorrência natural de micotoxinas causa sérias perdas econômicas nos diferentes setores econômicos tanto na área de produção de animal quanto na alimentação humana (PESTKA; ABOUZIED; SUTIKNO, 1995). Além disso, estes compostos podem ocasionar intoxicações agudas ou crônicas em seres humanos e animais em baixas concentrações (CAST, 2003).

A contaminação natural, de milho e derivados, por aflatoxinas e fumonisinas tem sido relatada por diversos autores (RODRIGUEZ-AMAYA e SABINO, 2002; HIROOKA et al., 1996; MALLMANN e DILKIN; 2007; MORENO et al., 2009; ROCHA et al., 2009), que apontaram as citadas toxinas como as mais frequentes em grãos de milho, no Brasil.

Nos grupos experimentais, a média de produção foi maior naqueles onde foram inoculados fungos e carunchos quando comparados aos grupos tratados apenas com fungos. Além disso, foi observado que a associação dos dois fungos e os carunchos (G6) interferiu na produção de fumonisinas em comparação ao grupo tratado apenas com o *F. verticillioides* e

carunchos (G5), demonstrando uma possível interferência do *A. flavus* na produção de fumonisinas pelo *F. verticillioides*. Porém foi indiferente na análise das aflatoxinas, onde o grupo 6 apresentou valores semelhantes ao grupo 3, onde as amostras foram tratadas com *A. flavus* e carunchos (ANEXO C, Tabela C.8). Também foi observado que os valores médios de fumonisinas no lado B foi menor nas amostras do Grupo 6 quando comparadas ao Grupo 5 (ANEXO C, Tabela C.7), o que pode estar relacionado a uma maior eficiência do caruncho em carrear esporos de *A. flavus*. Segundo Pit e Hocking (1997), a superfície dos conídios de *A. flavus* é rugosa, o que pode ser um fator que favoreceu a adesão dos esporos do fungo.

Na literatura, há registros da interação entre o *A. flavus* e ácaros *Tyrophagus putrescentiae*. Segundo o autor, Franzolim et al. (1999), a presença do fungo favoreceu o crescimento dos ácaros e estes foram eficientes na dispersão de estruturas fúngicas. Beti, Phillips e Smalley (1995), relataram a eficiência de carunchos *S. zeamais* em carrear esporos de *A. flavus* no exoesqueleto em amostras de grãos de milho.

Ao compararmos os Grupos 4 e 5, onde verificamos, respectivamente, a ausência e presença de carunchos, nas amostras de grãos de milho inoculados com *F. verticillioides* podemos observar que a presença do caruncho (Grupo 5) favoreceu uma maior produção de fumonisinas nas amostras, dentro das mesmas condições. Isto porque o caruncho atua provocando lesões na superfície dos grãos que favorecem o desenvolvimento fúngico e, conseqüentemente, a produção de micotoxinas; Fandohan et al. (2005) também descreveram em seus estudos uma correlação positiva entre danos mecânicos provocados por insetos e desenvolvimento de fungos do gênero *Fusarium* em sistemas de armazenamento.

Da mesma forma que nos Grupos 4 e 5, tratados com *F. verticillioides*, onde o grupo 5 produziu maiores quantidades de toxina, quando comparado ao Grupo 4, nos mesmos tempos de inoculação, os Grupos 2 e 3, demonstraram valores maiores de toxinas no Grupo 3, devido a presença do caruncho. Estes resultados se assemelham aos de Beti, Phillips e Smalley (1995), onde os pesquisadores demonstraram que carunchos *S. zeamais* se comportaram com facilitadores do crescimento de *A. flavus* e produção de aflatoxinas em grãos de milho.

Durante o período de armazenamento, o milho fica susceptível a perdas resultantes da invasão de uma variedade de insetos e microorganismos. A infecção dos grãos por fungos de armazenamento reduz a capacidade de germinação, fungos visíveis a olho nú, descoloração, odores desagradáveis, perda de matéria seca, mudanças químicas e nutricionais, e redução da qualidade e produção (SANCHIS et al., 1982). Uma população de insetos dentro da massa de grãos, se não for controlada a tempo, pode criar condições de umidade e temperatura

localizadas que estimulem o rápido desenvolvimento fúngico, podendo ocorrer deterioração da massa de grãos e produção de micotoxinas (SINHA e SINHA, 1992).

Muitos autores correlacionam a presença de fungos e carunchos em grãos armazenados, sugerindo que estes insetos possam participar como vetores mecânicos de estruturas fúngicas viáveis de um ambiente contaminado para um ambiente livre de contaminações. No presente estudo, as amostras foram contaminadas artificialmente com uma suspensão de esporos fúngicos de *A. flavus* e *F. verticillioides* e carunchos *S. zeamais* segundo o esquema de inoculação. A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) constituiu uma importante ferramenta empregada para comprovar estes dados descritos na literatura.

A microscopia eletrônica de varredura oferece melhor resolução, maior aumento, maior profundidade de campo e maior versatilidade que o emprego da microscopia óptica (GOODHEW e HUMPHREYS, 1988). É uma ferramenta útil que permite o detalhamento da visualização das estruturas fúngicas no substrato, bem como do desenvolvimento fúngico.

A literatura cita uma série de trabalhos sobre a qualidade nutricional de grãos na presença de insetos. O valor nutritivo de grãos de milho em função do ataque de insetos foi descrito por Vilela et al. (1988). Neste experimento as amostras foram coletadas a cada 4 meses, no decorrer de um ano. Foi observada uma redução nos valores de carboidratos e aumento nos valores de lipídeos e proteína bruta, devido ao fato dos insetos se alimentarem de endosperma, que é mais rico em proteína e óleo. Tais achados podem estar relacionados ao baixo número de insetos inoculados e/ou curto período de inoculação.

Na análise da expressão dos genes *FUM1* e *FUM19* de *F. verticillioides* por *Real Time RT-PCR* foi observado um decréscimo na expressão dos genes com o passar do período de incubação (10, 20 e 30 dias), exceto para as amostras pertencentes ao Grupo 4 (ANEXO A, Figuras A.22 e A.23). Com base nestes dados pode-se fazer uma correlação inversa entre o decréscimo da expressão dos genes e o aumento dos níveis de fumonisinas com o decorrer do período de incubação (10, 20 e 30 dias) (ANEXO C, Tabela C.10). Tais achados podem ser atribuídos a uma provável competição entre os fungos, decorrente da redução da oferta de substrato com o passar do período de incubação, resultando em uma menor expressão dos genes. Resultados semelhantes foram obtidos por Mayer, Faber e Geisen (2003), onde foi realizada uma correlação entre o gene *nor-1* e a produção de aflatoxinas. Os autores observaram um aumento na expressão dos genes nos primeiros dias (4 a 6 dias), contudo após

8 dias foi verificado um decréscimo na expressão, porém a produção de aflatoxinas teve um crescimento exponencial no decorrer dos dias. Já López-Errasquin et al. (2007), observaram uma correlação positiva na expressão de *FUM1* e *FUM19* para a produção de fumonisinas.

O mesmo não se aplica às análises da expressão dos genes *AflR* e *AflP* de *A. flavus*, onde foi observada uma grande variação da expressão dos genes transcritos (ANEXO A, Figuras A.24 e A.25). A expressão dos genes *AflR* variou nos diferentes períodos de inoculação e tratamentos não permitindo realizar nenhuma correlação com os valores de aflatoxinas (ANEXO C, Tabela C.11); na expressão dos genes *AflP* destaca-se uma maior expressão do gene nas amostras pertencentes ao Grupo 4, em relação aos demais tratamentos, em todos os períodos de inoculação.

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 (Coleoptera: 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: Acirbia, 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.

FANDOCHAN, 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. Toxicity and carcinogenicity 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, Cambridge: 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, mycotoxins 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 Transkei. **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 avicultura. **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.

ANEXO A – FIGURAS

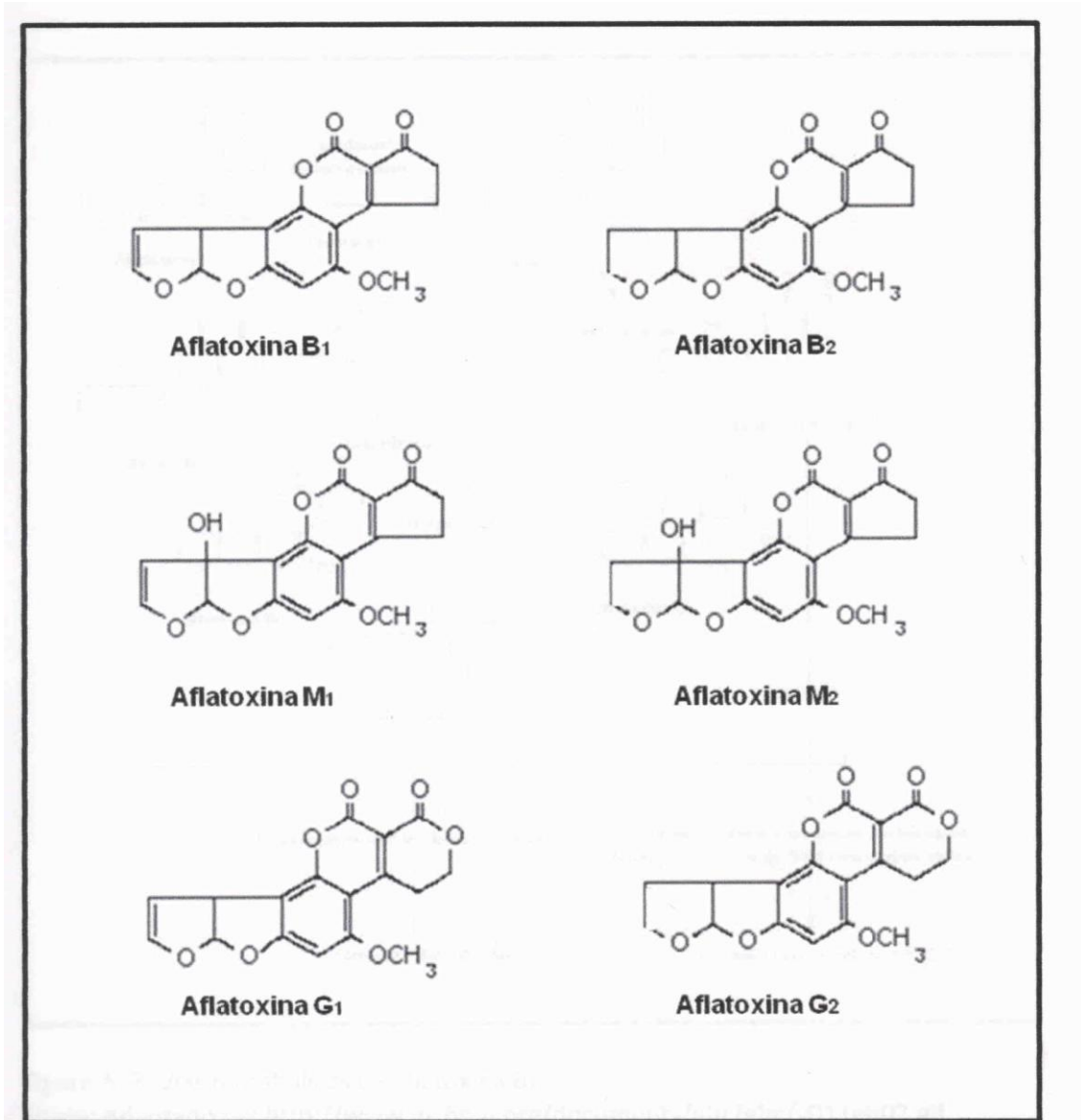


Figura A. 1 - Estrutura Química das Aflatoxinas
Fonte: Adaptado de: HUSSEIN e BRASEL, 2001.



Figura A. 2 - Características macro e micromorfológicas de *A. flavus*

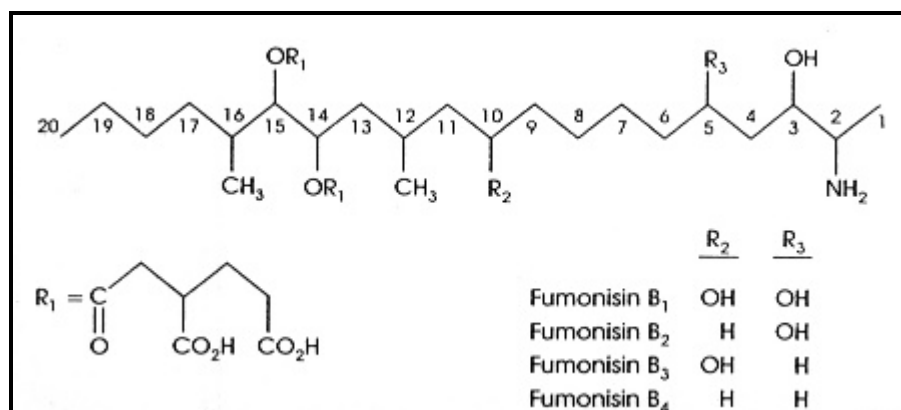


Figura A. 3 - Estrutura Química das Fumonisinias

Fonte: Desjardins et al., 1996.

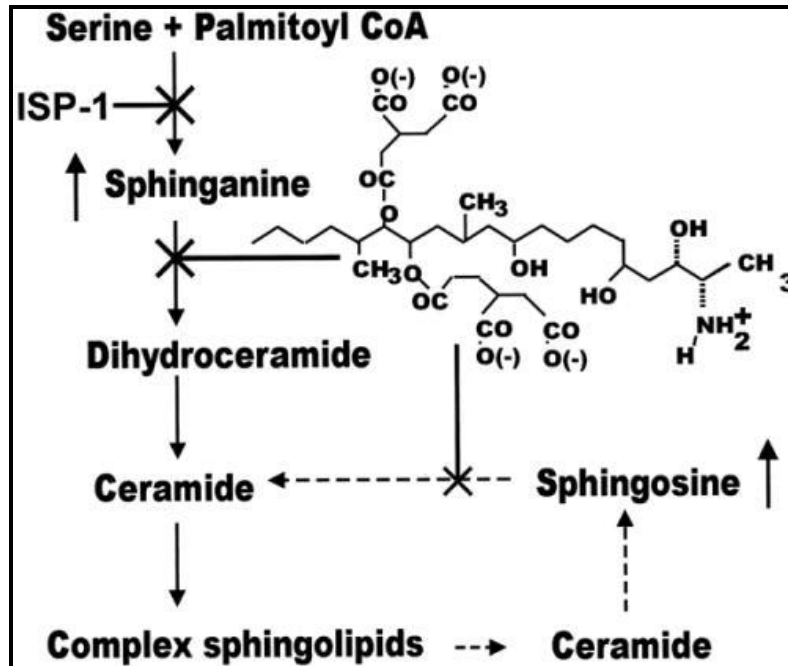


Figura A. 4 - Inibição da biossíntese de esfingolípídeos
 Fonte: Enongene et al., 2002.

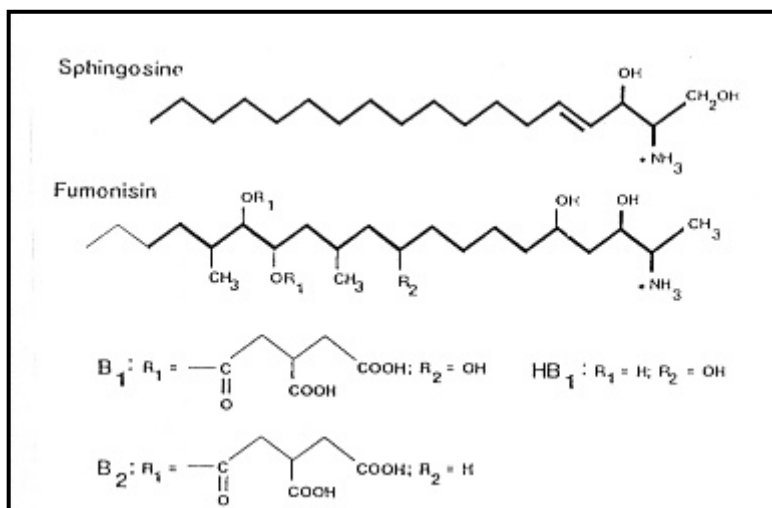


Figura A. 5 - Semelhança da estrutura química da fumonisina e esfingosina
 Fonte: Norred et al., 1992.

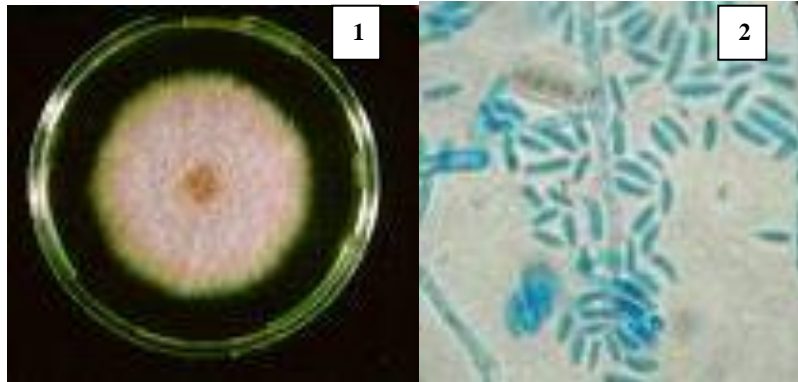


Figura A. 6 - Características macro e micromorfológicas de *F. verticillioides*

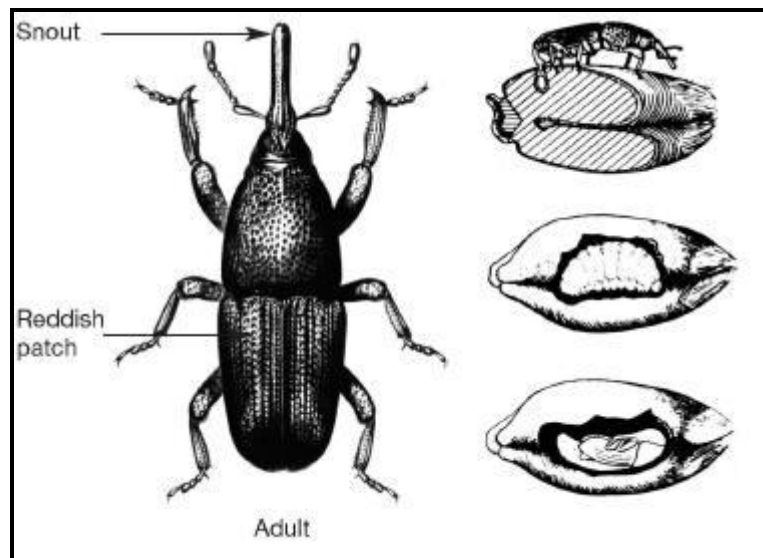


Figura A. 7 - Caruncho *Sitophilus zeamais*
Fonte: Food Quality Control [(2011)].



Figura A. 8 - Irradiador tipo Gammacell (Centro de Tecnologia das Radiações – IPEN)

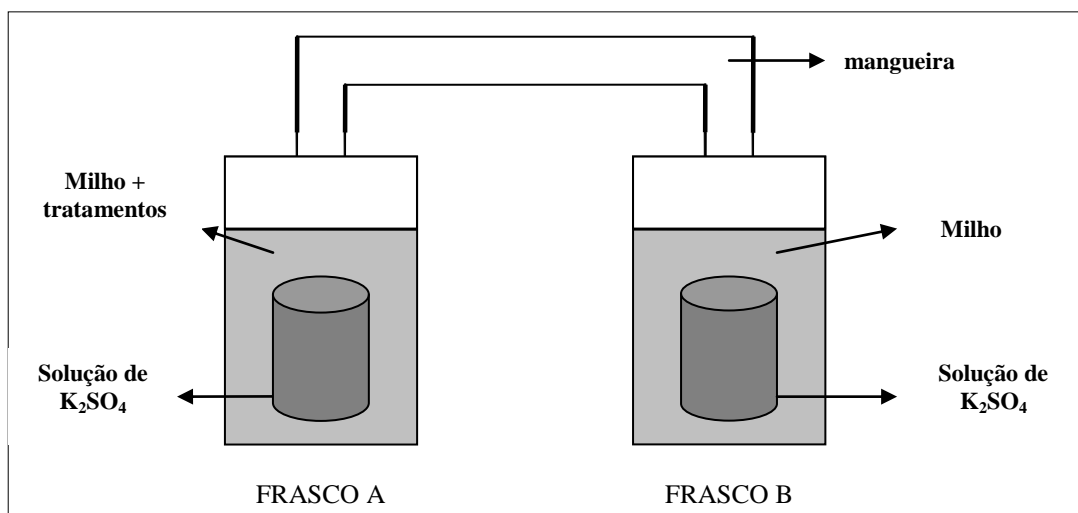


Figura A. 9 - Sistema desenvolvido para estudo da interação

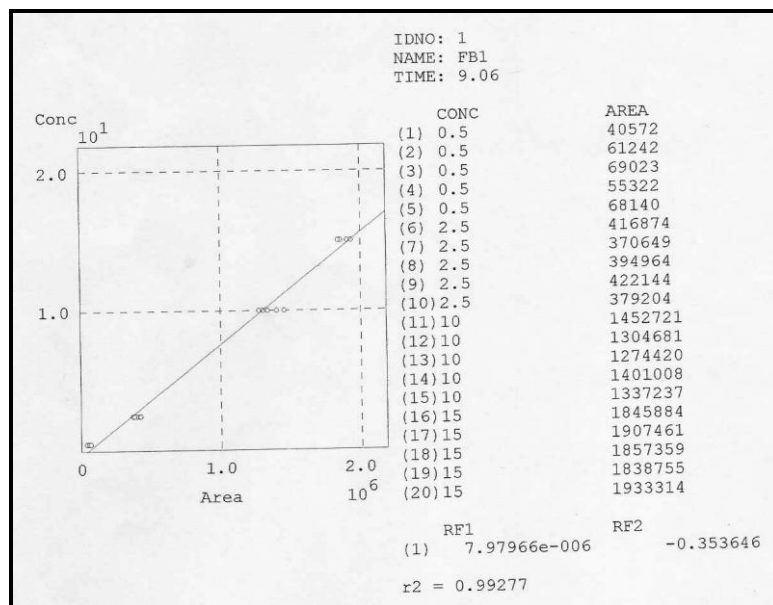


Figura A. 10 - Curva padrão de fumonisina B₁

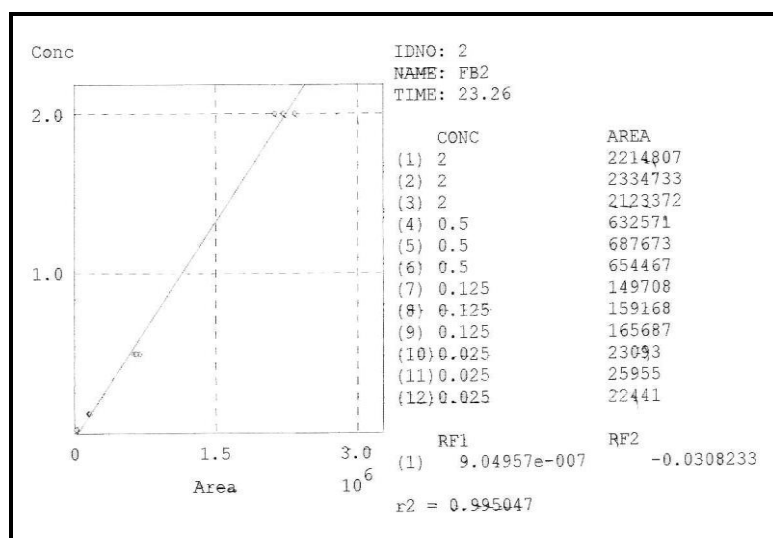


Figura A. 11 - Curva padrão de fumonisina B₂

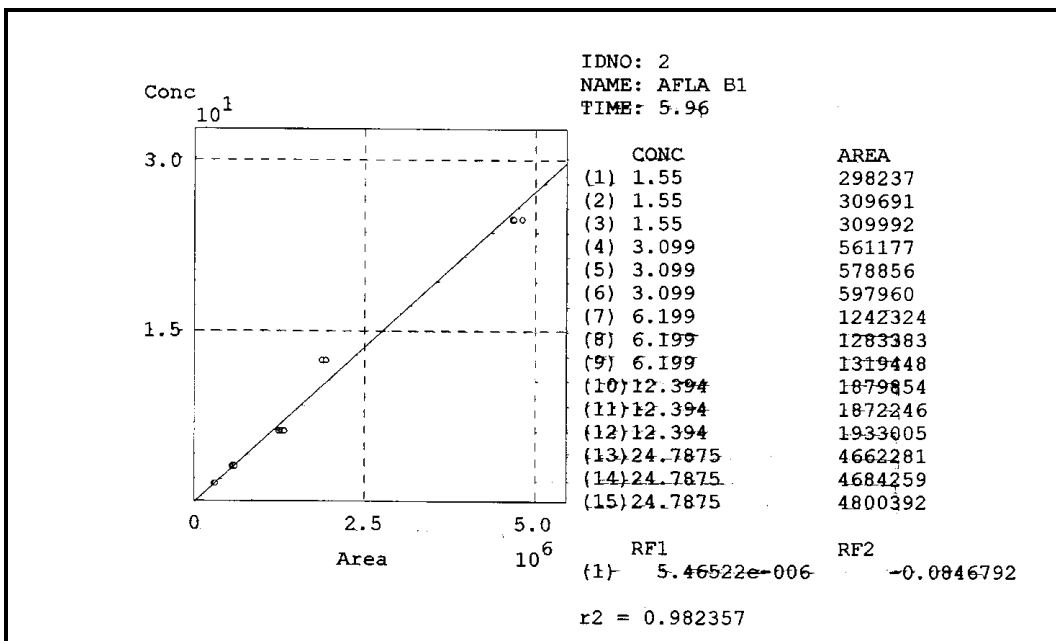


Figura A. 12 - Curva padrão de aflatoxina B₁

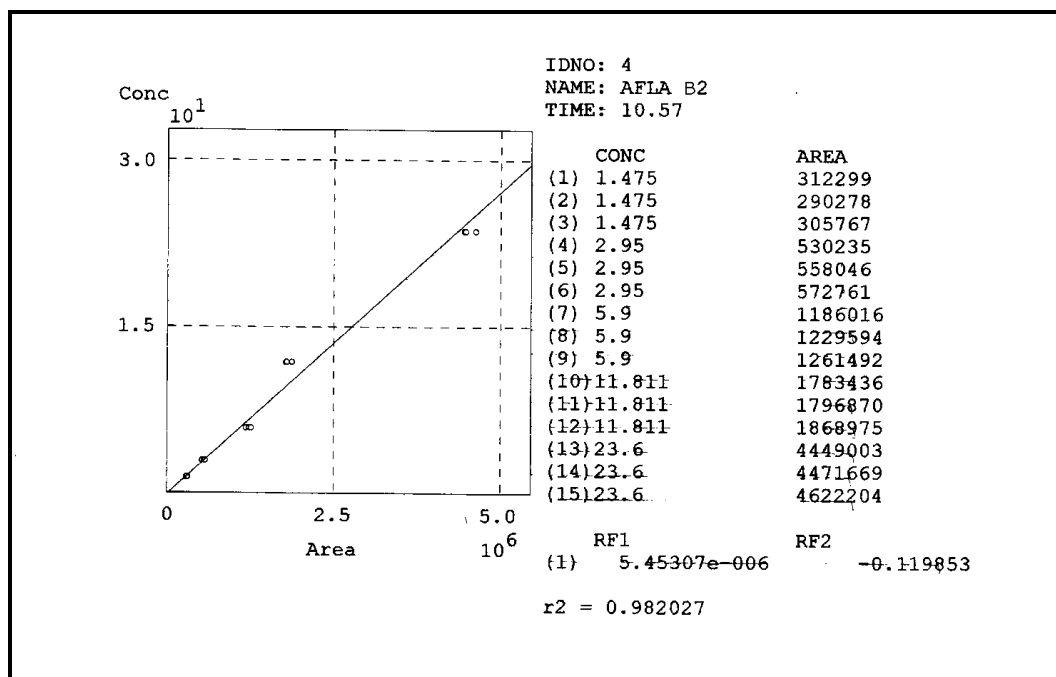
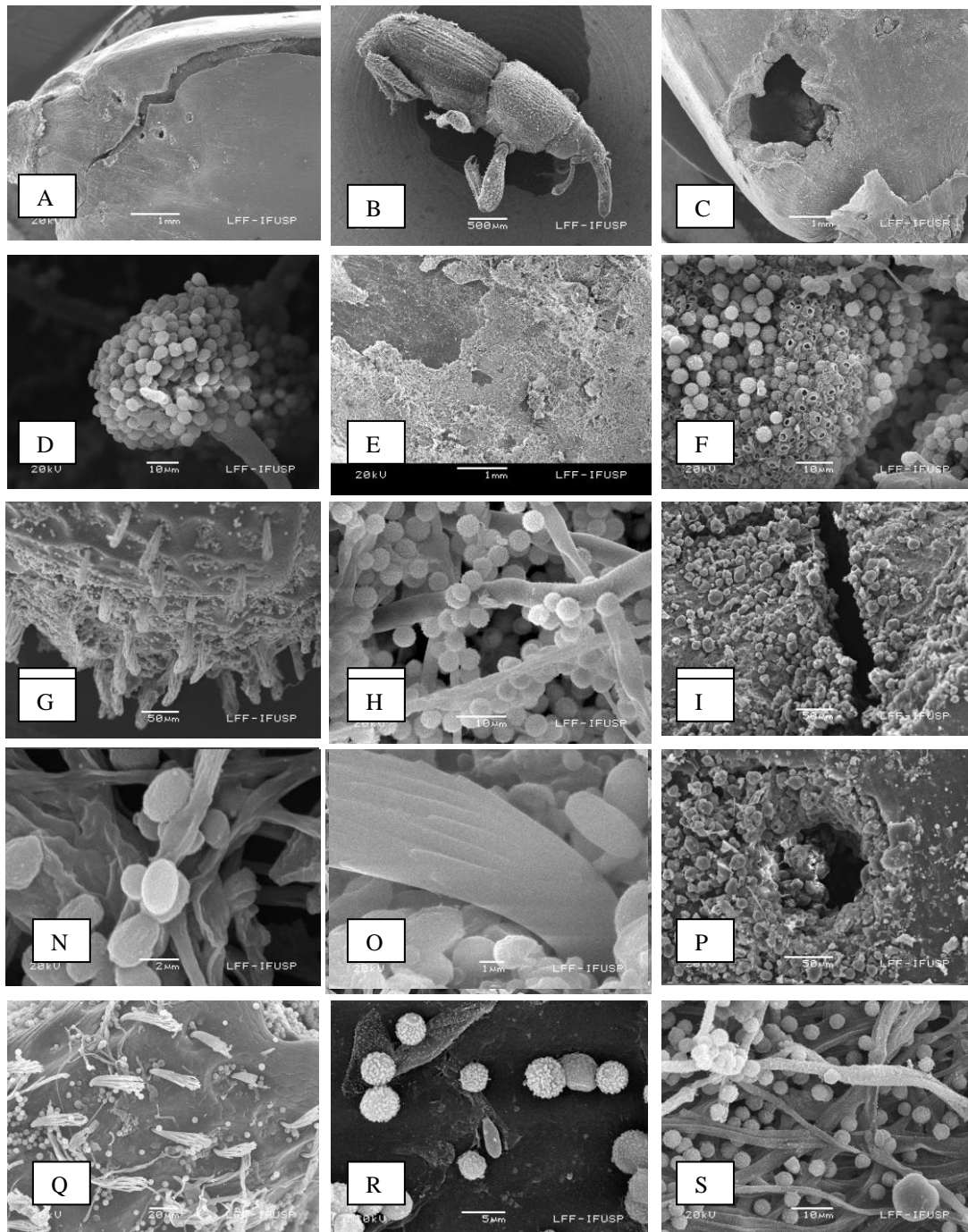
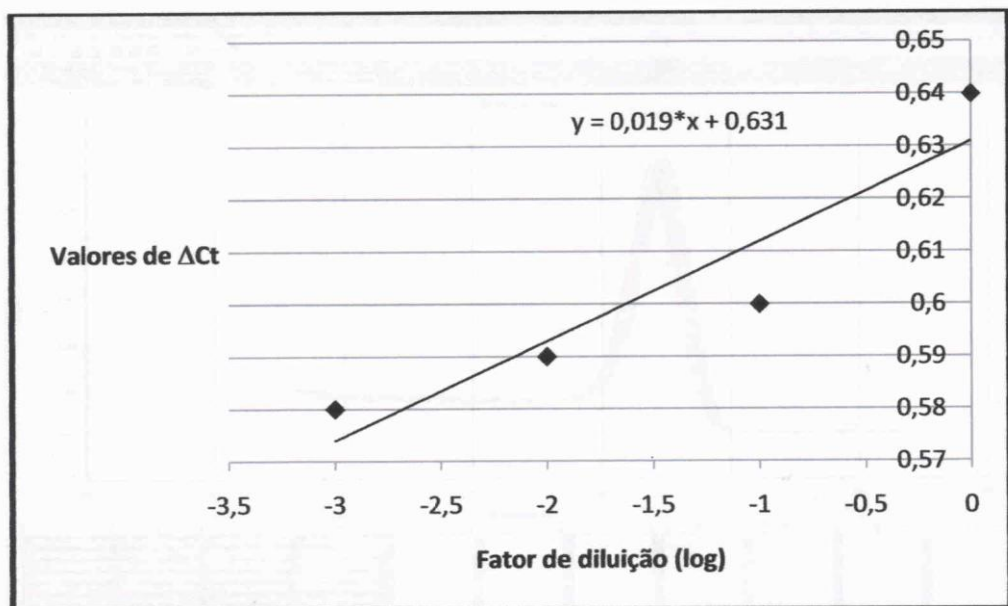


Figura A. 13 - Curva padrão de aflatoxina B₂



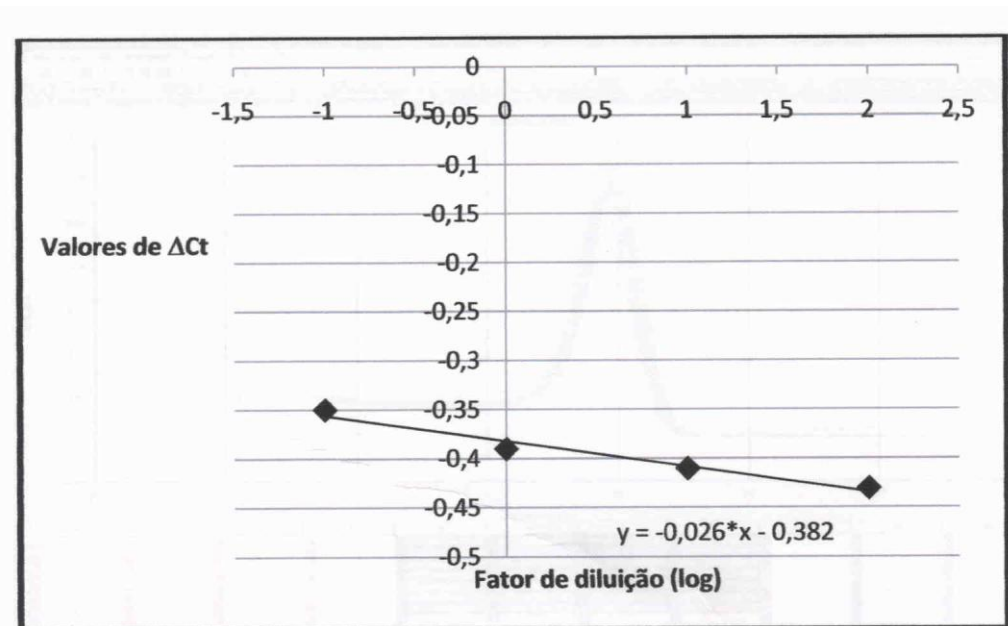
Onde, Grupo 1 (A: milho com 10 dias de inoculação, B: caruncho e C: milho com 30 dias de inoculação); Grupo 2 (D: *Aspergillus flavus*, E milho com 20 dias de inoculação e F: milho com 30 dias de inoculação); Grupo 3 (G: superfície corpórea do caruncho recoberto com *A. flavus*, H: milho com *A. flavus* inoculado por 20 dias, I: milho com 30 dias de inoculação); Grupo 4 (J: esporos de *F. verticillioides*, L: milho com 20 dias de inoculação, M: milho com 30 dias de inoculação); Grupo 5 (N: *F. verticillioides* em milho, O: esporos de *F. verticillioides* em caruncho, P: milho com 30 dias de inoculação); Grupo 6 (Q: Superfície do caruncho com esporos de ambas espécies fúngicas, R: esporos de ambas espécies fúngicas em grão de milho, S: Milho com 30 dias de inoculação).

Figura A. 14 - Microscopia Eletrônica de Varredura



*Slope = 0,019; ~ 0,02.

Figura A. 15 - Gráfico da eficiência obtida entre o gene alvo (FUM1) e controle endógeno (TUB), com slope variando de -0,1 a 0,1.



*Slope = - 0,026; ~ - 0,03.

Figura A. 16 - Gráfico da eficiência obtida entre o gene alvo (FUM19) e controle endógeno (TUB), com slope variando de -0,1 a 0,1.

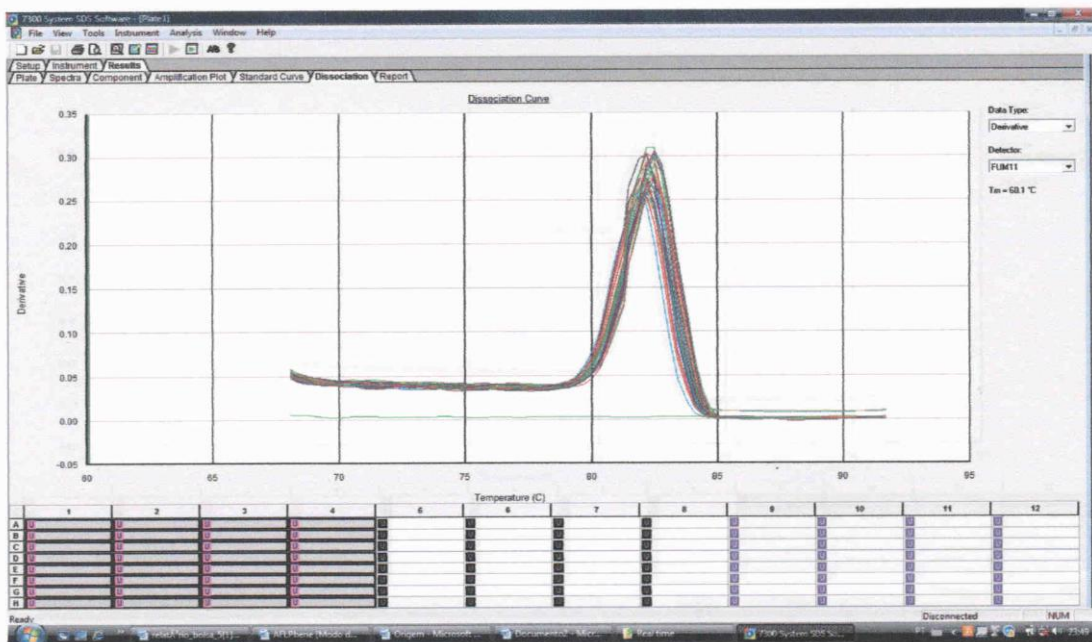


Figura A. 17 - Curva de dissociação obtida para FUM1, com temperatura de melting (Tm) de 83 °C, para a verificação da especificidade dos produtos de amplificação gerados pela reação de real time RT-PCR.

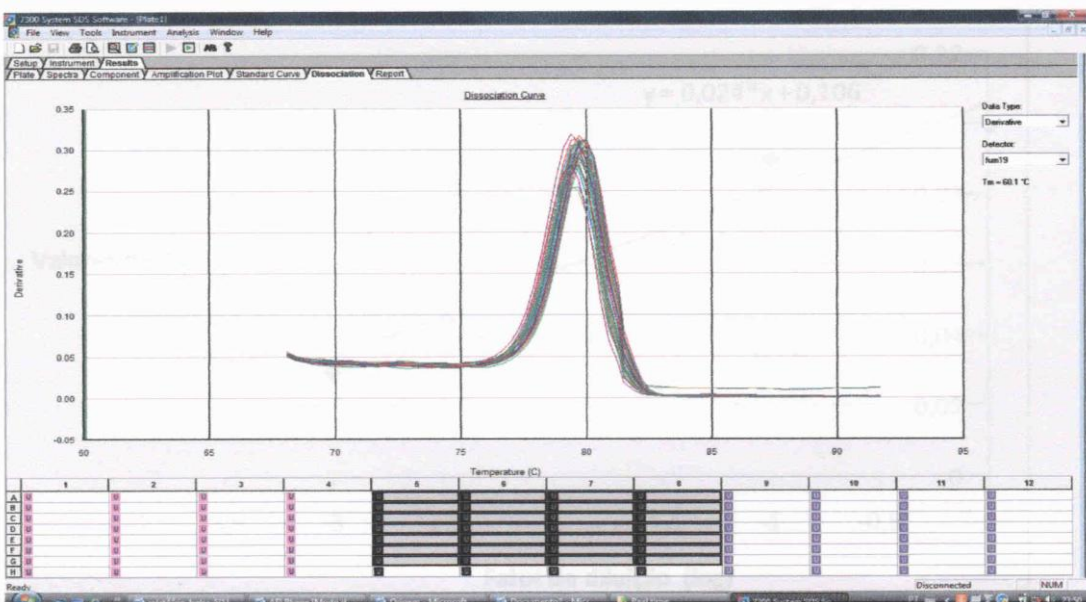


Figura A. 18 - Curva de dissociação obtida para FUM19, com temperatura de melting (Tm) de 79 °C, para a verificação da especificidade dos produtos de amplificação gerados pela reação de real time RT-PCR.

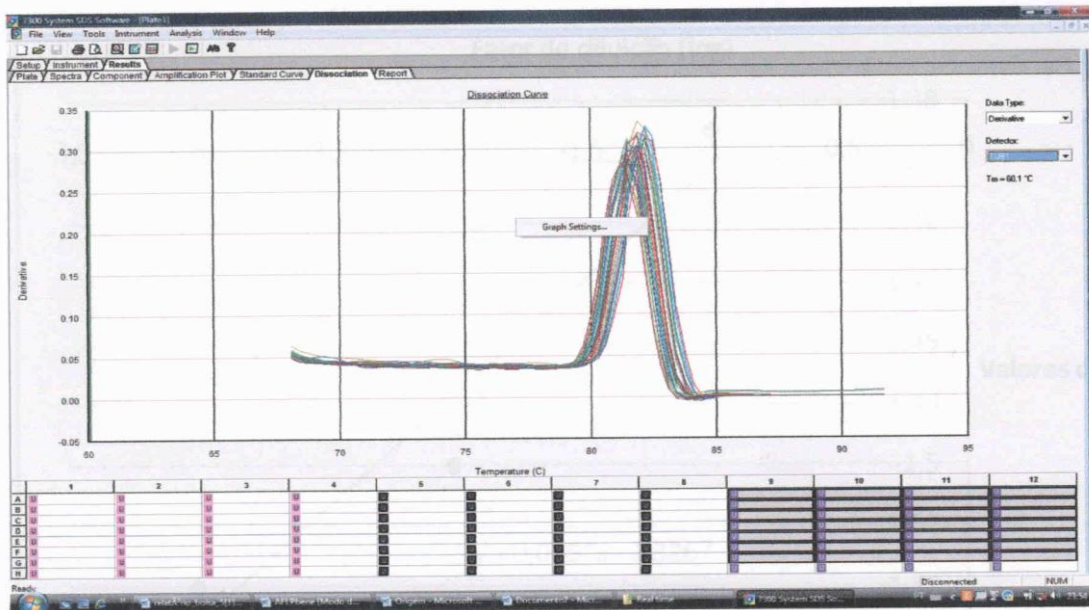


Figura A. 19 - Curva de dissociação obtida para *TUB*, com temperatura de *melting* (T_m) de 81 °C, para a verificação da especificidade dos produtos de amplificação gerados pela reação de *real time RT-PCR*

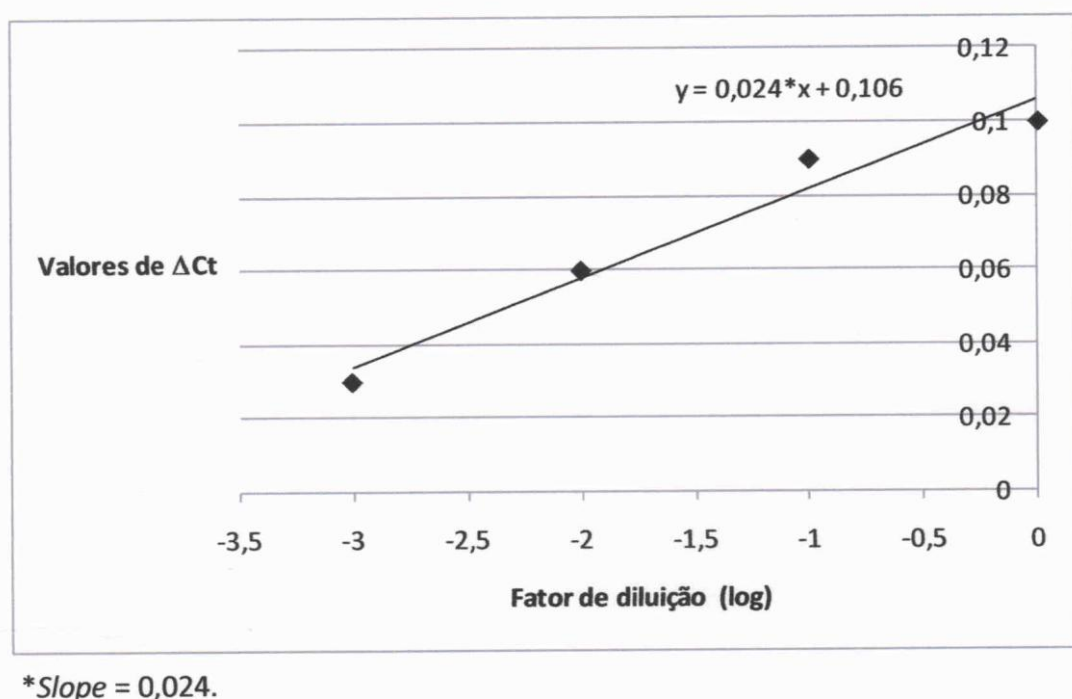


Figura A. 20 - Gráfico da eficiência obtida entre o gene alvo (*AflR*) e controle endógeno (*TUB*), com *slope* variando de -0,1 a 0,1

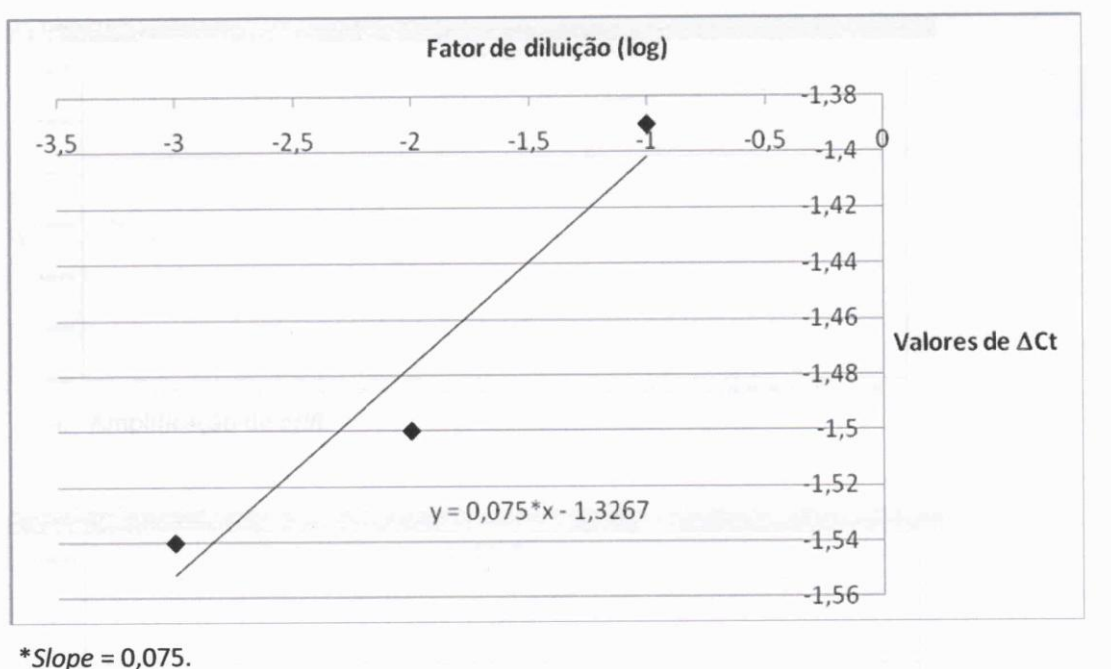


Figura A. 21 - Gráfico da eficiência obtida entre o gene alvo (*AflP*) e controle endógeno (*TUB*), com *slope* variando de -0,1 a 0,1

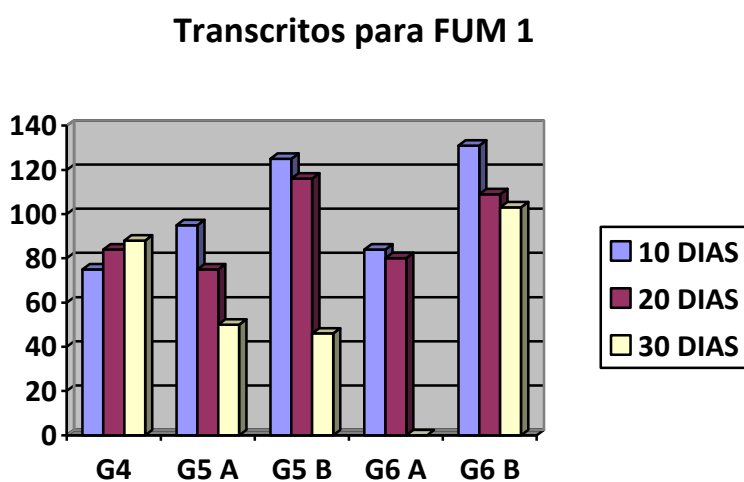


Figura A. 22 - Quantificação relativa dos níveis de transcritos para o gene *FUM1*

Transcritos para FUM 19

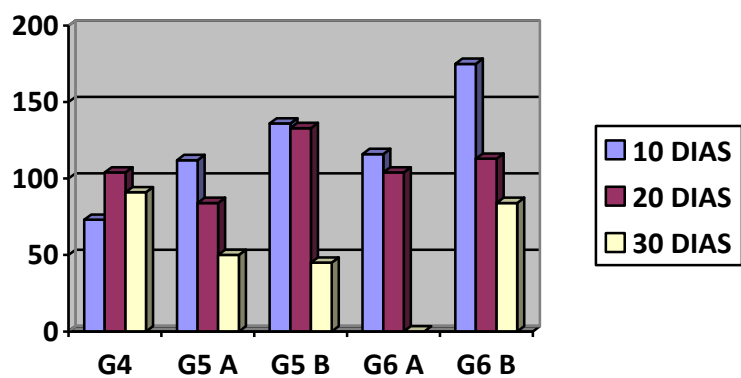


Figura A. 23 - Quantificação relativa dos níveis de transcritos para o gene *FUM19*

Transcritos para AfIR

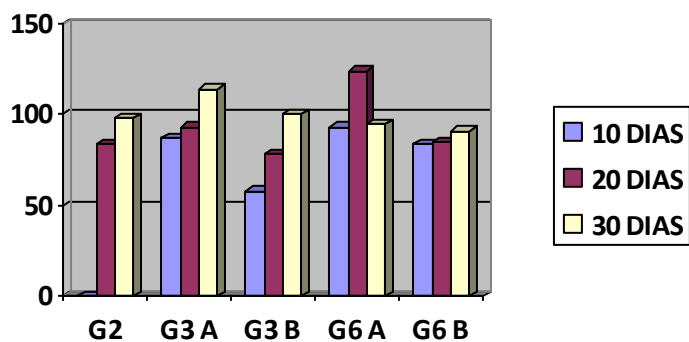


Figura A. 24 - Quantificação relativa dos níveis de transcritos para *AfIR*

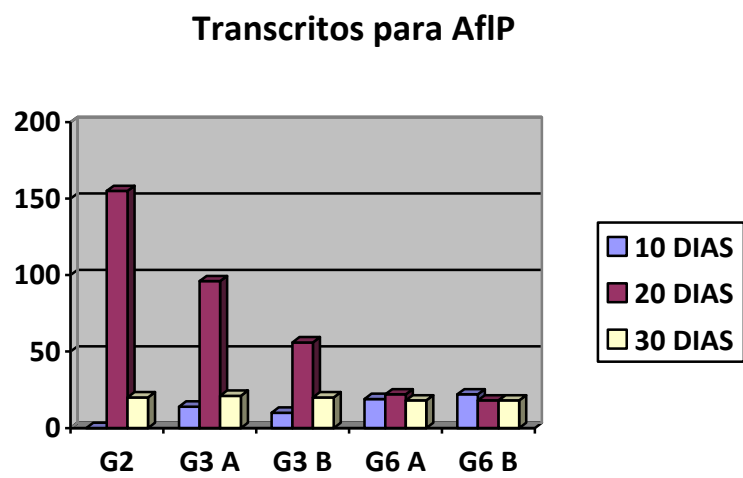


Figura A. 25 - Quantificação relativa dos níveis de transcritos para *AfIP*

ANEXO B – QUADROS

Quadro B. 2 - Temperaturas necessárias para o crescimento e produção de micotoxinas das principais espécies toxigênicas do gênero *Aspergillus*

Fungo	Temperatura (T °C)	
	Faixa de crescimento	Faixa ótima de crescimento
<i>A. flavus</i>	6-45	35
<i>A. parasiticus</i>	6-45	35-37
<i>A. clavatus</i>	10-37	25
<i>A. alutaceus</i>	10-35	25
<i>A. versicolor</i>	4-39	25-30
<i>A. fumigatus</i>	10-55	40-42

Fonte: Lacey et al., (1991); Leitão (1988).

Quadro B. 3 - Valores de atividade de água em diferentes substratos e valores mínimos para o desenvolvimento de alguns fungos.

Aa	Substratos e Fungos
1,0	Água pura
0,99	Meios micológicos clássicos
0,98	Água do mar
0,97	<i>Penicillium veridicatum</i> e a maioria dos fungos de madeira
0,95	Pães e alguns basidiomicetos
0,92	<i>Rhizopus</i> spp.
0,90	Presunto, <i>Neurospora crassa</i> , <i>Trichotecium roseum</i>
0,87	<i>Fusarium verticillioides</i>
0,85	<i>Saccharomyces rouxii</i> em solução salina, salame
0,80	<i>Aspergillus flavus</i> e <i>Penicillium citrinum</i>
0,75	Solução saturada de cloreto de sódio e <i>Aspergillus candidus</i>
0,65	Glicerol 22 molar
0,60	<i>S. rouxii</i> (em solução com açúcar) e <i>Monascus</i>
0,58	Esporos de algumas espécies de <i>Eurotium</i> , <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> , capazes de sobreviver por alguns anos
0,55	Solução de glicose saturada e DNA desnaturado
0,48	Vales áridos do Continente Antártico

Fonte: Carlile e Watkinson (1994); Leitão (1988).

Quadro B. 4 - Níveis mínimos de atividade de água necessários para o crescimento e produção de micotoxinas das principais espécies toxigênicas do gênero *Aspergillus*.

Fungo	Atividade de Água (Aa) mínima		
	Crescimento	Produção de micotoxinas	Micotoxinas produzidas
<i>A. flavus</i>	0,78-0,80	0,83-0,87	Aflatoxinas
<i>A. parasiticus</i>	0,78-0,82	0,87	Aflatoxinas
<i>A. clavatus</i>	0,85	0,99	Patulina
<i>A. alutaceus</i>	0,76-0,83	0,83-0,87	Ocratoxinas
<i>A. versicolor</i>	0,78	ND	Patulina, Esterigmatocistina
<i>A. fumigatus</i>	0,82-0,94	ND	Fumigatoxina, Gliotoxina

Fonte: Lacey et al., (1991); Leitão (1988).

Quadro B. 5 - Temperaturas necessárias para o crescimento e produção de micotoxinas das principais espécies toxigênicas do gênero *Fusarium* spp.

Fungo	Temperatura (T °C)	
	Faixa de crescimento	Faixa ótima de crescimento
<i>F. graminearum</i>	ND	24-26
<i>F. moniliforme</i>	2-37	22-28
<i>F. poae</i>	2-39	22-28
<i>F. sporotrichioides</i>	2-35	22-28

Fonte: Leitão, (1988); Lacey et al. (1991); Cahagnier et al. (1995).

Quadro B. 6 - Níveis mínimos de atividade de água necessários para o crescimento e produção de micotoxinas das principais espécies toxigênicas do gênero *Fusarium* spp.

Fungo	Atividade de Água (Aa) mínima		
	Crescimento	Produção de micotoxinas	Micotoxinas produzidas
<i>F. graminearum</i>	0,89	0,98-0,99	zearalenona, DON, DAS, moniliformina
<i>F. moniliforme</i>	0,87	0,90	Fumonisina, zearalenona, moniliformina, T-2, DAS
<i>F. poae</i>	0,89	1,0	T-2 e HT-2, nivalenol, DAS
<i>F. sporotrichioides</i>	0,86-0,88	ND	Zearalenona, nivalenol, T-2, DON, DAS

Fonte: Leitão, (1988); Lacey et al. (1991); Cahagnier et al. (1995).

ANEXO C – TABELAS

Tabela C. 1 - Preparação das soluções para a curva de calibração

Soluções calibradoras	Volume retirado da solução de FB ₁ e FB ₂ (µL)	Concentração final (mg/Kg) das soluções calibradoras e concentração das soluções após derivação com OPA			
		FB ₁		FB ₂	
		Solução de trabalho	Solução após derivação	Solução de trabalho	Solução após derivação
1	25	0,05	0,025	0,025	0,0125
2	125	0,25	0,125	0,125	0,0625
3	500	1,00	0,500	0,50	0,250
4	2000	4,00	2,000	2,000	1,000

Tabela C. 2 - Concentração das soluções para a curva de calibração (ng/mL)

Soluções calibradoras	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
1	28,50	23,62	24,78	23,60
2	14,25	11,81	12,39	11,81
3	7,12	5,90	6,20	5,90
4	3,56	2,95	3,10	2,95
5	1,78	1,47	1,55	1,47

Tabela C. 3 - Peso das amostras de grãos de milho, nos diferentes tratamentos, após 10, 20 e 30 dias de incubação

GRUPO	AMOSTRA	LADO A	LADO A	LADO A	LADO B	LADO B	LADO B
		10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS	10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS
1	1	197,5	193,2	186,3	197,3	193,7	192,6
	2	196,5	195,4	191,8	197,2	192,4	191,5
	3	195,4	193,2	190,9	195,9	193,5	189,7
	4	197,5	191,5	191,9	197,2	194,9	189,2
	5	198,5	196,9	191,6	198,1	193,1	188,4
	Média	197,1	194,0	190,5	197,1	193,5	190,3
	Desvio padrao	1,2	2,1	2,4	0,8	0,9	1,7
GRUPO	AMOSTRA	LADO A	LADO A	LADO A	LADO B	LADO B	LADO B
		10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS	10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS
2	1	200	200	200	200	200	200
	2	200	200	200	200	200	200
	3	200	200	200	200	200	200
	4	200	200	200	200	200	200
	5	200	200	200	200	200	200
	Média	200	200	200	200	200	200
	Desvio padrao	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
GRUPO	AMOSTRA	LADO A	LADO A	LADO A	LADO B	LADO B	LADO B
		10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS	10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS
3	1	198,1	193,2	194,1	199	191,7	183,2
	2	197,3	191,5	191,3	197,8	191,4	187,4
	3	198,4	192,8	189,7	196,9	191,2	191,2
	4	198,2	192,5	188,5	199,1	194,5	188,3
	5	198	193,7	188,7	199,3	193,1	189,1
	Média	198,0	192,7	190,5	198,4	192,4	187,8
	Desvio padrao	0,4	0,8	2,3	1,0	1,4	3,0
GRUPO	AMOSTRA	LADO A	LADO A	LADO A	LADO B	LADO B	LADO B
		10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS	10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS
4	1	200	200	200	200	200	200
	2	200	200	200	200	200	200
	3	200	200	200	200	200	200
	4	200	200	200	200	200	200
	5	200	200	200	200	200	200
	Média	200	200	200	200	200	200
	Desvio padrao	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
GRUPO	AMOSTRA	LADO A	LADO A	LADO A	LADO B	LADO B	LADO B
		10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS	10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS
5	1	196,3	193,1	186,9	198,9	193,7	187,3
	2	197,2	192,4	189,3	199,1	192,8	188,9
	3	198,4	193,7	188,4	197,7	194,3	186,2
	4	197,4	196,2	188,7	198,2	193,9	188,4
	5	196,2	195,1	190,2	197,3	194,2	189,2
	Média	197,1	194,1	188,7	198,2	193,8	188,0
	Desvio padrao	0,9	1,5	1,2	0,8	0,6	1,2
GRUPO	AMOSTRA	LADO A	LADO A	LADO A	LADO B	LADO B	LADO B
		10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS	10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS
6	1	197,2	193,2	186,2	197,2	195,1	183,5
	2	198,3	192,7	187,9	199,1	193,2	182,9
	3	196,7	193,4	188,3	197,2	192,7	181,2
	4	197,2	191,2	188,1	198,8	193,5	187,7
	5	198,4	194,7	189,2	197,1	192,7	189,2
	Média	197,6	193,0	187,9	197,9	193,4	184,9
	Desvio padrao	0,8	1,3	1,1	1,0	1,0	3,4

Tabela C. 4 - Atividade de água das amostras de grãos de milho, nos diferentes tratamentos, após 10, 20 e 30 dias de incubação

GRUPO	AMOSTRA	LADO A	LADO A	LADO A	LADO B	LADO B	LADO B
		10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS	10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS
1	1	0,83	0,83	0,87	0,83	0,86	0,88
	2	0,81	0,86	0,82	0,81	0,83	0,86
	3	0,89	0,81	0,82	0,86	0,84	0,81
	4	0,85	0,84	0,84	0,83	0,81	0,83
	5	0,85	0,82	0,84	0,82	0,84	0,83
	Média	0,85	0,83	0,84	0,83	0,84	0,84
	Desvio padrao	0,030	0,019	0,020	0,019	0,018	0,028
2	1	0,82	0,83	0,88	0,86	0,88	0,87
	2	0,82	0,83	0,8	0,82	0,85	0,89
	3	0,82	0,84	0,81	0,87	0,84	0,88
	4	0,83	0,84	0,79	0,85	0,81	0,83
	5	0,82	0,82	0,83	0,83	0,86	0,87
	Média	0,82	0,83	0,82	0,85	0,85	0,87
	Desvio padrao	0,004	0,008	0,036	0,021	0,026	0,023
3	1	0,83	0,89	0,88	0,85	0,79	0,81
	2	0,85	0,85	0,83	0,86	0,83	0,84
	3	0,88	0,89	0,81	0,85	0,82	0,82
	4	0,86	0,85	0,83	0,86	0,85	0,84
	5	0,87	0,83	0,82	0,8	0,84	0,83
	Média	0,86	0,86	0,83	0,84	0,83	0,83
	Desvio padrao	0,019	0,027	0,027	0,025	0,023	0,013
4	1	0,83	0,83	0,88	0,79	0,83	0,86
	2	0,82	0,84	0,85	0,82	0,85	0,83
	3	0,81	0,83	0,81	0,81	0,86	0,85
	4	0,83	0,83	0,82	0,83	0,81	0,81
	5	0,82	0,82	0,84	0,84	0,83	0,84
	Média	0,82	0,83	0,84	0,82	0,84	0,84
	Desvio padrao	0,008	0,007	0,027	0,019	0,019	0,019
5	1	0,85	0,82	0,82	0,86	0,84	0,83
	2	0,82	0,83	0,83	0,83	0,83	0,85
	3	0,82	0,83	0,84	0,81	0,82	0,83
	4	0,81	0,85	0,83	0,84	0,81	0,83
	5	0,85	0,81	0,81	0,85	0,85	0,81
	Média	0,83	0,83	0,83	0,84	0,83	0,83
	Desvio padrao	0,019	0,015	0,011	0,019	0,016	0,014
6	1	0,85	0,83	0,83	0,83	0,86	0,84
	2	0,82	0,82	0,84	0,83	0,84	0,81
	3	0,82	0,84	0,82	0,84	0,82	0,83
	4	0,83	0,82	0,84	0,81	0,85	0,82
	5	0,85	0,85	0,83	0,83	0,83	0,81
	Média	0,83	0,83	0,83	0,83	0,84	0,82
	Desvio padrao	0,015	0,013	0,008	0,011	0,016	0,013

Tabela C. 5 - Microbiota fúngica das amostras de grãos de milho, nos grupos G2, G3, G4, G5 e G6, após 10, 20 e 30 dias de incubação, utilizando os meios AFPA e DRBC.

GRUPO	AMOSTRA	LADO A	LADO A	LADO A	LADO B	LADO B	LADO B
		10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS	10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS
2	1	100	100	100	0,0	0,0	0,0
	2	100	100	100	0,0	0,0	0,0
	3	100	100	100	0,0	0,0	0,0
	4	100	100	100	0,0	0,0	0,0
	5	100	100	100	0,0	0,0	0,0
	Média	100	100	100	0,0	0,0	0,0
	Desvio padrao	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	1	100	100	100	93,9	100	100
	2	100	100	100	96,9	100	100
	3	100	100	100	96,9	100	100
	4	100	100	100	100	100	100
	5	100	100	100	96,9	100	100
	Média	100	100	100	96,9	100	100
	Desvio padrao	0,0	0,0	0,0	2,2	0,0	0,0
4	1	100	100	100	0,0	0,0	0,0
	2	100	100	100	0,0	0,0	0,0
	3	100	100	100	0,0	0,0	0,0
	4	100	100	100	0,0	0,0	0,0
	5	100	100	100	0,0	0,0	0,0
	Média	100	100	100	0,0	0,0	0,0
	Desvio padrao	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5	1	100	100	100	96,9	100	100
	2	100	100	100	96,9	100	100
	3	100	100	100	96,9	100	100
	4	100	100	100	100	100	100
	5	100	100	100	96,9	100	100
	Média	100	100	100	97,5	100	100
	Desvio padrao	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0
6	1	100	100	100	96,9	100	100
	2	100	100	100	96,9	100	100
	3	100	100	100	96,9	100	100
	4	100	100	100	100	100	100
	5	100	100	100	96,9	100	100
	Média	100	100	100	97,5	100	100
	Desvio padrao	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0

Os resultados estão expressos em porcentagem (%);

O grupo 1 não está representado na tabela pois não foram inoculados esporos fúngicos;

Tabela C. 6 - Microbiota fúngica dos carunchos, dos grupos G3, G5 e G6 após 10, 20 e 30 dias de incubação, utilizando os meios AFPA e DRBC.

GRUPO	AMOSTRA	LADO A	LADO A	LADO A	LADO B	LADO B	LADO B
		10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS	10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS
3	1	100	100	100	93,9	100	100
	2	100	100	100	96,9	100	100
	3	100	100	100	96,9	100	100
	4	100	100	100	100	100	100
	5	100	100	100	96,9	100	100
	Média	100	100	100	96,9	100	100
	Desvio padrao	0,0	0,0	0,0	2,2	0,0	0,0
GRUPO	AMOSTRA	LADO A	LADO A	LADO A	LADO B	LADO B	LADO B
		10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS	10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS
5	1	100	100	100	96,9	100	100
	2	100	100	100	96,9	100	100
	3	100	100	100	96,9	100	100
	4	100	100	100	100	100	100
	5	100	100	100	96,9	100	100
	Média	100	100	100	97,5	100	100
	Desvio padrao	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0
GRUPO	AMOSTRA	LADO A	LADO A	LADO A	LADO B	LADO B	LADO B
		10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS	10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS
6	1	100	100	100	93,9	100	100
	2	100	100	100	96,9	100	100
	3	100	100	100	96,9	100	100
	4	100	100	100	100	100	100
	5	100	100	100	100	100	100
	Média	100	100	100	97,5	100	100
	Desvio padrao	0,0	0,0	0,0	2,2	0,0	0,0

Os resultados estão expressos em porcentagem (%);

O grupo 1 não está representado na tabela pois não foram inoculados esporos fúngicos;

Os grupos 2 e 4 não foram inoculados com carunchos, conforme esquema de inoculação;

Tabela C. 7 - Níveis de fumonisinas B1 e B2 nos diferentes tratamentos realizados

	Amostra	Toxina	Lado A	Lado A	Lado A	Lado B	Lado B	Lado B
			10 dias	20 dias	30 dias	10 dias	20 dias	30 dias
GRUPO 1	1	FB ₁	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		FB ₂	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2	FB ₁	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		FB ₂	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	3	FB ₁	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		FB ₂	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	4	FB ₁	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		FB ₂	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	5	FB ₁	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		FB ₂	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GRUPO 4	1	FB ₁	270,85	263,94	449,40	ND	ND	ND
		FB ₂	79,23	128,40	84,54	ND	ND	ND
	2	FB ₁	263,94	306,27	377,05	ND	ND	ND
		FB ₂	128,40	159,49	94,28	ND	ND	ND
	3	FB ₁	223,54	260,63	373,0	ND	ND	ND
		FB ₂	80,25	118,39	180,02	ND	ND	ND
	4	FB ₁	292,27	178,84	494,70	ND	ND	ND
		FB ₂	79,58	82,03	193,11	ND	ND	ND
	5	FB ₁	201,51	252,91	385,04	ND	ND	ND
		FB ₂	60,53	112,43	185,5	ND	ND	NR
Média	FB₁	250,4	252,5	415,8	0,0	0,0	0,0	
	FB₂	85,6	120,1	147,5	0,0	0,0	0,0	
Desvio padrao	FB₁	37,0	46,1	53,9	0,0	0,0	0,0	
	FB₂	25,3	28,0	53,3	0,0	0,0	0,0	
GRUPO 5	1	FB ₁	1664,45	2616,68	3213,33	1481,16	2584,18	2888,61
		FB ₂	790,34	1421,85	2513,10	664,65	1188,37	1563,98
	2	FB ₁	1024,15	2755,91	3113,33	1985,98	2166,03	3006,12
		FB ₂	753,34	1650,49	2276,55	791,17	1216,79	2101,32
	3	FB ₁	1081,72	2373,61	3254,09	1277,46	1917,09	2938,75
		FB ₂	638,51	1173,13	2453,98	680,84	1082,63	1875,44
	4	FB ₁	1740,78	2030,94	3385,50	1181,53	2006,29	2765,90
		FB ₂	716,54	1890,58	2641,11	790,49	1486,92	1654,23
	5	FB ₁	1499,40	2256,42	3157,79	1163,29	2050,19	2987,12
		FB ₂	627,65	1709,54	2554,72	646,94	1306,98	1743,23
Média	FB₁	1402,1	2406,7	3224,8	1417,9	2144,8	2917,3	
	FB₂	705,3	1569,1	2487,9	714,8	1256,3	1787,6	
Desvio padrao	FB₁	331,1	287,6	104,6	341,7	261,5	96,1	
	FB₂	71,0	277,6	136,4	70,4	151,7	209,7	
GRUPO 6	1	FB ₁	906,26	1610,89	2219,64	600,32	1022,17	1652,96
		FB ₂	352,11	741,08	1704,32	294,36	826,23	982,45
	2	FB ₁	883,84	1695,06	2001,76	581,69	1101,22	1548,73
		FB ₂	415,06	856,48	1489,84	191,12	789,90	833,78
	3	FB ₁	912,81	1242,33	2104,12	606,89	1161,31	1545,55
		FB ₂	502,76	927,00	1013,05	276,80	694,53	785,97
	4	FB ₁	870,71	1422,90	2045,08	566,67	1034,45	1242,33
		FB ₂	386,32	801,65	1052,57	176,32	764,34	857,44
	5	FB ₁	853,45	1441,12	2266,90	615,89	1043,78	1495,05
		FB ₂	506,17	723,08	1189,81	333,24	801,43	856,38
Média	FB₁	855,4	1428,5	2127,5	594,3	1072,6	1496,9	
	FB₂	432,5	809,9	1289,9	254,4	775,3	863,2	
Desvio padrao	FB₁	24,6	176,5	113,0	19,9	58,1	153,5	
	FB₂	69,4	84,0	297,8	67,9	50,3	72,7	

Os resultados foram expressos em µg/Kg (ng/g ou ppb);
ND: não detectado.

Tabela C. 8 - Níveis de aflatoxinas B1 e B2 nos diferentes tratamentos realizados

	Amostra	Toxina	Lado A	Lado A	Lado A	Lado B	Lado B	Lado B
			10 dias	20 dias	30 dias	10 dias	20 dias	30 dias
GRUPO 1	1	B ₁	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		B ₂	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2	B ₁	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		B ₂	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	3	B ₁	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		B ₂	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	4	B ₁	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		B ₂	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	5	B ₁	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		B ₂	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GRUPO 2	1	B ₁	9,31	24,6	158,70	ND	ND	ND
		B ₂	0,92	5,10	12,14	ND	ND	ND
	2	B ₁	7,37	44,39	99,01	ND	ND	ND
		B ₂	0,69	5,87	11,67	ND	ND	ND
	3	B ₁	13,73	38,65	109,31	ND	ND	ND
		B ₂	1,49	4,12	11,45	ND	ND	ND
	4	B ₁	11,43	21,23	120,57	ND	ND	ND
		B ₂	1,01	3,03	12,18	ND	ND	ND
	5	B ₁	8,95	37,44	85,27	ND	ND	ND
		B ₂	0,77	4,02	10,34	ND	ND	ND
Média	B ₁	10,2	33,3	114,6	0,0	0,0	0,0	
	B ₂	1,0	4,4	11,6	0,0	0,0	0,0	
Desvio padrao	B ₁	2,5	9,9	27,9	0,0	0,0	0,0	
	B ₂	0,3	1,1	0,7	0,0	0,0	0,0	
GRUPO 3	1	B ₁	27,93	105,50	321,54	27,93	101,50	275,12
		B ₂	1,23	6,92	22,33	1,40	8,60	13,03
	2	B ₁	35,91	84,80	270,03	24,51	133,70	291,11
		B ₂	1,51	1,79	12,83	1,57	11,41	17,02
	3	B ₁	22,53	88,30	280,03	21,43	99,20	280,15
		B ₂	1,31	1,20	13,01	1,18	11,69	13,31
	4	B ₁	31,49	150,50	253,12	26,50	105,20	277,51
		B ₂	1,33	11,58	12,21	1,51	11,74	12,11
	5	B ₁	20,44	124,60	305,11	25,20	93,06	293,46
		B ₂	1,14	11,40	17,31	1,74	8,78	17,03
Média	B ₁	27,7	110,7	286,0	25,1	106,5	283,5	
	B ₂	1,3	6,6	15,5	1,5	10,4	14,5	
Desvio padrao	B ₁	6,3	27,3	27,4	2,4	15,8	8,3	
	B ₂	0,1	5,0	4,3	0,2	1,6	2,3	
GRUPO 6	1	B ₁	21,34	107,06	272,80	31,91	80,49	289,87
		B ₂	1,52	10,79	14,01	1,38	10,79	13,71
	2	B ₁	21,76	134,25	229,93	20,18	99,75	356,22
		B ₂	2,06	11,89	11,94	0,90	11,07	19,90
	3	B ₁	20,61	96,13	370,40	28,43	90,43	290,55
		B ₂	1,00	0,90	20,12	1,00	10,94	19,52
	4	B ₁	23,98	88,87	266,37	27,04	114,21	352,39
		B ₂	1,62	10,01	17,69	0,82	11,14	11,72
	5	B ₁	32,51	139,55	277,36	24,12	82,72	294,68
		B ₂	1,41	13,62	14,54	0,38	8,60	12,64
Média	B ₁	24,0	113,2	283,4	26,3	93,5	316,7	
	B ₂	1,5	9,4	15,7	0,9	10,5	15,5	
Desvio padrao	B ₁	4,9	22,7	52,1	4,4	13,8	34,4	
	B ₂	0,4	5,0	3,2	0,4	1,1	3,9	

Os resultados foram expressos em µg/Kg (ng/g ou ppb);
 ND: não detectado.

Tabela C. 9 - Análise Nutricional das amostras de milho dos diferentes tratamentos

AMOSTRA	MS	AMD	MM	EE	FB	PB	Ca	P
G1A 10D	87,58	67,02	1,31	2,38	2,05	9,68	0,026	0,245
G1B 10D	87,61	65,14	1,30	2,31	1,96	9,42	0,026	0,251
G1A 20D	85,57	60,90	1,31	0,81	1,45	9,33	0,033	0,252
G1B 20D	86,08	68,58	1,37	1,39	2,06	9,13	0,031	0,255
G1A 30D	84,73	60,99	1,37	1,10	1,50	9,41	0,031	0,245
G1B 30D	86,02	63,06	1,29	0,90	1,53	9,48	0,031	0,232
G2A 10D	85,25	65,17	1,37	0,67	1,18	9,20	0,031	0,244
G2B 10D	84,83	65,55	1,37	1,26	1,05	9,28	0,029	0,248
G2A 20D	83,80	62,66	1,54	0,99	1,10	10,93	0,034	0,249
G2B 20D	84,20	62,34	1,29	1,47	0,93	9,45	0,034	0,235
G2A 30D	83,32	70,00	1,34	0,64	1,08	9,31	0,029	0,227
G2B 30D	85,60	66,00	1,26	1,00	0,99	9,36	0,026	0,220
G3A 10D	85,44	62,71	1,45	1,86	1,04	9,38	0,029	0,250
G3B 10D	83,89	61,96	1,55	1,15	1,84	9,57	0,034	0,236
G3A 20D	81,51	64,24	1,44	0,88	1,54	9,37	0,018	0,243
G3B 20D	84,63	63,27	1,53	1,01	1,46	11,19	0,024	0,267
G3A 30D	84,59	63,49	1,42	0,11	1,67	9,73	0,019	0,243
G3B 30D	77,56	60,80	1,64	0,89	1,11	10,68	0,024	0,271
G4A 10D	84,12	58,77	1,35	0,74	1,22	10,12	0,022	0,244
G4B 10D	85,35	60,12	1,47	1,27	2,02	9,50	0,017	0,270
G4A 20D	84,12	63,13	1,49	1,27	1,75	10,86	0,019	0,265
G4B 20D	85,96	62,60	2,01	0,98	0,72	9,40	0,017	0,269
G4A 30D	81,18	53,81	1,76	0,66	2,75	9,51	0,028	0,262
G4B 30D	85,20	69,08	1,50	0,65	1,53	9,60	0,014	0,273
G5A 10D	82,80	63,95	1,62	1,29	2,86	9,51	0,015	0,255
G5B 10D	80,80	58,72	1,81	1,64	1,67	9,84	0,018	0,256
G5A 20D	84,27	58,96	1,69	2,05	1,48	10,32	0,017	0,285
G5B 20D	83,39	65,00	1,61	1,50	1,74	9,66	0,027	0,266
G5A 30D	81,89	59,18	1,92	1,88	1,43	10,00	0,017	0,286
G5B 30D	79,82	53,87	1,75	2,36	6,05	10,70	0,023	0,285
G6A 10D	80,53	50,10	1,85	2,18	1,13	9,75	0,025	0,279
G6B 10D	78,86	51,18	1,81	1,39	1,00	9,85	0,018	0,273
G6A 20D	81,38	63,92	1,63	3,13	2,97	9,67	0,018	0,272
G6B 20D	81,63	56,77	1,86	5,46	1,81	9,71	0,017	0,276
G6A 30D	80,40	67,76	1,63	5,71	1,76	9,80	0,015	0,287
G6B 30D	82,22	61,67	1,52	5,81	4,41	9,33	0,012	0,254

Onde, G: representa os diferentes grupos identificados de 1 a 6, e lados A e B. Também está especificado o período de incubação correspondente a cada grupo; MS: matéria seca; AMD: amido; MM: matéria mineral; EE: extrato etéreo; FB: fibra bruta; PB: proteína bruta; Ca: cálcio; P: fósforo. Todos os resultados foram expressos em porcentagem.

Tabela C. 10 - Quantificação relativa dos níveis de transcritos para os genes FUM 1 e FUM 19 e produção de fumonisinas nos diferentes tratamentos.

TRATAMENTO	PRODUÇÃO FUMONISINAS		EXPRESSÃO GÊNICA			
	B ₁ (µg/Kg)	B ₂ (µg/Kg)	FUM 1	%	FUM 19	%
G4-10dias A	250,4	85,6	0,74	75	0,73	73
G5-10 dias A	1402,1	705,3	0,95	95	1,12	112
G5-10 dias B	1417,9	714,8	1,25	125	1,36	136
G6-10 dias A	855,4	432,5	0,84	84	1,16	116
G6-10 dias B	594,3	254,4	1,31	131	1,75	175
G4-20dias A	252,5	120,1	0,83	84	1,03	104
G5-20 dias A	2406,7	1569,1	0,74	75	0,83	84
G5-20 dias B	2144,8	1256,3	1,16	116	1,33	133
G6-20 dias A	1428,5	809,9	0,80	80	1,04	104
G6-20 dias B	1072,6	775,3	1,09	109	1,13	113
G4-30dias A	415,8	147,5	0,87	88	0,91	91
G5-30 dias A	3224,8	2487,9	0,49	50	0,50	50
G5-30 dias B	2917,3	1787,6	0,46	46	0,45	45
*G6-30 dias A	2127,5	1289,9	-	-	-	-
G6-30 dias B	1496,9	863,2	1,03	103	0,84	84

*G6-30 dias A: amostra calibradora para o cálculo dos valores de $\Delta\Delta CT$

Tabela C. 11 - Quantificação relativa dos níveis de transcritos para os genes *AflR* e *AflP* e produção de aflatoxinas nos diferentes tratamentos.

TRATAMENTO	PRODUÇÃO AFLATOXINAS		EXPRESSÃO GÊNICA			
	B ₁ (µg/Kg)	B ₂ (µg/Kg)	<i>AflR</i>	%	<i>AflP</i>	%
*G2-10dias A	10,2	1,0	-	-	-	-
G3-10 dias A	27,7	1,3	0,87	87	0,14	14
G3-10 dias B	25,1	1,5	0,58	58	0,10	10
G6-10 dias A	24	1,5	0,92	93	0,18	19
G6-10 dias B	26,3	0,9	0,83	84	0,21	22
G2-20dias A	33,3	4,4	0,83	84	1,55	155
G3-20 dias A	110,7	6,6	0,92	93	0,95	96
G3-20 dias B	106,5	10,4	0,77	78	0,55	56
G6-20 dias A	113,2	9,4	1,24	124	0,22	22
G6-20 dias B	93,5	10,5	0,85	85	0,17	18
G2-30dias A	114,6	11,6	0,97	98	0,19	20
G3-30 dias A	286,0	15,5	1,14	114	0,20	21
G3-30 dias B	283,5	14,5	1	100	0,19	20
G6-30 dias A	283,4	15,7	0,94	95	0,18	18
G6-30 dias B	316,7	15,5	0,91	91	0,18	18

*G2-10 dias A: amostra calibradora para o cálculo dos valores de $\Delta\Delta CT$