

**RAQUEL BRAGHINI**

**Efeitos da radiação gama no fungo *Alternaria alternata* e nas micotoxinas alternariol e alternariol monometil éter em amostras de cereais artificialmente contaminadas**

**Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.**

**Área de concentração: Microbiologia**

**Orientador: Benedito Corrêa**

**São Paulo  
2009**

## Resumo

BRAGHINI, R. **Efeitos da radiação gama no fungo *Alternaria alternata* e nas micotoxinas alternariol e alternariol monometil éter em amostras de cereais artificialmente contaminadas.** 2009. 101 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da administração de diferentes doses de radiação gama no crescimento de *Alternaria alternata* e na produção das toxinas alternariol (AOH) e alternariol monometil éter (AME), em amostras de sementes de girassol, de grãos de milho, trigo e arroz. Para este fim, após irradiação com 2, 5 e 7 kGy, a massa de esporos foi ressuspensa com água destilada estéril e inoculada nas amostras de cereais. Foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônias por grama, utilizando Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol e Ágar Dicloran Cloranfenicol Extrato de Malte, a pesquisa de AOH e AME, empregando-se Cromatografia Líquida acoplada a Espectrômetro de Massa. Doses de 2; 5 e 10 kGy, foram empregadas nos cereais, para análise bromatológica, das vitaminas pantotenato de cálcio e niacina, ácidos graxos e para análise estrutural do fungo por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Como resultado das análises realizadas, nos grãos de arroz e nas sementes de girassol observou-se diminuição do número unidades formadoras de colônias, proporcionalmente à dose de radiação utilizada. Diversamente, entretanto, o aumento da dose de radiação, nos grãos de trigo e milho, resultou-lhes aumento das unidades formadoras de colônias. A análise micotoxicológica revelou, nos grãos de trigo e sementes de girassol tratados pelo processo de irradiação, menor produção de AOH, comparativamente ao grupo controle. Já nos grãos de arroz e milho, o grupo irradiado com 5 kGy, foi o que mais produziu AOH. Resultado semelhante foi constatado em relação à produção de AME. Nas análises, bromatológica, dos minerais, das vitaminas pantotenato de cálcio e niacina e dos ácidos graxos, não foram observadas alterações relevantes em comparação ao grupo controle. A MEV possibilitou a visualização de alterações estruturais provocadas pelas diferentes doses de radiação gama empregadas. Análises dos padrões das toxinas AOH e AME irradiados, não revelou alterações, comparativamente ao grupo controle. Nas condições de realização deste trabalho, o emprego da radiação gama revelou-se

uma alternativa no controle de *A. alternaria* e, conseqüentemente, de AOH e AME em sementes de girassol, grãos de arroz, milho e trigo. Este é o primeiro estudo sobre os efeitos da radiação gama nas toxinas AOH e AME.

**Palavras-chave:** *Alternaria alternata*; Alternariol; alternariol monometil éter; Radiação gama; Cereais.

## ABSTRACT

BRAGHINI, R. **Effects of gamma irradiation on the fungus *Alternaria alternata* and on mycotoxins Alternariol (AOH) and Alternariol Monomethyl Ether (AME) in artificially contaminated cereal samples.** 2009. 101 p. Ph. D. thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The present study aimed to evaluate the effects of different gamma irradiation doses on the growth of *Alternaria alternata* and on production of mycotoxins Alternariol (AOH) and Alternariol Monomethyl Ether (AME) in samples of sunflower seeds, corn, wheat and rice grains. For this purpose, after irradiation with 2, 5 and 7 kGy, the spore mass was resuspended in sterile distilled water and inoculated into cereal samples. The number of colony-forming units per gram (CFU/g) was determined after culture on Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol and Dichloran Chloramphenicol Malt Extract Agar. The presence of AOH and AME was investigated by Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry. Doses of 2, 5 and 10 kGy were applied on cereals for bromatological, vitamins (calcium pantothenate and niacin) and fatty acids analysis. In addition, fungal morphology after irradiation on cereals was also analyzed using Scanning Electron Microscopy. The results showed a significant reduction in the number of CFU/g in rice grains and sunflower seeds, which were proportional to radiation dose used. However, in corn and wheat grains was observed an increase in the number of CFU/g with the increase of gamma irradiation. The radiation doses used resulted in a reduction of AOH levels when compared to the nonirradiated control group. In rice and corn grains, the production of AOH was highest in the group irradiated with 5 kGy. Similar result was obtained with relation to AME. Bromatological, minerals, vitamins (calcium pantothenate and niacin) and fatty acids analysis didn't reveal any alterations when compared to the control group. Scanning electron microscopy (SEM) made it possible to visualize structural alterations on *A. alternata* induced by the different  $\gamma$ -radiation doses used. Analysis of irradiated AOH and AME toxins standards didn't show any alteration, when compared to the nonirradiated control group. Under the conditions of the present research, gamma radiation was found to be an alternative for the control of *A. alternata* and, consequently, of AOH and AME production in sunflower seeds, rice,

corn and wheat grains. This is the first study about effects of gamma radiation on AOH and AME toxins.

**Keywords:** *Alternaria alternata*; Alternariol; Alternariol monomethyl ether; Gamma radiation; Cereals.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações gerais sobre o girassol, o milho, o arroz e o trigo

O girassol é uma dicotiledônea anual pertencente à família *Compositae*, gênero *Helianthus l.*, espécie *annus*; cultivado principalmente como planta oleaginosa. Originário da América do Norte foi utilizado pela população na Europa, no século XVI, pela beleza de suas flores conquistou espaço como planta ornamental e hortaliça. Entretanto, na antiga União Soviética, a partir da Primeira Grande Guerra iniciou-se a expansão desta cultura, após estudos pelos quais se pretendia o melhoramento genético da planta e a introdução de genótipos com altos teores de óleo.

As propriedades nutricionais e organolépticas do óleo de girassol são bastante conhecidas [Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2008a)]. Além da utilização do óleo na alimentação humana, o girassol pode ser utilizado como aperitivo na forma de sementes torradas, na composição de barras de cereais, biscoitos, papas de bebês, alimento de pássaros, ração para cães e gatos, na forma de silagem ou farelo. Nos países eslavos, as sementes de girassol são torradas e moídas e utilizadas como sucedâneo do café. Ademais vem sendo beneficiado pela indústria farmacêutica na produção de cosméticos, tintas e materiais, sem mencionar os seus desígnios na chamada adubação verde, ou como, biodiesel. Outras alternativas de utilização desta planta dizem respeito à sua aplicação na construção civil (da casca, na confecção de móveis e do caule, na produção de isolantes térmicos e acústicos) (VRÂNCEANU, 1974; PELEGRINI, 1985).

No Brasil, nos anos de 2007 e 2008, a safra de girassóis ocupou 113,9 mil hectares, destacando-se o estado do Mato Grosso como o maior produtor, seguido do Rio Grande do Sul, de Goiás, do Mato Grosso do Sul, do Rio Grande do Norte, do Ceará, e do Paraná [Companhia Nacional de Desenvolvimento (CONAB, 2008)].

No que concerne às características do milho, trata-se de uma monocotiledônea pertencente à família das gramíneas (*Gramineae*), atualmente *Poaceas*, gênero *Zea*, cientificamente denominada *Zea mays L.* (FANCELLI, 1983). Apresenta-se como produto importante na alimentação humana, na medida em que contém carboidratos, sobretudo amido, proteínas, óleo e vitaminas (MOURA e

OLIVEIRA, 1980; Food and Agricultural Organization (FAO, 1993). Devido à sua constituição é utilizado no preparo de mais de 500 derivados (NOGUEIRA JÚNIOR et al., 1987), na alimentação humana e animal. É tido como importante instrumento no equilíbrio sócio-econômico das populações em razão de funcionar como matéria-prima básica de compostos agroindustriais (FANCELLI e DOURADO NETO, 2000).

Quanto à sua safra, no período de 2007/2008, ocupou 14.796,4 mil hectares do Paraná, maior produtor, do Mato Grosso, de Minas Gerais, de Goiás, e de São Paulo (CONAB, 2008).

O trigo, por sua vez, pertence à família das gramíneas e ao gênero *Triticum*. Em sua maioria, classifica-se em três espécies: a *Triticum aestivum* L., predominante na produção mundial; a *Triticum compactum* Host. e a *Triticum durum* Desf. O trigo *Triticum aestivum* se subdivide em 4 classes: “Hard Red Winter”, “Hard Red Spring”, “Soft Red Winter” e “Soft Red Spring” (MATTERN, 1991). Origina-se de regiões montanhosas do sudoeste da Ásia (Irã, Iraque e Turquia), tendo sido cultivado como uma das mais importantes fontes de cereais da alimentação humana na Pérsia antiga, na Grécia e no Egito. Provas destas circunstâncias podem ser atribuídas aos achados de grãos de trigo carbonizados, datados de cerca de mais de 6 mil anos, quando já se procedia o beneficiamento desta espécie de cereal naquelas regiões (EMBRAPA, 2008b).

Vale registrarmos que se trata de um alimento nobre, abrangendo por volta de 30% da produção mundial de grãos. Seus maiores produtores são a China, a Comunidade Européia, a Índia e a Rússia, países que representam 64% do total mundial (EMBRAPA, 2008c). No Brasil, a área de trigo cultivada na safra de 2007/2008, foi de 1.818,9 mil hectares, sendo o estado do Paraná seu maior produtor, seguido do Rio Grande do Sul, São Paulo e Mato Grosso do Sul (CONAB, 2008).

Sobre o último cereal estudado, o arroz, *Oryza sativa* L., é uma planta da classe *monocotyledonea*, família *gramineae*, da subfamília *oryzoideae*, gênero *Oryza* e da espécie *sativa* L. Das suas cerca de 19 espécies, a *Oryza sativa* é a mais conhecida e cultivada, constituindo-se no alimento essencial a grande parte da população do globo terrestre (FONSECA et al., 1983; ANSELMINI, 1985), daí depreende-se a sua vital importância.

Acredita-se que a *Oryza sativa* origina-se do sudoeste da Ásia, as ilhas adjacentes e a China, datando sua expansão no começo da Era Cristã, expandiu-se,

seguindo-se em direção ao Egito e mais tarde para a Europa, para a África, Américas e Austrália. Da China, espalhou-se para a Coreia e ao Japão (FONSECA et al., 1983). Atualmente, 90% da produção e consumo concentram-se na Ásia.

Tal qual mencionado, uma vez cultivado e consumido em todos os continentes, o arroz destaca-se pelo montante de sua produção, assim como pela extensão de sua área de cultivo; portanto constitui-se instrumento referencial à economia e às sociedades, por se apresentar como um dos alimentos que provê ótimos índices nutricionais, fornecendo 20% da energia e 15% da proteína per capita necessárias ao homem. Além disto, como cultura extremamente versátil, adaptável às diferentes condições de solo e do clima, funciona como excelente incremento no combate à fome no mundo. Aproximadamente 90% de todo o arroz do mundo é cultivado e consumido na Ásia (EMBRAPA, 2008d).

No mais, a safra correspondente aos anos de 2007/2008 alcançou 2.874,9 mil hectares, tendo o Rio Grande do Sul, como maior estado produtor, seguido do Maranhão, Mato Grosso e Santa Catarina (CONAB, 2008).

## **1.2 Micotoxinas**

Os grãos de cereais e sementes oleaginosas utilizadas como fontes de alimentos são expostos a uma ampla variedade de contaminantes, especialmente por fungos, considerado um dos principais fatores de deterioração (CHRISTENSEN e KAUFMANN, 1965). A ação dos fungos tem efeito nos vários tipos de alimento desde o cultivo até a colheita, assim como no transporte, armazenamento e nas diferentes fases de produção, ocorrendo com maior intensidade sob condições de temperatura e umidade favoráveis (FRISVAD e SANSON, 1991).

Neste processo, entende-se que a invasão fúngica, dentre outros patógenos, resulta na diminuição do poder de germinação, emboloramento visível, descoloração, odor desagradável, perda de matéria seca e aquecimento (CHRISTENSEN e KAUFMAN, 1969).

A palavra micotoxinas é derivada da justaposição dos termos gregos “*mykes*” (fungo) e “*toxicon*”, (toxina ou veneno) (GOLDBLATT, 1972). Compreende um complexo de substâncias tóxicas, produzidas por fungos filamentosos que, dependendo da sua concentração nos alimentos e rações, causa graves problemas à saúde humana e a animal (MOSS, 1998). Este aspecto deve ser ressaltado,



porque dos cerca de 400 tipos de micotoxinas conhecidos, apenas 30 foram detalhadamente estudados (ETZEL, 2002).

O desenvolvimento dos fungos toxigênicos, com conseqüente produção de micotoxinas, depende de uma série de fatores, tais quais (CIEGLER, 1978): (a) susceptibilidade do substrato à colonização do fungo produtor; (b) fatores físicos adequados como temperatura ambiente, umidade do substrato, umidade relativa do ar durante o armazenamento, aeração, danos mecânicos, tempo de armazenamento; (c) fatores biológicos como capacidade genética do fungo na produção de micotoxinas, quantidade de esporos viáveis, interação de diferentes fungos no mesmo substrato, interação de micotoxinas e presença de insetos nos grãos armazenados. Dentre estes desencadeadores, o tipo de substrato adotado, tanto como os índices de umidade e de temperatura são os que mais influenciam a produção de micotoxinas (CORRÊA, 2000).

## 7 CONCLUSÕES

Com base nos objetivos propostos no presente trabalho e nas suas condições de realização, conclui-se que:

- Sob condições favoráveis, *A. alternata* irradiada com 2, 5 e 7 kGy demonstrou grande capacidade de germinação e produção de toxinas;
- *A. alternata* mostrou grande resistência nas doses de radiação utilizadas;
- O emprego da radiação gama diretamente na cepa de *A. alternata*, com posterior inoculação nas amostras de trigo e de milho, propiciou aumento no número de UFC/g, comparativamente ao número do grupo controle;
- Com o emprego da radiação gama diretamente na cepa de *A. alternata*, com posterior inoculação nas amostras de arroz e girassol, houve diminuição de número de UFC/g, comparativamente aos valores do grupo controle;
- A microscopia eletrônica de varredura possibilitou a nítida visualização das alterações morfológicas das células fúngicas, proporcionalmente à dose radiação aplicada;
- Quanto às doses de radiação aplicadas no tratamento das amostras, não foram observadas, em comparação ao grupo controle, alterações relevantes nas análises, bromatológica, de minerais, das vitaminas pantotenato de cálcio e niacina e na análise dos ácidos graxos;
- Nas soluções padrão, irradiadas com 2, 5 e 10 kGy, não foram observadas alterações nos respectivos espectros das toxinas;
- Os experimentos revelaram ser importante a escolha adequada da dose de radiação a ser adotada, tanto quanto do substrato, de modo a que haja a completa eliminação de *Alternaria alternata*.

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

