

Influência da irradiação gama na destruição de fumonisina B₁ em farinha de milho e de aflatoxina M₁ em leite fluido e em pó

Gamma-irradiation effect on fumonisin B₁ inactivation in corn flour and on aflatoxin M₁ in fluid and powdered milk

RIALA6/1083

Guilherme PRADO^{1*}, Alexandre S. LEAL², Marize S. OLIVEIRA¹, Vanessa D. MORAES¹, Jovita E. C. M. GAZZINELLI¹, Ionara F. R. VIEIRA², Adriana S. LIMA¹, Ana Paula A. MOREIRA¹, Mabel A. CALDEIRA¹

*Endereço para correspondência: ¹Fundação Ezequiel Dias, Laboratório de Micologia e Micotoxinas, Rua Conde Pereira Carneiro, 80. Gameleira, 30510010. Belo Horizonte/MG. (31) 33719462 gui@funed.mg.gov.br

²Comissão Nacional de Energia Nuclear CNEN/Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear CDTN – Campus/UFMG. (31) 34993308. asleal@cdtn.br.

Recebido: 18/07/2006 – Aceito para publicação: 18/10/2006

RESUMO

Fumonisin B₁ é a micotoxina produzida por *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum* e é encontrada principalmente em milho e produtos a base de milho. Desde sua descoberta a fumonisina B₁ tem sido associada a doenças em animais, como leucoencefalomalácia em cavalos e edema pulmonar em suínos. Em humanos, o consumo de alimentos com fumonisina B₁ tem sido associado com câncer esofágico. A aflatoxina M₁ é o principal metabólito hidroxilado encontrado no leite de animais que consumiram rações contaminadas com aflatoxina B₁, bem como no leite de lactantes que consumiram alimentos com esta substância. Neste estudo foi verificado o efeito da irradiação gama (⁶⁰Co), em doses que variaram de 0 a 20 kGy, quanto à capacidade de inativar fumonisina B₁ em farinha de milho e aflatoxina M₁ em leite fluido e em pó. A fumonisina B₁ foi extraída das amostras com metanol:água (8:2). O extrato foi purificado em coluna de imunoafinidade, seguido de separação e quantificação por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência, após derivatização com orto-ftaldialdeído. Para efetuar a determinação da aflatoxina M₁, a amostra foi purificada em coluna de imunoafinidade e a separação e a quantificação por meio de CLAE com detector de fluorescência. Foi observada uma redução da concentração da fumonisina B₁ na faixa de 11,2 % a 55,5% em doses de 3 a 20 kGy de irradiação gama (⁶⁰Co). A concentração de aflatoxina M₁ foi reduzida em 86,8 % e 37,9%, respectivamente no leite fluido e em pó, em dose de 20 kGy de radiação gama.

Palavras-chave. farinha de milho, leite, fumonisina B₁, aflatoxina M₁, irradiação gama.

ABSTRACT

Fumonisin B₁ is a mycotoxin produced by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*, and it is found chiefly in corn and corn-based products. Since its discovery fumonisin B₁ has been associated with diseases in animals, such as leukoencephalomalacia in horses, and pulmonary edema in swine. On humans, the ingestion of foods with fumonisin B₁ is associated with esophageal cancer. Aflatoxin M₁ is the principal hydroxylated metabolite occurring in milk from animals which have consumed aflatoxin B₁-contaminated feeds. It is also present in milk from nursing mothers who consumed foodstuffs with aflatoxin B₁. In this study the effect of gamma-irradiation (⁶⁰Co) was verified, in doses ranged from 0 to 20 kGy, in order to inactivate fumonisin B₁ in corn flour and aflatoxin M₁ in fluid and powdered milk. Fumonisin B₁ was extracted from the samples with methanol:water (3:1). The extract was purified through immunoaffinity column followed by separation and quantification by means of high-performance liquid chromatography (HPLC) with o-phthalaldehyde (OPA). For determining aflatoxin M₁ the purification was done through immunoaffinity column followed by separation and quantification by means of HPLC with fluorescence detector. Gamma irradiation (⁶⁰Co) at doses from 3 to 20 kGy reduced the fumonisin

B₁ content in a range of 11.2 % to 55.5 %. Gamma irradiation (⁶⁰Co) at 20 kGy dose reduced aflatoxin M₁ concentration in 86.8 % and 37.9 % in milk fluid and powdered milk, respectively.

Key words. corn flour, milk, fumonisin B₁, aflatoxin B₁, aflatoxin M₁, gamma-irradiation.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de processos de preservação de alimentos com a finalidade de aumentar a vida de prateleira e manter sua segurança é um fator estratégico e dominante na situação alimentar mundial. Para suprir a necessidade de alimentos e reduzir a pobreza e considerando a expectativa populacional de 8,3 bilhões de pessoas para o ano de 2025, o mundo irá precisar aumentar substancialmente a produtividade agrícola e aperfeiçoar as práticas de pós-colheita, armazenamento e distribuição¹.

A contaminação fúngica tem sido responsável pela inevitável perda de qualidade dos alimentos, tornando-os impróprios para o consumo e resultando em grandes perdas econômicas. Os efeitos da invasão fúngica podem provocar: (1) diminuição do poder de germinação; (2) redução na quantidade de carboidratos, proteínas e gordura e aumento no teor de umidade e ácidos graxos livres; (3) alteração da coloração, sabor e aroma, modificando a qualidade organoléptica dos alimentos; (4) produção de micotoxinas²⁻⁶.

A contaminação de alimentos com micotoxinas é freqüente em regiões tropicais e subtropicais, como o Brasil, onde o clima favorece o desenvolvimento de fungos toxigênicos, principalmente em amendoim e milho⁷.

As micotoxinas são produtos de metabolismo secundário de fungos filamentosos sintetizados durante seu desenvolvimento natural nos alimentos. Apresentam relativa estabilidade química, permanecendo nos produtos alimentícios mesmo após a remoção dos fungos através dos processos usuais de processamento e estocagem⁸.

Fumonisininas são micotoxinas produzidas por *Fusarium* sp (*F. verticillioides* e *F. proliferatum*) encontradas principalmente em milho e derivados. No Brasil, a contaminação destes produtos com fumonisininas atinge percentuais superiores a 90%⁹⁻¹³.

Neste grupo, a micotoxina mais comumente encontrada é a fumonisina B₁ (FB₁), tendo sido associada a doenças em animais, como leucoencefalomalácia em cavalos e edema pulmonar em suínos. Embora o efeito em humanos não esteja claramente estabelecido, estatisticamente está associado ao câncer esofágico em algumas regiões como Transkei na África do Sul¹⁴⁻¹⁶.

Aflatoxina M₁ (AFM₁) é o principal metabólito hepato carcinogênico excretado no leite de animais que consumiram rações contaminadas com aflatoxina B₁ estando presente em

leite pasteurizado e ultrapasteurizado, leite em pó, queijo, iogurte e leite humano¹⁷⁻²⁴.

Vários métodos de preservação têm sido descritos para impedir o crescimento de fungos e produção de aflatoxinas, tais como fumigação, amônia, luz ultravioleta, tratamento pelo calor, solventes químicos, mas nenhum desses métodos oferece completo controle dos fungos toxigênicos e das micotoxinas. Além do mais, efeitos nocivos à saúde humana e ao meio ambiente, associados aos resíduos, limitam a aplicação química em grande extensão. Conseqüentemente, o tratamento por irradiação gama, utilizando fonte de ⁶⁰Co, também chamada de esterilização a frio, tem sido investigado como processo alternativo para a preservação de alimentos²⁵⁻³².

No Brasil, a legislação que trata do emprego da irradiação em alimentos é a Resolução RDC N.º 21, de 26 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. As doses a serem aplicadas devem ser compatíveis com os efeitos desejados, não tendo a legislação fixado valores mínimos ou máximos³³.

Poucas referências foram encontradas na literatura científica sobre influência da irradiação gama sobre a estabilidade de FB₁ em milho e AFM₁ em leite. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência da irradiação gama (⁶⁰Co) no controle de FB₁ em farinha de milho e de AFM₁ em leite fluido e em pó.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foi utilizada uma amostra de farinha de milho naturalmente contaminada com FB₁ em uma concentração média de 534,5 ng/g e leite ultrapasteurizado e em pó contaminado com AFM₁ em concentração média de 328,4 ng/L e 290 ng/kg, respectivamente.

Metodologia de irradiação

O processo de irradiação foi conduzido e executado no Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - CDTN/MG. A taxa de dose foi ao redor de 6,0 kGy.h⁻¹. A farinha de milho foi irradiada em níveis de 0, 1, 3, 5, 10 e 20 kGy. Para o leite líquido foram utilizadas as doses de 0, 3, 5, 10, 15 e 20 kGy. No

leite em pó foram aplicadas as doses de 0, 5, 10 e 20 kGy. O experimento foi efetuado à temperatura ambiente.

Quantificação de fumonisina B₁

A metodologia utilizada envolveu extração da fumonisina com metanol:água (8:2), purificação em coluna de imunoafinidade (VICAM) e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (Sistema Shimadzu equipado com bomba LC-10AD, injetor automático SIL-10AF e detector de fluorescência RF-551), após derivatização com ortoftaldialdeído (OPA). Utilizou-se coluna Shim-pack CLC-ODS RP-18 (250 mm x 4,6 mm, partícula de 5 µm) e pré-coluna Shim-pack G-ODS (25 mm x 4,6 mm, partícula de 5 µm). A fase móvel utilizada isocraticamente foi acetonitrila:ácido acético 1 % (50:50). O resíduo da amostra foi ressuspensionado com 800 µL de acetonitrila:água (1:1) e, segundos antes da injeção foi adicionado 200 µL de solução de OPA. O volume injetado foi de 20 µL em um fluxo de 0,8 mL/min. As injeções ocorreram dentro de 2 minutos. Para determinação da curva de calibração foi utilizada soluções de fumonisina B₁ nas concentrações de 100 a 1000 ng/mL. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 nm e 440 nm, respectivamente. Nestas condições o tempo de retenção da FB₁ foi de 8-10 minutos. A recuperação do método foi de 88 % e os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, 50 ng/g e 100 ng/g³⁴.

Quantificação de aflatoxina M₁

O método utilizado foi o descrito por Tuinstra et al^{35,36}. A AFM₁ foi extraída do leite após passagem da amostra em coluna de imunoafinidade (VICAM) e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência (Sistema Shimadzu equipado com bomba LC-10AD, injetor automático SIL-10AF e detector de fluorescência RF-551). A separação por CLAE foi conduzida em coluna Shim-pack CLC-ODS RP-18 (250 mm x 4,6 mm, partícula de 5 µm) e pré-coluna Shim-pack G-ODS (25 mm x 4,6 mm, partícula de 5 µm). A toxina foi eluída isocraticamente com água: isopropanol: acetonitrila (80: 12: 8) a um fluxo de 1 mL/min. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 366nm e 428nm, respectivamente. O tempo de retenção obtido foi aproximadamente de 10 minutos. A recuperação do método foi de 93 % na faixa de 15 a 85 ng/L. Os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, 2 ng/L e 6 ng/L.

Análise estatística

Em todos os experimentos efetuados os resultados foram avaliados pelo Teste F para constatar a presença de efeitos significativos (p < 0,05). Nestes casos foi aplicado o Teste de Tukey para determinar as diferenças entre as médias^{37,38}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do efeito da irradiação gama (⁶⁰Co) na destruição de fumonisina B₁ em amostra de farinha de milho naturalmente contaminada são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Teores de fumonisina B₁ em farinha de milho após irradiação gama (⁶⁰Co) a 0, 1, 3, 5, 10 e 20 kGy e análise em quatro repetições.

Dose de Irradiação (kGy)	Fumonisina B ₁ (µg.Kg ⁻¹)	Média* (µg.Kg ⁻¹) (% de Redução)	Coefficiente de Variação (%)
0	566,67	534,50a	17,29
	462,15		
	458,30		
	650,97		
1	572,73	474,61b (11,2)	15,07
	476,87		
	405,94		
	442,88		
3	369,67	284,37c (46,8)	21,47
	284,57		
	230,18		
	253,07		
5	321,73	237,77c (55,5)	25,47
	239,68		
	206,24		
	183,42		
10	304,97	257,59c (51,8)	15,57
	211,79		
	272,33		
	241,29		
20	293,81	316,38c (40,8)	10,62
	349,33		
	281,68		
	340,69		

*Médias com a mesma letra na vertical não diferem entre si pelo Teste de Tukey em 5 % de probabilidade.

Dose de irradiação gama de 1 kGy provocou uma redução na concentração de fumonisina B₁ para 474,61 ng/g (11,2 %) a partir do valor original de 534,5 ng/g. Com dose de 3 kGy a redução do nível de fumonisina B₁ foi de 46,8 %, com 5 kGy de 55,5 %, 10 kGy de 51,8 % e com 20 kGy a redução de fumonisina B₁ foi de 40,8 %. Não foi observada diferença significativa (p < 0,05) pelo Teste de Tukey entre os valores médios de fumonisina B₁, quando a irradiação gama foi de 3, 5, 10 e 20 kGy. Visconti et al.³⁹ verificaram uma redução de 20 % no conteúdo da FB₁ em milho naturalmente contaminado, após irradiação gama em dose de 15 kGy. Ferreira⁴⁰ avaliando o efeito da radiação gama em amostras de milho inoculadas com *Fusarium verticillioides*, demonstrou que em dose de 10 kGy foi possível reduzir em 62,5 % a concentração de fumonisina B₁.

O processamento térmico (cozimento, fritura, torração e extrusão) do milho, em temperatura na faixa de 150 a 200°C,

reduz a concentração de FB₁ no produto final. Cerca de 80 % da fumonisina B₁, naturalmente presente em farinha de milho, é destruída após tratamento a 190 °C durante 60 minutos e a 220 °C por 25 minutos a recuperação é nula⁴¹⁻⁴⁴. Em função dos valores obtidos de destruição da fumonisina B₁, a aplicação da irradiação gama neste alimento, com o propósito específico de destruir esta micotoxina não é recomendada.

Entretanto, diferentes relatos descritos na literatura revelaram a efetividade da irradiação gama na destruição de outras micotoxinas em diferentes alimentos. Aziz et al²⁵ verificaram que radiação gama na dose de 8 kGy, em farinha de trigo e pão, foi capaz de eliminar completamente outras toxinas de *Fusarium* como desoxinivalenol e toxina T-2. Da mesma forma, Aziz e Moussa⁴⁵ observaram que dose de 5 kGy em frutas (morango, ameixa, uva, maçã, pêra, amora), foi capaz de reduzir completamente os níveis de ácido penicílico, patulina, ocratoxina A e ácido ciclopiazônico. Refai et al⁴⁶ também descreveram uma redução total da concentração de ocratoxina A em milho e soja em doses de 15 e 20 kGy. Abdel-Aal e Aziz⁴⁷ verificaram que dose de 4 kGy foi capaz de impedir a produção de ocratoxina A, ácido ciclopiazônico e ácido penicílico em queijo inoculado com *Penicillium viridicatum*, *Penicillium cyclopium* e *Penicillium chrysogenum*. Por conseguinte, sugere-se em trabalhos futuros verificar o efeito da irradiação gama em outras micotoxinas presentes naturalmente em milho e derivados.

Os resultados do efeito da irradiação gama (⁶⁰Co) na destruição da AFM₁ em leite fluido e em pó são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Teores de aflatoxina M₁ em leite ultrapasteurizado e em pó após irradiação gama (⁶⁰Co) a 0, 3, 5, 10, 15 e 20 kGy.

Dose de irradiação (kGy)	Aflatoxina M ₁ (ng.L ⁻¹)		Aflatoxina M ₁ (ng.kg ⁻¹)	
	Leite Fluido ¹	Redução (%)	Leite em Pó ²	Redução(%)
0	328,4a		290a	
3	306,7b	6,6	NE	
5	221,0c	32,7	260b	10,3
10	65,9d	79,9	250c	13,8
15	48,8e	85,1	NE	
20	43,4f	86,8	180d	37,9

1. Média de 4 repetições.

2. Média de 2 repetições.

Médias com a mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

NE: Não-executado.

Observa-se uma redução gradual da concentração da AFM₁ com o aumento da dose de irradiação gama. Em leite fluido, a 10, 15 e 20 kGy a destruição da AFM₁ atingiu valores na faixa de 80 a 87 %. Uma explicação para acentuada redução dos níveis de AFM₁ é que o processo de irradiação nos alimentos envolve duas etapas: (1^a) em uma etapa inicial ocorre formação de radicais livres, íons

e moléculas ativadas. É o chamado efeito primário da irradiação. (2^a) segue-se o efeito secundário, que consiste na reação das espécies reativas formadas na primeira etapa com os outros constituintes dos alimentos. É o chamado efeito indireto da irradiação, responsável por 80% dos efeitos provocados pela irradiação⁴⁸⁻⁵¹. A água, maior constituinte do leite, absorve a energia das radiações e sofre o processo de radiólise, formando diferentes radicais livres e íons em grandes concentrações. O leite em pó, que apresenta um teor de umidade inferior ao leite fluido, mostra uma menor, mas significativa percentagem de redução da AFM₁ quando comparado ao leite fluido: cerca de 38 % com a dose de 20 kGy.

Apesar do resultado promissor da irradiação gama (⁶⁰Co) em destruir parcialmente a AFM₁, existe a possibilidade de aumento da concentração do ácido butílico em função da quebra de constituintes do leite, com possível alteração do sabor⁵². Em trabalho desenvolvido por Pietranera et al⁵³ com sorvete a base de creme de leite, não foi verificada formação significativa de peróxidos, índice químico utilizado para avaliação de rancidez, até a dose de 9 kGy. Sugere-se, portanto, em trabalhos futuros, um monitoramento das características organolépticas e nutricionais do leite, como avaliação sensorial, acidez, gordura, vitaminas e aminoácidos, após o processo de irradiação.

CONCLUSÕES

Doses de irradiação gama (⁶⁰Co) até 20 kGy não foram suficientes para destruir completamente a fumonisina B₁ em farinha de milho naturalmente contaminada.

Em leite fluido a aflatoxina M₁ foi destruída em um percentual que variou de 6,6 a 86,8 %, após irradiação gama (⁶⁰Co) em doses de 3 a 20 kGy. Em leite em pó, a aflatoxina M₁ atingiu o máximo de destruição (37,9 %) com a dose de 20 kGy.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro (CAG-218/04).

REFERÊNCIAS

1. Okezie BO. Word food security: The role of postharvest technology. *Food Tech* 1998; 52:64-9.
2. Bhattacharya K, Raha S. Deteriorative changes of maize, groundnut and soybean seeds by fungi in storage. *Mycopathologia* 2002; 155:135-41.
3. Bueno DJ, Silva JO, Oliver G. Fungal isolation and enumeration in foods. *Meth Molec Biol* 2004; 268: 127-32.

4. Paster N, Bullerman LB. Mould spoilage and mycotoxin formation in grains as controlled by physical means. *Int J Food Microbiol* 1988; 7:257-65.
5. Reddy MJ, Shetty HS. Role of seed lipids in *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *J Sci Food Agric* 1992; 59:177-81.
6. Taniwaki MH, Iamanaka BT, Banhe AA. Comparison of culture media to recover fungi from flour and tropical pulps. *J Food Mycol* 1992; 2:291-302.
7. Rodriguez-Amaya DB, Sabino M. Mycotoxin research in Brazil: The last decade in review. *Braz J Microbiol* 2002; 33:1-14.
8. Bittencourt ABF, Oliveira CAF, Dilkin P, Corrêa B. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. *Food Control* 2005; 16:117-20.
9. Machinski M, Valente Soares LM. Fumonisin B₁ and B₂ in Brazilian corn-based food products. *Food Addit Contam* 2000; 17:875-9.
10. Vargas EA, Preis RA, Castro L, Silva CMG. Co-occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, zearalenone and fumonisin B₁ in Brazilian corn. *Food Addit Contam* 2001; 18: 981-6.
11. Camargos SM, Valente Soares LM, Sawazaki E, Bolonhezi D, Castro JL, Bortolotto N. Accumulation of fumonisins B₁ and B₂ in freshly harvested Brazilian commercial maize at three locations during two nonconsecutive seasons. *Mycopathologia* 2001; 155:219-28.
12. Westhuizen LV, Shephard GS, Scussel VM, Costa LLF, Vismer HF, Rheeder JP, Marasas WFO. Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. *J Agric Food Chem* 2003; 51:5574-8.
13. Castro MFPM, Shepard GS, Sewram V, Vicente E, Mendonça TA, Jordan AC. Fumonisin in Brazilian corn-based foods for infant consumption. *Food Addit Contam* 2004; 21:693-9.
14. Chu FS, Li GY. Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and mycotoxins in moldy corn collected from the peoples Republic of China. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60:847-52.
15. Scaff RMC, Scussel VM. Fumonisin B₁ and B₂ in corn-based products commercialized in the state of Santa Catarina – Southern Brazil. *Braz Arch Biol Techn* 2004; 47:911-9.
16. Almeida AP, Sabino M, Fonseca H, Corrêa B. Milho recém-colhido no Brasil: interação da microbiota fúngica, fatores abióticos e ocorrência de fumonisinas. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2005; 64:1-9.
17. Bakirci I. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food Control* 2001; 12:47-51.
18. Carvajal M, Bolanös A, Rojo F, Méndez I. Aflatoxin M₁ in pasteurized and ultrapasteurized milk with different fat content in Mexico. *J Food Prot* 2003; 66: 1885-92.
19. Carvajal M, Rojo F, Méndez I, Bolanös A. Aflatoxin B₁ and its interconverting metabolite aflatoxicol in milk: the situation in Mexico. *Food Addit Contam* 2003; 20:1077-86.
20. Nakajima M, Tabata S, Akiyama H, Itoh Y, Tanaka T, Sunagawa H, Tyonan T, Yoshizawa T, Kumagai S. Occurrence of aflatoxin M₁ in domestic milk in Japan during the winter season. *Food Addit Contam* 2004; 21:472-8.
21. Elgerbi AM, Aidoo KE, Candlish AAG, Tester, RF. Occurrence of aflatoxin M₁ in randomly selected North African milk and cheese samples. *Food Addit Contam* 2004; 21:592-7.
22. Navas AS, Sabino M, Rodriguez-Amaya DB. Aflatoxin M₁ and ochratoxin A in a human milk bank in the city of São Paulo, Brazil. *Food Addit Contam* 2005; 22: 457-62.
23. Oliveira CA, Rosmaninho J, Rosim R. Aflatoxin M₁ and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in São Paulo, Brazil. *Food Addit Contam* 2006; 23:196-201.
24. Gürbay A, Aydın S, Girgin G, Engin AB, Sahin G. Assessment of aflatoxin M₁ levels in milk in Ankara, Turkey. *Food Control* 2006; 17:1-4.
25. Aziz NH, Attia ESA, Farag SA. Effect of gamma-irradiation on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in wheat, flour and bread. *Nahrung* 1997; 41:34-7.
26. Aziz NH, El-Zeany AS, Moussa AA. Influence of γ -irradiation and maize lipids on the production of aflatoxin B₁ by *Aspergillus flavus*. *Nahrung* 2002; 46:327-31.
27. Chiou RYY, Lin CM, Shyu SL. Property characterization of peanut kernels subjected to gamma irradiation and its effect on the outgrowth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *J Food Sci* 1990; 55:210-3.
28. Farag RS, Rashed MM, Hussein AA, Abo-Hagar A. Effect of gamma irradiation on the infected yellow corn and peanuts by *Aspergillus flavus*. *Chem Mikrob Technol Lebensm* 1995; 17:93-8.
29. Prado G, Carvalho EP, Oliveira MS, Gazzinelli JECM, Moraes VD, Corrêa RF, Cardoso VN, Soares TV. Influência da irradiação gama na produção de aflatoxina B₁ e no crescimento de cepa toxigênica de *Aspergillus flavus* em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). *Rev Inst Adolfo Lutz* 2005; 64:85-90.
30. Prado G, Carvalho EP, Oliveira MS, Gazzinelli JECM, Moraes VD, Corrêa RF, Cardoso VN, Soares TV. Influência da irradiação gama (⁶⁰Co) na destruição da aflatoxina B₁ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). *Rev Inst Adolfo Lutz* 2005; 64: 186-92.
31. Hernandez NK, Vital HC, Sabaa-Srur UO. Irradiação de alimentos: vantagens e limitações. *Bol SBCTA* 2003; 37:154-9.
32. Verruma-Bernardi MR, Spoto MHF. Efeito da radiação gama sobre o perfil sensorial de suco de laranja. *Ci Tecnol Aliment* 2003; 23:28-32.
33. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 21, de 26 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento para irradiação de alimentos. Publicada no Diário Oficial da União de 29 de janeiro de 2001.

34. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físicos e químicos para análise de alimentos. 4ª ed. São Paulo: O Instituto; 2005. Cap. XXIV, p.775-8.
35. Tuinstra LGM, Roos AH, Trip JMP. Liquid chromatographic determination of aflatoxin M₁ in milk powder using immunoaffinity columns for cleanup: interlaboratory study. *Food Biol Contam* 1993; 76:1248-1254.
36. Prado G, Oliveira MS, Abrantes FM, Santos LG, Soares CR, Veloso T. Ocorrência de aflatoxina M₁ em leite consumido na cidade de Belo Horizonte – Minas Gerais/Brasil – Agosto/98 à Abril/99. *Ci Tecnol Aliment* 1999; 19:420-423.
37. Sampaio IBM. Estatística aplicada à experimentação animal. 1ª ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221 p.
38. Lima PC, Abreu AR. Estatística experimental: ensaios balanceados. 1ª ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2001. 102p.
39. Visconti A, Solfrizzo M, Doko MB, Boenke A, Pascale M. Stability of fumonisins at different storage periods and temperatures in γ -irradiated maize. *Food Addit Contam* 1996; 13:929-38.
40. Ferreira FL. Efeitos da radiação gama em amostras de milho contaminadas com *Fusarium verticillioides*. 2005. [Dissertação de Mestrado]. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. São Paulo. 121p.
41. Scott PM, Lawrence GA. Stability and problems in recovery of fumonisins added to corn-based foods. *JAOAC Int*. 1994; 77:541-5.
42. Castelo MM, Sumner SS, Bullerman LB. Stability of fumonisins in thermally processed corn products. *J Food Prot* 1998; 61:1030-3.
43. Bullerman LB, Ryu D, Jackson LS. Stability of fumonisins in food processing. *Adv Exp Med Biol* 2002; 504:195-204.
44. Humpf HU, Voss KA. Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. *Mol Nutr Food Res* 2004; 48:255-269.
45. Aziz NH, Moussa LAA. Influence of gamma-irradiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits. *Food Control* 2002; 13: 281-8.
46. Refai MK, Aziz NH, El-Far F, Hassan AA. Detection of ochratoxin produced by *A. ochraceus* in feedstuffs and its control by γ radiation. *Appl Rad Isot* 1996; 47: 617-21.
47. Abdel-Aal SS, Aziz NH. Effect of gamma radiation on mycotoxin production by toxigenic moulds in local Karish cheese. *Egyptian J Microbiol* 1997; 32: 151-68.
48. Rela PR. Cresce uso de irradiação para conservação de alimentos. *Rev Eng Alimen* 2000; 29: 26-9.
49. Landgraf M. Controle do desenvolvimento microbiano nos alimentos. In: Franco, BDGM; Landgraf, M. editores. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Ed. Atheneu; 2003. Cap. 7. p. 109-48.
50. Worcman-Barninka D, Landgraf M. Irradiação de carnes. *Bol SBCTA* 2003; 37:22-7.
51. Farkas J. Irradiation for better foods. *Trends Food Sci Tech* 2006; 17: 148-52.
52. Marchioni E. Irradiação de alimentos: a tecnologia a favor da saúde. *Brasil Nucl* 2006; 11: 4-7.
53. Pietranera MAS, Narvaiz P, Horak C, Kairiyma E. Irradiated icecreams for immunosuppressed patients. *Rad Phys Chem* 2003; 66:357-65.