



**UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA**

---

**LUCIANA PEREIRA BERND**

**MODELAGEM COM ÊNFASE NO CRESCIMENTO DE  
FUSARIUM VERTICILLIOIDES E PRODUÇÃO DE  
FUMONISINAS NA PERDA DA QUALIDADE DE MILHO**

---

Londrina  
2006

**LUCIANA PEREIRA BERND**

**MODELAGEM COM ÊNFASE NO CRESCIMENTO DE  
FUSARIUM VERTICILLIOIDES E PRODUÇÃO DE  
FUMONISINAS NA PERDA DA QUALIDADE DE MILHO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina como requisito necessário à obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka.

Londrina  
2006

**LUCIANA PEREIRA BERND**

**MODELAGEM COM ÊNFASE NO CRESCIMENTO DE  
FUSARIUM VERTICILLIOIDES E PRODUÇÃO DE  
FUMONISINAS NA PERDA DA QUALIDADE DE MILHO**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Eliana Badiale Furlong  
Universidade Federal do Rio Grande

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisabete Yurie Sataque Ono  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof<sup>a</sup>. Elisa Yoko Hirooka  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 07 de abril de 2006.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho com todo carinho em meu maior agradecimento, aos meus pais Guilherme Theo Bernd e Marion Pereira Bernd em nome de tudo o que representam para mim, pelo amor, incentivo, dedicação e apoio constante. À Deus, por permitir a concretização de mais uma etapa da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

À professora Elisa Yoko Hirooka pela confiança, valiosa orientação, dedicação, brilhantes ensinamentos e conselhos, inesgotável paciência, incentivo, exemplo de seriedade e, sobretudo, amizade, meu eterno agradecimento.

À Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade de realização deste trabalho, e a todos os professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, pela colaboração no meu aprendizado e crescimento.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida.

Ao Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, pela permissão do uso do homogeneizador e da câmara de germinação, muito importantes para a realização do trabalho.

Ao Departamento de Bioquímica (Centro de Ciências Exatas) desta instituição, pela permissão do uso do laboratório de Bioquímica, bem como de seus funcionários.

Ao pesquisador Antônio Carlos Gerage do Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR – Londrina, pelo fornecimento das amostras de milho utilizadas no desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr. Simbarashe Samapundo da Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences, Ghent University, Gent, Belgium, pela atenção prestada e envio de trabalhos científicos a respeito de modelagem preditiva.

À profa. Elisabete S. Ono, pela orientação no CLAE, quantificação das amostras e sugestões.

Aos professores Teresa Cristina R. M. de Oliveira e Fábio Yamashita, pelas preciosas sugestões no exame de qualificação.

Ao professor Édio Vizzoni, pelos conselhos estatísticos.

Ao professor Marcelo Canteri, pela confiança e oportunidade de realizar o estágio na docência.

À professora Lúcia S. A. Takahashi, pela colaboração nas análises fisiológicas e sugestões.

Ao professor Seiji Igarashi, e aos técnicos José e João do laboratório de Fitopatologia, pelo auxílio na identificação fúngica e preparo de aula prática durante o estágio na docência.

Ao Prof. Dr. Flávio Lazzari, pela doação de alguns exemplares de livros de sua autoria.

Ao Projeto FINEP – Cadeia Produtiva de Milho, pelo fornecimento de dados reais de contaminação; e ao Fundo Paraná e Seti, pelo apoio aos projetos científicos.

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos desta Instituição, pela colaboração.

Aos técnicos do laboratório de Fitotecnia, Geraldo e Bié, pelo auxílio no uso da câmara de germinação e abertura do laboratório quando necessário.

À Sandra Rezende, Elzinha, Berenice, Marli e, principalmente à Patrícia Sambaqui, por todo o auxílio e colaboração dedicados ao meu trabalho.

Ao meu estagiário Adriano Curioni, pela colaboração e dedicação durante a realização deste trabalho e amizade.

Aos meus eternos amigos Márcio de Barros, Fabíola Oliveira, Dayanne Fidelis, Luciana Lobato, Flávio Itano, Bruna Bassoli, Tatiana Marin e Elisa Lazzari pelos muitos momentos de descontração e alegria juntos, tornando estes dias de mestrado mais felizes e prazerosos, em especial à Cleusa Weber e Márcia Mata, pela força em todos os momentos.

Aos colegas Elisabete Hashimoto, Heberty Eduardo de Marco, Cláudio Takeo e em especial à Adriana Pereira da Silva, pelo auxílio na técnica de extração de fumonisinas; Marcelo da Silva, pela intensa colaboração desde o início do desenvolvimento do trabalho; Fernando Basso, pelos esclarecimentos via internet; Elaine Cunha Moreno, pela ajuda no CLAE; e Simone Fuji, pela paciência, atenciosa colaboração na metodologia ELISA e amizade.

À minha amada irmã, pelo amor, motivação e amizade; e aos meus avós, Valdir, Telma e Josefina, pelas preces, amor e incentivo.

Ao Marcio Garcia, pelo amor, incentivo constante, companheirismo e pela compreensão nos momentos de ausência.

A todos que tenham contribuído de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

*“A maior recompensa do nosso trabalho  
não é o que nos pagam por ele, mas aquilo  
em que ele nos transforma”.*

*(John Ruskin)*

BERND, LUCIANA P. **Modelagem com ênfase no crescimento de *Fusarium verticillioides* e produção de fumonisinas na perda da qualidade de milho.** 2006. 127f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2006.

## RESUMO

O milho tem importância relevante no mercado brasileiro e mundial por constituir a base de diversos alimentos destinados ao consumo humano, além de ser matéria-prima principal na indústria de rações animais. *Fusarium verticillioides*, freqüentemente associado ao milho, é o principal produtor de fumonisina, uma micotoxina que representa riscos à saúde da população e de animais. A manutenção da qualidade de milho no período pós-colheita tem sido motivo constante de preocupação do setor produtivo, aliado à exigência do controle de micotoxinas, tornando estudos centrados nos pontos críticos da produção de fumonisina assunto de importância fundamental. Em face disto, o trabalho objetivou desenvolver modelos matemáticos para descrever o efeito de umidade e temperatura no crescimento fúngico no milho, com ênfase em *F. verticillioides* e produção de fumonisinas, aliado à dinâmica da perda de qualidade desta matéria prima. Grãos de milho submetidos ou não ao tratamento térmico a 121°C/ 15 min foram ajustados para a umidade de 15, 20 e 25%, sendo inoculados ou não com *F. verticillioides* (cepa 103F) e, permaneceram incubados à temperatura de 20, 25 e 30°C por 20 dias. Os dados *in vitro* deste planejamento experimental possibilitaram a elaboração de modelos matemáticos preditivos para simulação de crescimento fúngico e produção de fumonisinas, assim como a avaliação do efeito de contaminação na qualidade físico-química e fisiológica de milho. Os modelos desenvolvidos foram aplicados inserindo dados reais de análise, pertencentes a amostras coletadas na entrada da moega (Projeto FINEP – Cadeia Produtiva de Milho). Maior crescimento de *Fusarium* spp. ocorreu em grãos mantidos a 25% de umidade sob 25°C, sendo que a umidade foi a variável que exerceu maior influência no crescimento fúngico, em comparação à temperatura. Já em relação à produção de fumonisinas, a variável temperatura exerceu maior influência, havendo níveis mais elevados de toxina a 20°C sob umidade de 25%. O teor de proteína, atividade de água e umidade elevaram-se com o aumento de umidade; o teor de extrato etéreo tendeu a um aumento na região intermediária de umidade (20%) e no nível superior de temperatura (30°C). Houve reduções no vigor e viabilidade das sementes mantidas por 20 dias nas condições adotadas para o planejamento experimental, sendo as mais acentuadas em milho estocado a 25% de umidade a 25°C. Os modelos desenvolvidos podem ser ferramentas úteis na simulação, visando a prevenção do crescimento de *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., bolores/ leveduras totais e produção de fumonisinas no milho. Outrossim, em virtude de estágio ainda inicial dos modelos obtidos, recomenda-se que seja dada a continuidade visando modelagem preditiva melhor adaptada e com maior flexibilidade, através da ampliação de variáveis, assim como incorporando fatores críticos na equação, essenciais para o crescimento fúngico e conseqüente produção de micotoxinas.

**Palavras-chave:** Cadeia produtiva de milho. *Fusarium verticillioides*. Fumonisina. Modelagem preditiva. Controle de qualidade. Metabolismo secundário. Pós-colheita.

BERND, LUCIANA P. **Modelling with emphasis to *F. verticillioides* growth and fumonisins production in loss quality of corn.** 2006. 127f. Dissertation (Master on Science of Foods) State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

### ABSTRACT

The corn is one of major commodity in Brazil and worldwide, due to its use as ingredient of many foods for human, in addition to claimed position in the industry of animal feed. *Fusarium verticillioides*, frequently associated with corn produces fumonisin group of micotoxin, which is hazardous to both human and animal health. The maintenance of quality in post-harvest corn has been a topic of concern in the productive section, where the exigency in the mycotoxin control also targets onto the critical points of the fumonisin production. This study aimed the development of mathematical models settled on the effect of moisture content and temperature in quality of corn, with emphasis on *F. verticillioides* growth and fumonisin production, as in physiological characteristic of grains. Corn submitted or not to thermal treatment (121°C / 15 min) were adjusted to moisture content of 15, 20 and 25%, then inoculated or not with *F. verticillioides* (strain 103F) series were incubated at 20, 25 and 30°C for 20 days according to ... experimental planning model. The data was used in elaboration of predictive mathematical models to simulate the fungal growth and fumonisin production, as well as their effect on physical-chemical and physiologic quality of corn. The developed models were applied inserting real analysis data belonging to samples collected in the entrance of "moega" (FINEP Project - Productive Chain of Corn). Higher *Fusarium* sp. growth occurred in corn maintained at 25% moisture content at 25°C. The variable which caused the highest influence in fungal growth was moisture content, while in fumonisin production the variable temperature was more significant. The highest fumonisin level was reached at 20°C under moisture content of 25%. The protein content and water activity increased proportionally with moisture content in grain, while the higher lipid content was reached with intermediate moisture (20%) at 30°C. The seed vigor and viability during 20 days experience decreased in the conditions adopted for the experimental planning, being the more accentuated in corn maintained at 25% of humidity at 25°C. The developed models can be an useful tool in the prevention of *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., total fungi / yeasts growth and fumonisin production in corn. However, this is still the initial step of developing models, and the improvement should be targeted on predictive model with higher flexibility through inclusion of additional variables, as well as insertion of further critical factors of the fungal growth and mycotoxin production.

**Keywords:** Productive chain of corn. *Fusarium verticillioides*. Fumonisin. Predictive modeling. Quality control. Secondary metabolism. Post-harvest.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura química dos principais análogos de fumonisinas. ....	27
Figura 2 –	Procedimento Operacional .....	44
Figura 3 –	Procedimento Operacional para padronização da quantidade de solo .....	46
Figura 4 –	Extração/purificação fumonisina .....	51
Figura 5 –	Quantificação de fumonisina por CLAE .....	52
Figura 6 –	Efeito das variáveis independentes pelo método de “Pareto Chart” no crescimento de <i>Fusarium</i> spp .....	66
Figura 7 –	Multiplicação de <i>Fusarium</i> spp. em relação às três variáveis estudadas .....	67
Figura 8 –	Crescimento de <i>Fusarium</i> spp. em relação à umidade e temperatura .....	68
Figura 9 –	Efeito das variáveis independentes pelo método de “Pareto Chart” na contagem total de bolores/leveduras .....	70
Figura 10 –	Contagem total de bolores/leveduras em relação à umidade e temperatura .....	71
Figura 11 –	Respostas observadas da contagem de bolores totais/leveduras (a), <i>Fusarium</i> spp. (b) e <i>Penicillium</i> spp. (c) em função das preditas pelo modelo; plotagem dos resíduos do modelo de crescimento de bolores totais/leveduras (d), <i>Fusarium</i> spp. (e) e <i>Penicillium</i> spp. (f)...	75
Figura 12 –	Linhas de contorno para o efeito da umidade e temperatura no crescimento de bolores totais/leveduras (a) e <i>Fusarium</i> spp. (b).Linhas de contorno para o efeito da umidade e inóculo no crescimento de <i>Penicillium</i> spp.(c).....	76
Figura 13 –	Efeito das variáveis independentes pelo método de “Pareto Chart” na produção de FB <sub>1</sub> (a) e FB <sub>2</sub> (b) .....	79
Figura 14 –	Produção de fumonisina B <sub>1</sub> (a) e B <sub>2</sub> (b) em função da umidade e temperatura .....	81
Figura 15 –	Respostas observadas de produção de FB <sub>1</sub> (a), FB <sub>2</sub> (b) e FB <sub>total</sub> (c) em função das preditas pelo modelo; distribuição normal dos resíduos do modelo de produção de FB <sub>1</sub> (d), FB <sub>2</sub> (e) e FB <sub>total</sub> (f).....	83

Figura 16 – Superfícies de resposta da produção de fumonisina B <sub>1</sub> (a) e B <sub>2</sub> (b) versus umidade e temperatura, mantido a presença de inóculo.....	84
Figura 17 – Cromatogramas de FB <sub>1</sub> e FB <sub>2</sub> em milho no tempo zero (t <sub>0</sub> ): (a) submetido ao tratamento térmico; (b) não submetido ao tratamento térmico .....	87
Figura 18 – Cromatogramas de FB <sub>1</sub> e FB <sub>2</sub> no substrato milho com tratamento térmico sem <i>F. verticillioides</i> (t <sub>20</sub> ).....	88
Figura 19 – Cromatogramas de FB <sub>1</sub> e FB <sub>2</sub> no substrato milho com tratamento térmico e contendo <i>F. verticillioides</i> (t <sub>20</sub> ).....	89
Figura 20 – Cromatogramas de FB <sub>1</sub> e FB <sub>2</sub> no substrato milho sem tratamento térmico e com <i>F. verticillioides</i> (t <sub>20</sub> ).....	90
Figura 21 – Efeito das variáveis independentes pelo método de “Pareto Chart” no teor de proteína (a) e no teor de extrato etéreo (b).....	98
Figura 22 – Superfície de resposta para o teor de proteína (a) e extrato etéreo (b) na presença de inóculo de <i>F. verticillioides</i> . .....	99
Figura 23 – Linhas de contorno para a umidade (a) e atividade de água (b) na presença de inóculo de <i>F. verticillioides</i> .....	101
Figura 24 – Poder germinativo dos grãos de milho em relação à umidade, temperatura e inoculo .....	103
Figura 25 – Efeito das variáveis independentes pelo método de “Pareto Chart” no poder germinativo .....	103
Figura 26 – Superfície de resposta para o poder germinativo (a) e vigor (b) na presença de inóculo de <i>F. verticillioides</i> .....	104

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Fungos micotoxígenos e respectivas micotoxinas .....	23
Tabela 2 –	Níveis e fatores do planejamento experimental .....	47
Tabela 3 –	Planejamento fatorial codificado e não codificado e as respectivas amostras .....	47
Tabela 4 –	Avaliação de parâmetros físico-químicos e contagem fúngica para otimização de quantidade de solo adicionado como veículo do inóculo de <i>F. verticillioides</i> em milho (sem adição – 0,5% solo) .....	57
Tabela 5 –	Perfil microbiológico, fisiológico e físico-químico de milho híbrido Tork safra março/2005 utilizado no ensaio ( $t_0$ ).....	59
Tabela 6 –	Resultados do planejamento experimental para milho submetido ao tratamento térmico ( <i>Fusarium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., leveduras, bolores/leveduras totais, umidade, proteína, extrato etéreo, atividade de água e fumonisinas FB <sub>1</sub> e FB <sub>2</sub> ); e para milho não tratado termicamente (germinação e vigor).....	63
Tabela 7 –	Valores de “p” pelo teste de Shapiro Wilk’s e Levene para avaliar aplicabilidade* da análise variância (ANOVA) .....	64
Tabela 8 –	Efeitos e análise de variância para a contagem de <i>Fusarium</i> spp. e <i>Aspergillus</i> spp. no milho submetido ao tratamento térmico ( $t_{20}$ - $t_0$ ) ....	65
Tabela 9 –	Efeitos e análise de variância para a contagem de <i>Penicillium</i> spp., leveduras e total de bolores/leveduras no milho submetido ao tratamento térmico ( $t_{20}$ - $t_0$ ). .....	69
Tabela 10 –	Modelos matemáticos para crescimento total de bolores/leveduras, <i>Fusarium</i> spp. e <i>Penicillium</i> spp .....	72
Tabela 11 –	Equações dos modelos matemáticos para crescimento total de bolores/leveduras, <i>Fusarium</i> spp. e <i>Penicillium</i> spp .....	73
Tabela 12 –	Avaliação da performance dos modelos matemáticos por meio de índices de validação .....	74
Tabela 13 –	Modelos matemáticos para a produção de FB <sub>1</sub> e FB <sub>2</sub> e fumonisina total .....	78
Tabela 14 –	Equações dos modelos matemáticos para produção de FB <sub>1</sub> e FB <sub>2</sub> e fumonisina.....	79

Tabela 15 – Índices de validação para a performance dos modelos matemáticos.....	82
Tabela 16 – Aplicação de dados reais (Projeto FINEP - Cadeia Produtiva de Milho) aos modelos matemáticos desenvolvidos para microbiota.....	95
Tabela 17 – Aplicação de dados reais (Projeto FINEP - Cadeia Produtiva de Milho) aos modelos matemáticos desenvolvidos para FB <sub>1</sub> , FB <sub>2</sub> e Fbtotal.....	96
Tabela 18 – Efeito e análise de variância para o teor de proteína e extrato etéreo no milho submetido ao tratamento térmico (t <sub>20</sub> - t <sub>0</sub> ) .....	97
Tabela 19 – Efeito e análise de variância para a umidade e atividade de água no milho submetido ao tratamento térmico .....	100
Tabela 20 – Valores de “p” pelo teste de Shapiro Wilk’s e Levene para avaliar aplicabilidade* da análise variancia (ANOVA) .....	102
Tabela 21 – Análise de variância referente às análises bromatológicas (0; 0,2; 0,3; 0,5% de solo) e contagem fúngica (0,5% solo).....	126
Tabela 22 – Análise de variância referente às análises bromatológicas (0; 0,1; 0,15 e 0,25% de solo) e contagem fúngica (0,15%) .....	126

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	18
2.1 OBJETIVO GERAL .....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
3.1 MILHO .....	19
3.2 CONTAMINAÇÃO FÚNGICA E MICOTOXINAS .....	21
3.2.1 Fungos Toxígenos .....	22
3.2.1.1 <i>Fusarium verticillioides</i> .....	24
3.2.2 Micotoxina .....	25
3.2.2.1 Fumonisinas .....	26
3.3 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FUMOSINAS .....	29
3.4 FATORES QUE INTERFERM NA PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS .....	31
3.5 QUALIDADE DE SEMENTES .....	34
3.6 MODELOS MATEMÁTICOS PREDITIVOS EM FUNGOS MICOTOXIGÊNICOS .....	36
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
4.1 MATERIAL .....	41
4.1.1 Infra-estrutura .....	41
4.1.2 Matéria-prima .....	41
4.1.3 <i>Fusarium verticillioides</i> .....	42
4.2 MÉTODOS .....	42
4.2.1 Procedimento Operacional .....	42
4.2.2 Preparo do Inoculo .....	44
4.2.3 Padronização da Quantidade de Solo .....	45
4.2.3.1 Quantidade de Solo para Análises Físico-químicas .....	45
4.2.3.2 Quantidade de Solo para Análise Microbiológica .....	45
4.2.4 Planejamento Experimental .....	46
4.2.5 Avaliação Fisiológica de Milho .....	48
4.2.5.1 Teste de Germinação .....	48

4.2.5.2 Teste de Vigor (primeira contagem do teste de germinação).....	48
4.2.6 Análises Físico-químicas.....	49
4.2.7 Análise Microbiológica.....	49
4.2.7.1 Contagem total de Bolores e Leveduras .....	49
4.2.8 Análise de Micotoxinas.....	50
4.2.8.1 Extração/ Quantificação de Fumonisinias .....	50
4.2.9 Métodos Matemáticos e Estatísticos .....	52
4.2.9.1 Validação dos Modelos Matemáticos .....	53
4.2.9.1.1. Validação matemática/estatística .....	53
4.2.9.1.2. Validação gráfica .....	55
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
5.1 SELEÇÃO DA QUANTIDADE DE SOLO .....	56
5.2. PERFIL MICROBIOLÓGICO, FISIOLÓGICO E FÍSICO – QUÍMICO DE MILHO HÍBRIDO TORK SAFRA MARÇO/2005 UTILIZADO NO ENSAIO.....	58
5.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	61
5.3.1. Planejamento Experimental para Milho Tratado Termicamente.....	64
5.3.1.1. Análise de Planejamento Fatorial para Respostas Microbiológicas .....	65
5.3.1.1.1. Efeito de umidade e temperatura na contagem de Fusarium spp. E Aspergillus spp. (milho com ou sem inóculo de F. verticillioides).....	65
5.3.1.1.2. Efeito de umidade e temperatura na contagem de Penicillium spp., leveduras e total de bolores/leveduras (milho com ou sem inóculo de F. verticillioides) .....	68
5.3.1.2. Modelagem Matemática para os Gêneros Fúngico.....	71
5.3.1.2.1. Validação matemática/ estatística dos modelos matemáticos para crescimento fúngico .....	73
5.3.1.2.2. Validação gráfica dos modelos matemáticos para crescimento fúngico.....	74
5.3.1.3. Análise de Planejamento Fatorial para Produção de Fumonisinias .....	77
5.3.1.3.1. Validação matemática/estatística dos modelos matemáticos para produção de fumonisinias .....	82
5.3.1.3.2. Validação gráfica dos modelos matemáticos para produção de fumonisinias .....	83
5.3.1.3.3. Cromatogramas de quantificação de FB <sub>1</sub> e FB <sub>2</sub> no milho.....	84

5.3.1.4.Aplicação de Dados Reais aos Modelos Matemáticos .....	90
5.3.1.5.Análise de Planejamento Fatorial para Respostas Físico-químicas .....	97
5.3.1.5.1.Efeito de umidade e temperatura no teor de proteína e extrato etéreo (milho com ou sem inóculo de F. verticillioides) .....	97
5.3.1.5.2.Efeito de umidade e temperatura no teor de umidade e atividade de água (milho com ou sem inóculo de F. verticillioides) .....	100
5.3.2.Planejamento Experimental para Grãos de Milho Não Tratados Termicamente .....	101
5.3.2.1.Análise de planejamento fatorial para respostas fisiológica .....	102
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>105</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>107</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>125</b>
ANEXO A.....	126

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem na agropecuária a base da economia, garantindo fornecimento contínuo de insumos de origem vegetal e animal, sendo o cenário mundial atual favorável à consolidação deste país como grande exportador. Em 2005, a produção total de cereais, leguminosas e oleaginosas do Brasil atingiu 112,715 milhões de toneladas; o IBGE estima uma produção de 127,612 milhões de toneladas para a safra brasileira de 2006, valor este superior em 13,22% ao ano anterior. No cenário, o Estado do Paraná ocupa posição estratégica pela maior produção de grãos, com destaque ao milho pela maior produtividade nacional.

O milho é uma importante fonte nutricional e componente constante na alimentação humana, assim como representa 60 a 70% da composição de rações empregadas na suinocultura e avicultura. Outrossim, sua qualidade nutricional confere característica ideal, que aliado favorável ao crescimento fúngico, tem sido constante motivo de preocupação em relação ao perigo de degradação de grãos e da produção de micotoxinas.

Alimentos destinados ao consumo humano sofrem contaminações das mais variadas origens desde o plantio, colheita, armazenamento da matéria-prima, processamento, embalagem a comercialização do produto final, sendo a composição química, um dos fatores determinantes no grau e tipo de contaminação.

No caso de grãos, o principal risco com relação à infestação microbiana, refere-se ao crescimento fúngico. Estes produzem metabólitos secundários, as micotoxinas, capazes de causar alterações patológicas resultantes de anormalidades fisiológicas em humanos e animais.

*Fusarium verticillioides* Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon) destaca-se entre os fungos envolvidos na qualidade pós-colheita de milho, cujo metabólito secundário tóxico principal produzido pertence ao grupo de fumonisinas, classificadas como carcinógenas do grupo 2B, isto é, possíveis carcinógenas a humanos pelo “International Agency for Research on Cancer”.

A ocorrência freqüente de *Fusarium verticillioides* em milho e a possibilidade de produção de fumonisinas, justificam a necessidade de estudo direcionado ao ponto crítico de controle na produção destas toxinas. O

monitoramento de toda cadeia produtiva é crucial, uma vez que o processamento industrial não elimina as toxinas préformadas nos grãos de milho.

Em face disto, o trabalho pretende contribuir com a minimização de contaminação de milho através do estudo da dinâmica da perda de qualidade, pela contaminação por *F. verticillioides* e produção de fumonisinas, propondo modelos matemáticos preditivos de risco.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver modelos matemáticos para descrever o efeito de umidade e temperatura no crescimento fúngico no milho, com ênfase em *F. verticillioides* e produção de fumonisinas, aliado à dinâmica da perda de qualidade em grãos. O fato visa estabelecer os níveis de parâmetros prioritários (temperatura e umidade) na pós-colheita, especificamente na etapa antecedente à secagem de milho, para minimizar a produção de fumonisinas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Padronizar a quantidade de solo a ser utilizada como veículo destinado ao inóculo de *F. verticillioides* em milho previamente caracterizado (microbiologia, fisiologia e físico-química), para uso como substrato na pesquisa;

Desenvolver planejamento experimental para:

(i) Estabelecer os níveis dos parâmetros prioritários (temperatura e umidade) a serem controlados na etapa antecedente à secagem;

(ii) Analisar as mudanças físico-químicas (proteína, extrato etéreo, umidade e atividade de água) e fisiológicas (teste de germinação e vigor) das sementes devido ao crescimento de *F. verticillioides* nos grãos de milho;

(iii) Propor modelos matemáticos visando estimativa da contagem de *F. verticillioides* e outros fungos contaminantes predominantes no milho, bem como do teor de 20 fumonisinas, seguida de validação matemática/ estatística e gráfica dos modelos desenvolvidos;

Aplicar o modelo desenvolvido (dados laboratoriais *in vitro*) aos dados reais da contaminação natural fúngica e níveis de fumonisinas (Projeto FINEP – Cadeia produtiva de Milho).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na última década, a importância da qualidade de grãos concentrou-se particularmente em relação ao aspecto físico, sanitária e nutricional, responsável desde desempenho de rebanhos à saúde humana.

A qualidade de grãos vem sendo assunto prioritário ao setor produtivo, seja in natura, industrializado e/ou sob forma de subprodutos animais; já que a comercialização baseada em peso e qualidade incide maior impacto no preço final (LAZZARI & LAZZARI, 2000).

#### 3.1 MILHO

O milho classifica-se entre uma das plantas comerciais mais importantes no mundo globalizado. As indicações mostram sua origem no México, América Central ou Sudoeste dos Estados Unidos, com escavações arqueológicas/geológicas e medições por desintegração radioativa comprovando que seja uma das culturas mais antigas do mundo, i.e. cultivado há pelo menos 5.000 anos. Imediatamente pós-descobrimto da América, foi levado à Europa, para ser cultivado em jardins, até o reconhecimento do valor alimentício, estimulando o plantio em escala comercial desde a latitude de 58° norte (União Soviética) até 40° sul (Argentina) ([www.cnpms.embrapa.br](http://www.cnpms.embrapa.br)).

É uma planta mundialmente cultivada pertencente à família das Gramíneas, subdividida em tribos. A tribo *Maydeae* engloba oito gêneros, com destaque a três de origem americana, denominados de *Zea* spp., *Tripsacum* spp. e *Euchlaena* spp.. Entre estes *Zea* spp. 22 destaca-se pela importância econômica e social, o *Tripsacum* spp. devido ao uso na forragem e o *Euchlaena* spp. por ser precursor do milho (SOTOMAYOR-RIOS & WEIBEL, 1987).

No Brasil, o cultivo ocorre em todas as regiões, sendo que a produção nacional corresponde a 7% da produção mundial. O Estado do Paraná é o maior produtor nacional, com a produção de 6,7 milhões de toneladas em 2005,

segundo o Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA), divulgado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

A importância econômica de milho se caracteriza pelas diversas formas de utilização, estendendo-se desde a alimentação animal à indústria de alta tecnologia. O uso de milho na alimentação animal representa a maior parte de consumo desse cereal, i.e., cerca de 70% no mundo. Nos Estados Unidos, cerca de 50% destina-se a esse fim, enquanto que no Brasil varia de 60 a 80%, dependendo da fonte de estimativa e de ano para ano.

A fonte energética de alimentação humana com derivados de milho constitui fator primordial em regiões com baixa renda, a exemplo do Nordeste brasileiro e população mexicana, onde o milho constitui o ingrediente básico da culinária. O milho contém quantidade apreciável de amido (70%), além de proteína (10%) e lipídeo (4,5%). Através da refinação e processamento obtém-se dextrinas, óleos para fins alimentares e industriais, além de glicoses líquida e sólida.

O milho e seus subprodutos também se destacam na alimentação especialmente de ruminantes, constituindo-se em complementação adicionada em forragens verdes, fenos, silagens e palhas, por serem pobre em nutrientes digestíveis e energia (KRUG *et al.*, 1996).

Os cereais complementam aproximadamente 70% da necessidade protéica humana em países subdesenvolvidos, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (TOSELLO, 1999).

A elevada concentração de carboidratos confere ao milho um elevado valor energético (1660 kJ/100g), enquanto que o óleo extraído constitui excelente fonte de ácidos graxos, representados pelos ácidos linoléico (59,8%), oléico (25,8%), palmítico (11%), esteárico (1,7%) e linolênico (1,1%) (MORETTO & FETT, 1998). Todavia, a proteína presente no endosperma do milho é deficiente em aminoácidos essenciais - lisina e triptofano, limitando o valor nutricional. Atualmente, o mercado disponibiliza diversos híbridos de milho visando melhoramento na qualidade protéica da semente, seja em termos de quantidade como qualidade das frações protéicas (TOSELLO, 1999).

### 3.2 CONTAMINAÇÃO FUNGICA E MICOTOXINAS

As propriedades intrínsecas associam o milho à vulnerabilidade diante de ataque de fatores biológicos constituídos de fitopatógenos e/ou de deterioração, com destaque especial a fungos micotoxigênicos. *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. subglutinans*, *F. graminearum*, *F. solani*, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Colletotricum graminicola*, *Helminthosporium maydis*, *Stenocarpella maydis*, *S. macrospora*, *Diplodia* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum* spp., *Nigrospora* spp., *Trichoderma* spp. e *Acremonium* spp. constituem os fungos predominantes na microbiota de milho (GONZÁLEZ *et al.*, 1995; JULIAN *et al.*, 1995; MACDONALD e CHAPMANN, 1997; KEDERA *et al.*, 1999; ONO *et al.*, 1999; DESJARDINS *et al.*, 2000; KPODO *et al.*, 2000; ORSI *et al.*, 2000).

Os principais danos causados pelos fungos no milho são (i), perda de peso/descoloração/necrose dos grãos e (ii), produção de micotoxinas, sendo o fator decisiva a liberação de produtos agrícolas no comércio internacional globalizado (JULIAN *et al.*, 1995).

Entre os pontos de estrangulamento na cadeia produtiva do milho, a impossibilidade de análise de micotoxinas em todos os lotes recebidos, em nível de cooperativas e processadores devido ao alto custo, vem sendo motivo de constante preocupação. Por outro lado, a escassez de silos e secadores nas propriedades rurais brasileiras expõe os grãos pós-colheita à umidade favorável ao desenvolvimento de microrganismos toxigênicos nas etapas de pré-secagem. O fato inclui exposição de grão com maturação fisiológica máxima a condições desfavoráveis no campo, o transporte e tempo de espera para a descarga e permanência na moega, permitindo o crescimento microbiano, assim como a fatores extrínsecos favoráveis ao desencadeamento da ativação de metabolismo secundário, com ênfase na produção de micotoxinas pelos fungos contaminantes (THIEL *et al.*, 1991; BACON & WILLIAMSON, 1992).

Estudo anterior já demonstrou que nessas fases, a concentração de fumonisinas pode aumentar em até 10 vezes, prejudicando a qualidade do produto (FIGUEIRA *et al.*, 2003c; ONO *et al.*, 2002).

### 3.2.1 Fungos Toxígenos

Os fungos são organismos heterotróficos isentos de clorofila, dependentes exclusivos de fonte externa de componentes orgânicos para suprir a demanda energética. Esta característica confere a muitas espécies, a necessidade de subsistência com organismos superiores, através de parasitismo ou saprofitismo, constituindo em importante contaminante em alimentos desencadeadores de deterioração (SWEENEY & DOBSON, 1998).

Em termos práticos, dois aspectos indesejáveis resultam do crescimento e multiplicação de fungos: a perda econômica e o risco potencial à saúde, oriunda da produção de micotoxinas (MISLIVEC, 1979). Os fungos produtores de micotoxinas são abundantes no solo, nos restos de cultura das plantas, em moegas, silos, sendo detectados em todos os locais de armazenagem e processamento de produtos. O ataque ou infecção dos grãos pelos fungos toxígenos inicia-se no campo durante o desenvolvimento, maturação e colheita, com o incremento no transporte, moega, secagem e armazenamento (LAZZARI & LAZZARI, 2000).

As principais espécies tóxicas de fungos e respectivas micotoxinas predominantes são apresentadas na tabela 1.

**Tabela 1** – Fungos micotoxígenos e respectivas micotoxinas.

Fungos micotoxígenos	Micotoxinas
<i>Aspergillus flavus</i> ; <i>A. parasiticus</i>	Aflatoxinas, ác. ciclopiazônico
<i>A. ochraceus</i> ; <i>Penicillium viridicatum</i> ; <i>P. cyclopium</i>	Ocratoxina A
<i>P. expansum</i>	Patulina
<i>Fusarium culmorum</i> ; <i>F. graminearum</i> ; <i>F. sporotrichioides</i>	Deoxinivalenol
<i>F. sporotrichioides</i> ; <i>F. poae</i>	Toxina T-2
<i>F. poae</i> ; <i>F. graminearum</i> ; <i>F. sporotrichioides</i>	Diacetoxicirpenol
<i>F. culmorum</i> ; <i>F. graminearum</i> ; <i>F. sporotrichioides</i>	Zearalenona
<i>F. verticillioides</i>	Fumonisina
<i>Acremonium coenophialum</i>	Alcalóides ergopeptina
<i>Acremonium lolli</i>	Alcalóides lolitrem
<i>Phomopsis leptostromiformis</i>	Fornicinas
<i>Pithomyces chartarum</i>	Esporidesminas

Fonte: MELLO & MACDONALD (1997).

As pesquisas têm demonstrado que a ocorrência de micotoxinas e micotoxicoses não se restringe a um determinado clima ou região geográfica. A ocorrência natural de micotoxinas devido à contaminação por *Fusarium* spp. normalmente associa-se a cereais de países com clima temperado, por requererem temperaturas mais brandas para o crescimento e produção de micotoxinas, se comparado ao gênero *Aspergillus*. Entretanto, a revisão realizada por Scott (1990)

indicou a contaminação de *Fusarium* spp. Amplamente difundida nos cereais de países tropicais. Placinta *et al.* (1999) descreveram contaminação múltipla de cereais e ração animal por tricotecenos, zearalenona e fumonisinas, indicando coocorrência das principais micotoxinas de *Fusarium* spp.. As espécies toxígenas de *Fusarium* spp. são fitopatogênicos comuns responsáveis por doenças de difícil controle, tornando inevitável a contaminação em grãos de cereais.

### 3.2.1.1 *Fusarium verticillioides*

*Fusarium* spp. é um gênero fúngico amplamente disseminado em plantas nativas e cultivadas, mas a importância primordial se deve à atuação como patógeno primário de milho a nível cosmopolita, sendo responsável pela perda econômica de centenas de milhões de dólares anuais (HIROOKA, 2000).

Membros do gênero *Fusarium* são reconhecidamente um dos maiores problemas na agricultura (DOKO *et al.*, 1996) e, se enquadram entre os fitopatógenos mais importantes do mundo (NELSON *et al.*, 1983). A presença de *Fusarium* spp. em grãos estocados diminui a qualidade e o valor econômico (MARÍN *et al.*, 1998a), além de contribuir para perdas nutricionais deste cereal básico, induzindo doenças e redução da performance em humanos e animais (MARÍN *et al.*, 1999a).

*F. verticillioides*, cuja fase anamórfica é *Giberella fujikuroi*, é um fungo universal associado ao milho (MARASAS, 2001), presente no solo de regiões tropicais e subtropicais. A infecção predominante ocorre na fase final de desenvolvimento e maturação de milho e, uma vez estabelecida, pode desenvolver-se rapidamente dependendo das condições climáticas. Além da produção de fumonisinas, *F. verticillioides* produz uma grande quantidade de esporos responsáveis pela doença em espiga, colmo e raízes (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997), assim como podridão de sementes em germinação (MATHRE & JOHNSTON, 1995). Grãos, sabugo e partes contaminadas da planta constituem em inóculo para a safra seguinte. Os esporos podem causar a contaminação cruzada entre milho colhido e armazenado, devido à mistura de diferentes lotes oriundos da colheita até o processamento final (LAZZARI, 1997).

A faixa de temperatura ótima para o crescimento de *F. verticillioides* situase entre 22,5 a 27,5°C e atividade de água mínima de 0,98 (MARÍN *et al.*, 1998a). De acordo com SAMAPUNDO *et al.* (2005), em condições experimentais, um aumento na atividade de água e/ou temperatura aumenta a taxa de crescimento de *F. verticillioides*. A variação na atividade de água de grão num experimento laboratorial pode ocorrer inclusive no momento da inoculação de esporos fúngicos, que, tradicionalmente, se realiza adicionando a suspensão diretamente no substrato grão. O aumento significativo na atividade de água em grão pode ser anulado utilizando-se veículos sólidos na transferência dos esporos aos grãos, a exemplo de solo (PALACIOS CABRERA *et al.*, 2001).

### **3.2.2 Micotoxinas**

O termo micotoxina, originário de palavra grega “mykes” (fungo) e de palavra latim “toxicum” (toxina), é usado para definir um grupo de compostos altamente tóxicos produzidos por fungos infectantes de produtos e subprodutos agrícolas (LAZZARI, 1994; SCUSSEL, 1998). Entre estes, citam-se o milho, amendoim, trigo, triticale, cevada, centeio, farelos, canjicas, quireras, farinhas, rações e outros alimentos destinados ao consumo humano e animal. O caráter carcinogênico, mutagênico, teratogênico e imunodepressivo de determinadas micotoxinas tem sido motivo de intoxicação aguda ou crônica em homem e/ou animais, com intenso esforço concentrado no controle e eliminação da cadeia produtiva de alimentos (SWEENEY & DOBSON, 1998).

As micotoxinas, produzidas numa infinidade de cereais, vêm merecendo atenção considerável não só ao nível de criação animal, mas também sob aspectos relacionados à saúde pública. A contaminação de grãos por estas toxinas gera prejuízos financeiros decorrentes de baixa qualidade de grão, baixa performance animal e ainda limita as exportações devido às restrições impostas pelos países importadores (MALLMANN, 1998).

Em decorrência de esforços da comunidade científica internacional, desde 1960 novas micotoxinas vêm sendo isoladas e caracterizadas, especialmente

as fusariotoxinas, com destaque especial às fumonisinas, que juntamente com as aflatoxinas, podem ser consideradas de ocorrência mundial (POZZI *et al.*, 2002).

### 3.2.2.1 Fumonisinas

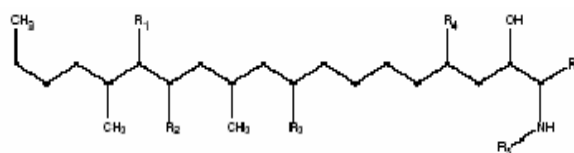
Fumonisinas, metabólitos secundários produzidos por *F. verticillioides* (GELDERBLOM *et al.*, 1988; BEZUIDENHOUT *et al.*, 1988), têm sido meta de intensa investigação na micotoxicologia atual, devido a sérios riscos de intoxicação animal e efeito promotor de câncer, inclusive a humanos. Outras espécies do gênero também produzem fumonisinas, a exemplo de *F. proliferatum* (ROSS *et al.*, 1990), *F. nygamai* (THIEL *et al.*, 1992), *F. anthophilum*, *F. dlamini* e *F. napiforme* (NELSON, 1992), *F. subglutinans* (SCOTT, 1993), *F. polyphialidicum* (ABBAS e OCAMB, 1995), *F. oxysporum* (AH SEO & WON LEE, 1999).

A elucidação da estrutura química da fumonisina foi realizada por Bezuidenhout *et al.* (1988). Os 28 análogos de fumonisinas caracterizados até o momento podem ser separados em quatro grupos, denominados de fumonisinas das séries A, B, C e P (MUSSER e PLATTNER, 1997; RHEEDER *et al.*, 2002). As toxinas da série B (FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> e FB<sub>3</sub>) compreendem as fumonisinas toxicologicamente importantes, por constituírem os contaminantes naturais de milho, sendo que a FB<sub>1</sub> representa 70% do total de fumonisinas detectadas (MARASAS, 1996; RHEEDER *et al.*, 2002).

Conforme mostra a figura 1, as fumonisinas são diésteres de propano-1,2,3- ácido tricarbóxico e 2-amino-12,16-dimetilpoliidroxieicosanos, com o grupo hidroxila no C<sub>14</sub> e C<sub>15</sub> esterificados com o grupo carboxila terminal do ácido tricarbóxico (SORIANO & DRAGACCI, 2004).

Este amino-poliálcool é um composto tricarbóxico (TCA) altamente polar, solúvel em água, acetonitrila/ água e em metanol, insolúvel em solventes apolares, com ponto de fusão aproximada de 105°C (SCUSSEL, 2000).

Os grupamentos TCA e amina apresentam papel específico na atividade biológica das fumonisinas, sendo que a remoção dos mesmos pode reduzir a potência de toxidez no fator de 10 e 50 vezes, respectivamente (MERRIL *et al.*, 1993; BOLGER *et al.*, 2001).



Análogos	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
FB <sub>1</sub>	TCA	TCA	OH	OH	H	CH <sub>3</sub>
FB <sub>2</sub>	TCA	TCA	H	OH	H	CH <sub>3</sub>
FB <sub>3</sub>	TCA	TCA	OH	H	H	CH <sub>3</sub>
FB <sub>4</sub>	TCA	TCA	H	H	H	CH <sub>3</sub>
FC <sub>1</sub>	TCA	TCA	OH	OH	H	H
FC <sub>2</sub>	TCA	TCA	H	OH	H	H
FC <sub>3</sub>	TCA	TCA	OH	H	H	H
FC <sub>4</sub>	TCA	TCA	H	H	H	H
AP <sub>1</sub>	OH	OH	OH	OH	H	CH <sub>3</sub>

\*FB: fumonisinas do grupo B; FC: fumonisinas do grupo C; AP: aminopentol; TCA: ácido tricarbóxico. Fonte: SORIANO & DRAGACCI, (2004).

**Figura 1** – Estrutura química dos principais análogos de fumonisinas.

A semelhança estrutural de fumonisinas, ao esqueleto carbônico de esfingolípídeos, justifica a sua interferência no metabolismo biossintético de todos os componentes celulares envolvendo a presença deste grupo de lipídio complexo (esfingomielinas, gangliosídeos, entre outros). As fumonisinas inibem a esfingosina *N*-acetil transferase (ceramida sintetase), uma enzima da síntese de esfingolípídeos. O fato resulta no acúmulo de bases esfingóides (esfinganina e esfingosina) em contraste à depleção de esfingolípídeos, alterando a proliferação e diferenciação celular e regulação de apoptose (WANG *et al.*, 1991). Este desequilíbrio no metabolismo de esfingolípídeos poderia estar relacionado à ação tóxica e carcinogênica em animais, uma vez que o acúmulo de esfinganina inibe o crescimento celular, além de ser citotóxico, portanto a falta de esfingolípídeos altera o 32 comportamento celular (SWEENEY apud WANG *et al.*, 1991; DILKIN *et al.*, 2003; MINERVINI *et al.*, 2004).

A ingestão de fumonisinas através de ração contaminada induz uma variedade de respostas nos animais testados, incluindo-se neuro, renal e hepatotoxicidade, podendo conduzir à morte (NELSON *et al.*, 1993; GELDERBLOM *et al.*; 1992). Fumonisinas são conhecidas por induzirem leucoencefalomácia em eqüídeos (KELLERMAN *et al.*, 1990), edema pulmonar em suínos (OSWEILER *et al.*, 1992), nefro-toxicidade e câncer hepático em ratos (GELDERBLOM *et al.*, 1991), aterosclerose em macacos (NORRED & VOSS, 1994), imunossupressão em aves (LI *et al.*, 1999) e hemorragia cerebral em coelhos (BUCCI *et al.*, 1996).

A ocorrência natural de fumonisinas em milho foi estatisticamente relacionada com altas taxas de câncer esofágico humano na África do Sul (MARASAS *et al.*; 1988; RHEEDER *et al.*, 1992; SYDENHAM *et al.*, 1990b; THIEL *et al.*, 1992), norte da Itália (FRANCESCHI, *et al.*, 1990), Irã (SHEPHARD *et al.*, 2000), sudoeste dos Estados Unidos (GELDERBLOM *et al.*, 1992) e com o desenvolvimento de câncer hepático primário na China (CHU e LI, 1994; GROVES *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2001) e outros países, onde este cereal constitui a base da dieta diária.

Embora os limites legais para fumonisinas ainda não estejam estabelecidos, o “Mycotoxin Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians” recomenda 5, 10, 50 e 50 µg/g para rações de eqüinos, suínos, bovinos e aves, respectivamente (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997). A Suíça recomenda o limite de 1µg/g para os derivados de milho destinados ao consumo humano (VISCONTI & BOENKE, 1995). A recomendação estabelecida pelo “Food and Drug Administration” (FDA) para consumo humano se limita em 2,0 µg/g de fumonisinas (FB1+FB2+FB3) para farelos de milho, 3,0 µg/g para milho pipoca e 4,0 µg/g para milho destinado à produção de massas (AVANTAGGIATO *et al.*, 2002).

A elevada freqüência desta micotoxina no milho brasileiro é preocupante. Os levantamentos apontaram a ocorrência de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> em 97,4% e 94,8%, respectivamente, em 48 amostras de milho analisadas, sendo 39 do Estado do Paraná e 9 do Mato Grosso do Sul (HIROOKA *et al.*, 1996). Silva *et al.* (2004) avaliaram o potencial toxígeno de 35 isolados de *F. verticillioides* obtidos de amostras de sorgo do Estado de São Paulo e, detectaram produtores de FB1 em 91,5% dos isolados.

A produção de fumonisinas depende de fatores biológicos, enfatizando-se a susceptibilidade do vegetal à infecção fúngica e a capacidade genética do fungo em produzir micotoxinas, assim como fatores ambientais envolvidos com as condições de desenvolvimento da planta, colheita e estocagem de grãos. O teor de umidade do grão e temperatura são fatores críticos na regulação do crescimento de *F. verticillioides* e produção de micotoxinas. Além disso, o grau de maturação do grão influencia a sua produção, sendo maior em grãos mais maduros (THIEL *et al.*, 1991; CAHAGNIER *et al.*, 1995; WARFIELD *et al.*, 1999; DILKIN *et al.*, 2002; ONO *et al.*, 2002).

Relatos sobre o desenvolvimento em armazenagem indicam o potencial de *F. verticillioides* em produzir micotoxinas em diversas condições de estocagem. (ONO *et al.*, 2002; SORIANO & DRAGACCI, 2004). A produção de fumonisinas pode ser iniciada no campo sob condições favoráveis devido ao parasitismo do fungo, mas podem aumentar sob estocagem imprópria, i.e., as fumonisinas são produzidas tanto no campo como na armazenagem (BACON & NELSON, 1994). A contaminação natural por fumonisinas em sementes de milho estocado em condições de umidade adequada confirma que as micotoxinas são produzidas antes do estágio de secagem (MILER, 2001).

### **3.3 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS**

O impacto de fumonisinas na segurança alimentar, aliada à significativa perda econômica na produção de milho, torna imprescindível o desenvolvimento de técnicas para o controle de qualidade eficiente e viável, desde o campo até o produto final pelos países fornecedores de matéria-prima agropecuária.

Métodos analíticos para a análise de fumonisinas iniciam com a extração da toxina empregando solvente polar constituído de metanol-água (SCOTT & LAWRENCE, 1994; SHEPHARD *et al.*, 1990), acetonitrila-água (CASTELO *et al.*, 1998) ou acetonitrilametanol- água (VISCONTI *et al.*, 2001). A seguir procede-se à limpeza por meio de coluna de fase sólida ou fase reversa (C18) (RICE *et al.*, 1995), imunoafinidade (TRUCKSESS *et al.*, 1995) ou troca iônica (SYDENHAM *et al.*, 1996). As metodologias usualmente utilizadas na detecção e quantificação de

fumonisinias incluem cromatografia em camada delgada (GELDERBLOM *et al.*, 1988; ROSS *et al.*, 1991; PLATTNER *et al.*, 1990), cromatografia gasosa-espectroscopia de massa (JACKSON & BENNET, 1990; SYDENHAM *et al.*, 1990a) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência (GELDERBLOM *et al.*, 1988; ALBERTS *et al.*, 1990; SHEPHARD *t al.*, 1990; WILSON *et al.*, 1990; ROSS *et al.*, 1991), ou espectrometria de massa (MUSSER, 1996). Somam-se ainda, os métodos imunoenzimáticos como uma alternativa promissora para o setor produtivo, devido à alta sensibilidade, reprodutibilidade e simplicidade, que permite uma rápida análise viável no controle de qualidade, seja no campo ou na indústria (AZCONA-OLIVEIRA *et al.*, 1992a e b; PESTKA *et al.*, 1995; ONO *et al.*, 2000).

Outrossim, a técnica para detecção de fumonisinias oficialmente aceita pela “Association of Official Analytical Chemistry” (AOAC) é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (SYDENHAM *et al.*, 1996). Cromatógrafos líquidos são compostos por reservatório, sistema de bombeamento de fase móvel, sistema para a introdução de amostra, sistema analítico de coluna cromatográfica, termostato de colunas, sistema de detecção e registro e tratamento de dados (CIOLA, 1998).

A fase estacionária da cromatografia líquida é selecionada conforme as propriedades físico-químicas do analito em estudo e conseqüentemente, baseado no mecanismo de separação (Hanai, 1999). A sílica constitui o material de escolha para compor a fase estacionária da CLAE, devido à diversidade de aplicação e possibilidade de modificação na superfície pela adição de grupos alquila. Os mais comuns são C8 e o C18, que se ligam quimicamente aos grupos silanóis superficiais (SILVA *et al.*, 2002, TONHI *et al.*, 2002). A cromatografia de fase reversa caracteriza-se pela menor polaridade da fase estacionária em relação à fase móvel (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH AB, 1999).

A modificação na superfície da sílica introduzindo uma camada de grupamento ativo visa agregar, em um material único, as propriedades químicas de grupo orgânico, aliado à rigidez e estabilidade térmica e hidrolítica da sílica (TONHI *et al.*, 2002). A principal desvantagem da sílica como matriz de fase reversa consiste na instabilidade química em solução aquosa com pH alto, não se recomendando o uso de pH superior a 7,5, devido à dissolução da fase sólida (AMERSHAM PHRAMACIA BIOTECH AB, 1999).

As fumonisinas são compostos de alta polaridade, portanto podem ser adequadamente eluídas com água e solventes polares pela CLAE. Todavia, a molécula não contém cromóforos no espectro visível ou ultravioleta, devendo-se proceder à derivatização no grupamento amina primário da molécula, para torná-la fluorescente (SYDENHAM *et al.*, 1990a).

O derivatizador de escolha tem sido orto-ftaldialdeído (OPA), que reage com a amina primária da fumonisina sob condições alcalinas (pH 9,0 – 10,0) na presença de 2-mercaptoetanol à temperatura ambiente em tampão borato (MYHARA *et al.*, 1996). A desvantagem desta derivatização consiste na instabilidade do derivado fluorescente, iniciando-se o processo de decomposição nos primeiros minutos após o preparo, além de interferentes fluorescentes derivados oriundos da reação com os componentes da matriz, principalmente em alimentos processados (HARTL & HUMPF, 1999; SHEPHARD, 1998; SYDENHAN *et al.*, 1992b; SHEPHARD *et al.*, 1990).

### **3.4 FATORES QUE INTERFEREM NA PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS**

Grãos sofrem alterações na qualidade desde o estágio de maturação no campo, até o momento de consumo. As alterações na qualidade de grãos ocorridas no início da cadeia produtiva manifestam-se no produto final, afetando as características sensoriais e segurança de todos os alimentos, que têm esta matéria-prima como ingrediente (canjica, fubá, cereal matinal, pães, entre outros). Soma-se ainda a sua participação na alimentação animal através de ração, causando contaminação indireta pelo consumo dos produtos de origem animal (SWEENEY & DOBSON, 1998). As perdas na qualidade decorrem da presença de fungos, insetos e manuseio incorreto durante a colheita, recebimento, secagem e armazenamento de matéria-prima. Aliado a isto, as condições climáticas adversas durante a colheita constituem os fatores relevantes, que afetam a qualidade de trigo, milho, cevada, aveia, triticale, feijão e outros (LAZZARI & LAZZARI, 2000).

As condições essenciais que desencadeiam a produção de micotoxinas são: o armazenamento inadequado de grão (tempo, umidade e

temperatura) e o ataque de insetos nas imediações da colheita (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997; SANTURIO, 2004).

Entre os fatores listados, a atividade de água constitui o principal determinante do crescimento fúngico e, conseqüente deterioração de alimentos (CAHAGNIER *et al.*, 1995). O milho, cereal de importância relevante na produção animal no Brasil, poderá propiciar crescimento fúngico a partir de 0,717 de atividade de água (14% de umidade), sendo este valor o máximo permitido pela Legislação Federal para conservação de sementes de milho (BRASIL, 1989).

O requerimento de água divide os fungos contaminantes nos grãos em dois grupos ecológicos, denominados fungos de campo e armazenagem (CHRISTENSEN & SAUER, 1982). Os fungos de campo invadem os grãos no estágio de pré-colheita, ou nas espigas pós-colheita antes do debulhamento. O grupo requer alto teor de umidade (20-21%) e inclui os gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Helminthosporium*. Os fungos de armazenagem requerem teor de umidade na faixa de 16% para a invasão micelial e, compreendem as espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium* (WATSON & RAMSTAD, 1987).

Determinados fungos desenvolvem-se nos grãos imaturo ou maduro, desde que seja próximo ao período de pós-colheita ou armazenagem, vindo a constituir o terceiro grupo intermediário, que compreende os gêneros *Epicoccum*, *Nigrospora* e *Papularia* (MARSH & PAYNE, 1984). Segundo Hill *et al.* (1985), esta classificação é inadequada aos trópicos úmidos, onde *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. podem desenvolver-se ainda no campo e produzir micotoxinas no estágio pré-colheita. Além disso, Marsh & Payne (1984) indicaram que a situação não é tão definida como sugerem os esquemas de classificação de fungos em três categorias: campo, armazenamento e intermediários.

A temperatura também é fundamental ao crescimento fúngico, sendo que faixas térmicas ótimas correspondem à atividade máxima de cinética enzimática, capaz de propiciar multiplicação celular rápida (FURLONG, 2000). Por outro lado, o choque térmico parece estar relacionado à ativação enzimática responsável pela formação de toxina, tendo em vista a maior toxidez das cepas de *Fusarium* spp. em regiões de clima temperado, em contraste à alta toxicidade de *Aspergillus flavus* nos trópicos (MARÍN *et al.*, 1998a; SAUTOUR *et al.*, 2002).

Soma-se ainda o fator tempo que o fungo permanece sob condições favoráveis ao desenvolvimento, sendo necessárias apenas algumas horas para a produção de toxinas, em determinadas situações (THIEL *et al.*, 1991).

A formação de metabólitos secundários pode iniciar já na lavoura, salientando-se entre os fatores de extrema importância o estresse hídrico provocado pela estiagem; a infestação por plantas invasoras; a densidade de plantio, rotação de cultura e características minerais e microbiota presente no solo. A colheita tardia também pode influenciar na propagação fúngica, aumentando a exposição de grãos às condições ambientais e ao ataque de insetos/ pragas (DAVIS *et al.*, 1989; BACON & WILLIAMSON, 1992).

Relevância particular dada em regiões tropicais é o efeito de danos causados pelos insetos no campo e na estocagem, capazes de danificarem a camada do revestimento do grão, permitindo a invasão de micélios fúngicos. O dano mecânico e térmico, resultantes do processo de colheita, transporte, secagem e armazenagem removem a proteção externa natural do grão. A falta de regulagem na colheitadeira provoca trincas e quebras nos grãos, permitindo a entrada de fungos e, conseqüente produção de micotoxinas no estágio anterior à secagem (MALLMANN, 1998).

Entre outros fatores, a carga fúngica, ou seja, a quantidade de esporos no substrato, a competição entre grupos microbianos, ou a interação dos mesmos, influenciam no crescimento fúngico e conseqüente produção de micotoxinas (MARÍN *et al.*, 1998a,b; DOKO *et al.*, 1996). Além disso, no recebimento podem ocorrer misturas de cargas, longas filas de espera para secagem, secagem incompleta, mistura de lotes no silo ou armazém graneleiro e 39 armazenamento inadequado. A falta de controle no teor de umidade do produto armazenado, aliado à infiltração de água em silos e armazéns constituem as maiores responsáveis por altas perdas econômicas (LAZZARI & LAZZARI, 2000).

Na armazenagem, o incremento de micotoxinas depende da interferência de componentes da microbiota de grãos estocados no silo, i.e. outros grupos microbianos não-toxígenos na proliferação de micoflora toxigênica (MILLER, 2001). A corrente de convecção desloca e concentra a umidade nas massas de grãos mais frias do silo, desencadeando o crescimento fúngico e formação de “bolsões de toxinas”, cuja localização tende a ser no topo do silo no inverno, enquanto que no verão, ocorre na base do mesmo. Somam-se ainda o efeito de

distribuição heterogênea de impurezas, poeiras e grãos quebrados no interior do silo, contribuindo à formação de grão mofado. Além do perigo de micotoxinas, os bolores resultam na perda do teor de massa seca, gordura, vitaminas, minerais e aminoácidos (MALLMANN, 1998).

### 3.5 QUALIDADE DE SEMENTES

As perdas e deteriorações na qualidade podem ocorrer tanto na etapa pré ou pós-maturação fisiológica de grãos, envolvidas desde o campo. O milho atinge a maturação fisiológica, i.e. máximo de qualidade e peso em matéria seca, quando o grão encontra-se numa faixa de umidade entre 36-40%, fator este dependente do híbrido, localização geográfica, clima e outros fatores associados ao desenvolvimento. A seguir desencadeiam-se perdas gradativas na qualidade e quantidade nutricional, com o surgimento de condições propícias para a produção de micotoxinas, acarretando sérios problemas devido à dificuldade na detoxificação de grãos contaminados (LAZZARI & LAZZARI, 2001).

A utilização de sementes de qualidade é um fator primordial para o sucesso de culturas de interesse econômico, uma vez que garante a elevada porcentagem de plantas vigorosas e uniformes no campo, com reflexo posterior direto na produtividade do cultivo de milho (DURÃES *et al.*, 1993). Inúmeros fatores afetam o cultivo do milho, sendo de particular importância, a qualidade e vigor de sementes utilizadas. A qualidade pode influenciar a uniformidade, a velocidade e a porcentagem de emergência em campo, além de apresentar reflexos sobre a produção final.

A associação de *F. verticillioides* com o milho é endofítica, podendo tornarse externa ou sistêmica. A infecção sistêmica natural de grão não afeta necessariamente a germinação da semente, mas reduz o vigor e crescimento (BACON & WILLIAMSON, 1992).

Conforme Durães *et al.* (1995), o vigor das sementes de milho afetou a emergência em campo, a capacidade de plântulas em acumular a matéria seca nos estádios iniciais de crescimento, sendo consistente o efeito de vigor no crescimento vegetativo. Segundo Andrade *et al.* (2001), o uso de sementes de alta

qualidade, caracterizado pela elevada pureza, sanidade, viabilidade e vigor, seria um dos pré-requisitos fundamentais para obter maior produtividade na lavoura. A qualidade fisiológica de sementes depende de características genéticas de seus progenitores, além da germinação e vigor, sendo os dois últimos fatores afetados pela condição ambiental, método de colheita, secagem, processamento, armazenamento e embalagens.

O teste de germinação tem sido o método mais utilizado na determinação da qualidade de sementes, para obter o potencial de um lote quanto à formação de plântulas normais sob condições favoráveis. A viabilidade de uma amostra de sementes é expressa em termos de porcentagem de germinação.

O teste de vigor complementa a análise de germinação e, baseia-se no princípio que as amostras mais vigorosas apresentam maior porcentagem de plântulas normais na primeira contagem. Indiretamente, o teste avalia a velocidade de germinação, uma vez que maior porcentagem na primeira contagem indicaria a germinação mais rápida de sementes desta amostra em relação às demais (VIEIRA *et al.*, 1994).

Embora o vigor de sementes seja fundamental para o plantio no campo, também apresenta conotação importante no armazenamento, devido ao aumento no potencial de armazenagem em sementes com maior vigor. A deterioração de sementes devido a danos físicos nas membranas celulares e tempo fisiológico tem sido a principal causa da redução do vigor. O processo é complementado pelo aumento na taxa de respiração, mudanças hormonais, diminuição da síntese de RNA e proteínas, danos genéticos e acúmulo de metabólicos tóxicos (FRANZIN & ROVERSI, 2001).

Além de características de produtividade, a preocupação na qualidade também tem incidido diretamente sobre a resistência ao ataque de pragas e fungos micotoxigênicos. O mecanismo natural de defesa seria uma solução desejável para o controle de fitopatógenos na planta, caracterizada pela menor agressividade ao ecossistema (BETIOL, 1991). O controle com componentes naturais de defesa minimizaria os problemas oriundos de agrotóxicos, assim como forneceria subsídio para a produção de alimentos geneticamente modificados, com a utilização de genes inerentes da planta (SAUNDERS *et al.*, 2001; FIGUEIRA *et al.*, 2003a,b). As pesquisas vêm analisando um mecanismo de defesa ativo oriundo de participação ativa dos inibidores de amilase e protease naturalmente presentes em

milho, i.e., inibidores capazes de impedir a degradação de amido ou proteínas com finalidades nutricional ou energética pelo fungo (amilases e proteases fúngicas) e, subsequente controle desencadeando inibição no crescimento micelial (MAHONEY *et al.*, 1984; PUEYO & DELGADO-SALINAS, 1997; FIGUEIRA *et al.*, 2003a,b).

Assim sendo, milho ideal para o plantio seria um híbrido de excelente qualidade nutricional e reológica destinado à produção dos mais diferentes derivados alimentares. Aliado a isto, deveria ser caracterizado pela alta produtividade, pouco tempo de exposição ambiental (super-precoce), resistente à infestação de insetos, produção de micotoxinas e plantas daninhas, com ampla versatilidade perante diferentes condições climáticas.

### **3.6 MODELOS MATEMÁTICOS PREDITIVOS EM FUNGOS MICOTOXIGENOS**

Microbiologia preditiva de alimentos baseia-se na hipótese de que as respostas das populações de microrganismos perante fatores ambientais sejam reproduzíveis e, através de observações passadas, possibilitem prever o comportamento de microrganismos submetido a um ambiente particular. Os resultados são resumidos na forma de equações matemáticas as quais, por interpolação, podem ser usadas pra prever respostas em determinadas condições que ainda não foram especificamente testadas (ROSS, 1996).

A determinação de modelo matemático preditivo para um processamento alimentar, assim como para a instalação de armazenagem isento de risco biológico trata-se de metodologia baseada em cálculos. Assim sendo, através de equação tenta-se prever / simular processo oriundo de evento altamente dinâmico, mesclando características físico-químicas e fisiológicas, seja de matéria-prima, ou de patógeno capaz de multiplicar neste substrato (WIJTZES *et al.*, 1993). Consideração especial deve ser dada a alterações dependentes de carga microbiana na matéria-prima, condições climáticas regionais e introdução de novos agentes patogênicos relevantes, que possam influenciar na resposta do modelo matemático previamente desenvolvido. O tópico requer ampla compreensão sobre o metabolismo primário relacionado à fase logarítmica de crescimento (SIGMA-ALDRICH, 2003), em conciliação com os fatores que desencadeiam o metabolismo

secundário, onde cessa a multiplicação celular e inicia-se a produção dos mais diversos compostos bioativos, a exemplo de micotoxinas (MOLINA & GIANNUZZI, 2002).

Os cálculos devem modelar conforme a flexibilidade de processos fisiológicos, mantendo a qualidade nutricional e reológica do alimento específico em estudo, em associação a todos os recursos bioquímicos e expressão gênica do perigo biológico em questão. Portanto, uma constante observação e acompanhamento por um perito com amplo conhecimento e versatilidade de compreensão, capaz de associar eventos biológicos a processos operacionais físico-químicos, seriam essenciais para obter modelos funcionais e práticos. O fato requereria cálculo imediato à medida que ocorrerem mudanças na condição física, ou inclusão de novos ingredientes e lançamentos de novos produtos no mercado (DANTIGNY *et al.*, 2005).

A atividade microbiana frequentemente influencia a qualidade e segurança de alimentos, sendo assim, a microbiologia preditiva tem-se situado no entendimento do efeito de parâmetros intrínsecos e extrínsecos no crescimento e/ou inativação de microrganismos patogênicos nos alimentos. Estes modelos podem prever mudanças no número de microrganismos no produto com o tempo e, a dependência de condições químicas e físicas do produto (GOULD, 1989; ROBERTS, 1990 apud WIJTZES *et al.*, 1993).

A necessidade cada vez maior de alimentos oriundos de matéria-prima não perecível, resistente à estocagem durante longos períodos de escassez, sob forma de imensos silos e armazéns, vem criando atrito e dilema entre necessidade sob o ponto de vista segurança – abastecimento pleno de alimentos inócuos (“food security versus food safety”), devido ao crescimento populacional a nível mundial (LAZZARI, 1997). A associação segura entre estes dois fatores requer desenvolvimento de modelos direcionados ao controle do desenvolvimento de microrganismos xerofílicos, capazes não somente de causar deterioração, mas também da produção de metabólitos tóxicos, a exemplo de fungos micotoxígenos.

Atenção especial tem sido dada a modelos matemáticos para a descrição de crescimento microbiano em função de condições ambientais específicas, como temperatura, atividade de água, pH, disponibilidade de oxigênio, aliado às características físicas (difusibilidade, condutibilidade e solubilidade) e composição química do produto (DANTIGNY *et al.*, 2005).

Modelos preditivos representam um procedimento prático, rápido, fácil e relativamente de baixo custo, para estimar o crescimento microbiano (Mc MEEKIN *et al.*, 1993). Ênfase foi dada na área de termobacteriologia (ROSS *et al.*, 2000; SALTER *et al.*, 2000; FUJIKAWA & MOROZUMI, 2006), visando garantir a segurança sanitária de alimentos altamente perecíveis, em particular de enlatados, submetidos a tratamento capaz de eliminar todo o perigo microbiológico, porém com mínima perda de qualidade nutricional. O fator crítico sobre risco de *Clostridium botulinum* incidiu sobre processo operacional térmico buscando perigo zero, aliado à manutenção de características nutricionais e reológicas, num produto processado de baixa acidez (JUNEJA *et al.*, 1999).

Entretanto, a modelagem do crescimento fúngico não recebeu o mesmo enfoque dado às bactérias, em especial às patogênicas, responsáveis pelo perigo da produção de toxinas, devido às dificuldades inerentes na avaliação da taxa de crescimento fúngico e na reunião de dados suficientes, confiáveis e reprodutíveis (GIBSON *et al.*, 1994). Diferente de reprodução bacteriana, que ocorre por fissão binária homogênea, o crescimento fúngico envolve germinação e extensão de hifas, com penetração tridimensional na matriz alimentar (GIBSON & HOCKING, 1997).

Além disso, diferindo de bactérias envolvidas na toxinfecção alimentar, caracterizada pelo perfil grave e agudo com repercussão imediata na saúde, a contaminação fúngica esteve mais relacionada à deterioração, portanto sem muita relação com doenças fatais em humanos. No entanto, a relevante importância despontou com surto de aflatoxicose em perus ingerindo ração contendo torta de amendoim importada do Brasil na década de 60 (RICHARD *et al.*, 2003). Embora raramente esteja envolvida com intoxicação aguda, a ingestão contínua e crônica de compostos conhecidos como toxinas naturais de caráter cancerígeno, ou promotor de câncer vem sendo motivo de preocupação, principalmente devido a sua termo-estabilidade e, produção no início da cadeia produtiva de alimentos (SAMSON *et al.*, 1995).

Os modelos matemáticos podem ser usados para estimar o potencial de crescimento fúngico durante a colheita, assim como no período imediato pós-colheita e durante a estocagem. Uma determinada umidade e temperatura mantidas durante um período na pós-colheita, poderiam ser medidas através de aparelhos eletrônicos (medidor de umidade e termopar). Baseado nestes dados, o potencial de contaminação fúngica pode ser calculado, empregando um modelo matemático

previamente desenvolvido. A informação obtida pode ser usada como ferramenta útil nas decisões que direcionam o destino da matéria prima, i.e., milho com alto potencial de contagem fúngica deve ser estocado sob temperatura e umidade mais baixas, ou por um tempo mais curto para evitar a perda adicional de qualidade e produção de fumonisina (MARÍN *et al.*, 1999b).

O melhor entendimento sobre a dinâmica da produção de micotoxinas, durante a colheita e estocagem de grãos, pode ser obtido através do uso de modelos matemáticos para a predição da produção destas toxinas. Todavia, a produção de metabólitos secundários ainda é pouco entendida, assim como a relação entre as taxas de metabolismo primário e secundário não é bem esclarecida. Soma-se ao fato, que os mecanismos de degradação ou conjugação de micotoxinas não foram conclusivamente demonstrados (PITT, 1993). A contaminação por micotoxinas é difícil de se prever, uma vez que depende de interações entre fatores como temperatura, umidade, tipo de grão, espécies fúngicas presentes no substrato, histórico e tempo do armazenamento, tipo e tempo de transporte (CHELACK *et al.*, 1991 apud PARDO *et al.*, 2004).

Na literatura de microbiologia preditiva, é possível observar a utilização de métodos para comparação de modelos por meio do ajuste aos dados utilizados para gerá-los, ou para determinar se um modelo ajustado é estatisticamente aceitável em relação aos erros inerentes aos dados (ADAIR *et al.*, 1989; ZWIETERING *et al.*, 1990, 1994); para esta finalidade, utiliza-se a “validação” da análise de regressão, que envolve a comparação entre respostas preditas em relação às experimentalmente observadas (fatores de viés e exatidão, plotagem de valores observados versus preditos), análise de resíduos oriundos de dados, superfícies de resposta, coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e erro médio quadrático (EMQ) (ROSS, 1996; SAMAPUNDO *et al.*, 2005; ZURERA-COSANO *et al.*, 2006).

Os fatores de viés (“bias”) e exatidão têm sido utilizados principalmente para a validação de modelos preditivos em relação ao crescimento bacteriano. Te Giffel & Zwietering (1999) e Ross (1996) usaram o fator de viés e exatidão para a validação de modelos desenvolvidos, para descrever o crescimento de *Listeria monocytogenes*, obtendo fatores de exatidão na faixa de 1,26 a 4,25. Rasch (2002) conseguiu fator de viés e exatidão de 0,95 e 1,08, respectivamente, para modelos polinomiais utilizados para descrever a influência de temperatura, sal e pH no efeito inibitório de reuterina em *Escherichia coli*.

Aliada à elucidação de vias biossintéticas, a descrição da dinâmica de processos envolvidos em sistemas biológicos pode ser complementada por modelos matemáticos, vindo a constituir ferramentas poderosas na solução de problemas práticos nos diversos campos de âmbito técnico-científico. A modelagem matemática, em si, consiste em formular problemas de interesse em termos de proposições matemáticas bem fundamentadas, que possam espelhar o mundo ao nosso redor da forma mais realística possível. No contexto, o profundo conhecimento sobre o conjunto de fenômenos desencadeados pelo processo, relacionados com a situação desejada para a modelagem, seriam essenciais para prever os eventos futuros com a máxima confiabilidade e exatidão.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 MATERIAL**

#### **4.1.1 Infra-estrutura**

O trabalho foi desenvolvido nos laboratórios do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Departamento de Agronomia (Centro de Ciências Agrárias) e do Departamento de Bioquímica (Centro de Ciências Exatas), da Universidade Estadual de Londrina.

#### **4.1.2 Matéria-prima**

A matéria-prima utilizada no desenvolvimento do trabalho foi o milho do híbrido simples Tork pertencente à safra março/2005 da empresa Syngenta, regiões de Londrina e Santa Helena, e fornecido pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). Os grãos apresentavam características de textura dura e cor laranja. O lote de 35 Kg foi homogeneizado em misturador rotativo, em forma de V do Departamento de Agronomia, dividido em sacos plásticos de 1 Kg e mantido a 5°C até o momento do uso.

Grãos de milho da região Norte do Estado do Paraná da safra de 2004 foram fornecidos por uma cooperativa da região, amostrando-se 500g de milho imediatamente após a colheita (no campo), nos caminhões antes da descarga na moega e na saída da moega (antes da secagem); procedendo-se quantificação de fumonisinas e contagem fúngica após a amostragem. Este estudo objetivou determinar os Pontos Críticos de Controle relacionados à contaminação com fumonisinas na cadeia produtiva do milho. (Projeto FINEP – Cadeia Produtiva de Milho, 2003)

### 4.1.3 *Fusarium verticillioides*

*F. verticillioides* 103F que foi utilizado no estudo pertence à coleção de cepas isoladas de rações envolvidas em surto de intoxicação animal ocorrido em 1991 no Estado do Paraná, do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Tecnologia de Medicamentos e Alimentos – Universidade Estadual de Londrina – UEL (ONO *et al.*, 2004).

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Procedimento Operacional

Alíquotas de 500g de milho submetidos a tratamento térmico à 121°C por 15min. e igual quantidade não submetida a este processo, ambos em erlenmeyers de 1000mL, tiveram a umidade ajustada para 15, 20 e 25% adicionando água destilada estéril. Os erlenmeyers, que continham também uma quantidade definida de solo estéril (0,15%), foram inoculados com uma suspensão de *F. verticillioides* de  $4,67 \times 10^4$  esporos/g de milho e incubados em estufas tipo BOD a 20, 25 e 30°C, por 20 dias. O controle negativo consistiu de grãos de milho sem inóculo do fungo, submetidos às mesmas condições.

Os erlenmeyers foram manualmente agitados para homogeneização do material, sendo este procedimento também realizado a cada 7 dias de incubação para obter uma melhor distribuição fúngica nas amostras.

Os níveis dos parâmetros umidade e temperatura adotados neste estudo tiveram como finalidade a simulação das condições da moega observadas na cooperativa envolvida no Projeto FINEP na safra de milho 2004. A utilização de solo como veículo sólido para a transferência dos esporos do fungo aos grãos baseou-se no estudo de Palácios – Cabrera *et al.* (2001), para evitar o aumento da atividade de água do meio no momento da inoculação. A esterilização teve como propósito amenizar a interferência dos gêneros fúngicos contaminantes do milho no campo,

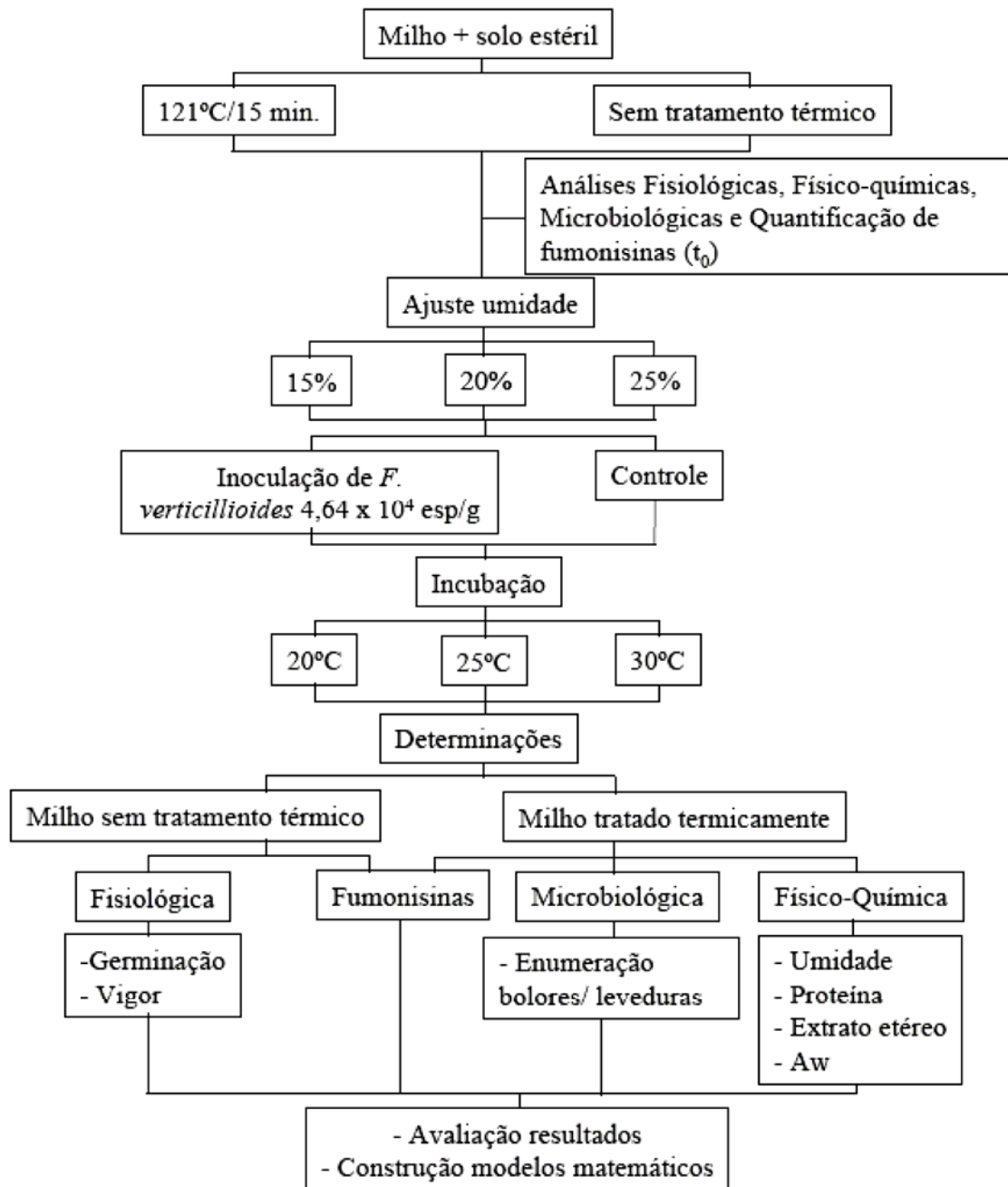
como por exemplo, *Penicillium* spp., que poderiam interferir no crescimento da espécie em estudo, *F. verticillioides*.

O ajuste de umidade dos grãos de milho foi realizado mediante cálculo da quantidade de água estéril a ser adicionada utilizando a fórmula (1):

mL água estéril =  $\left\{ \left[ \frac{100 - \text{umidade inicial}}{100 - \text{umidade final}} \right] - 1 \right\} \times \text{peso amostra(g)}$  (1)

Os grãos foram avaliados antes (tempo zero) e após o período de ensaio (20 dias), procedendo-se às análises físico-químicas, microbiológicas e fisiológicas; e concentração de fumonisinas. Os dados necessários para a avaliação da perda de qualidade e para a elaboração de modelos matemáticos foram obtidos mediante subtração dos valores dos parâmetros após decorridos os 20 dias de incubação (tempo 20) com os valores da condição inicial dos grãos de milho (tempo zero). A figura 2 mostra o esquema geral do procedimento experimental.

Posteriormente, os dados reais de umidade e temperatura, provenientes da safra 2004 (Projeto FINEP 2003) foram utilizados nos modelos matemáticos desenvolvidos. As respostas preditivas, para um período de 20 dias, da micoflora e concentração de fumonisinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>total</sub> em grãos de milho mantidos nestas condições, foram confrontadas com as das análises realizadas logo após a amostragem por pesquisadores envolvidos no Projeto FINEP.



**Figura 2** – Procedimento operacional

#### 4.2.2 Preparo do Inóculo

O inóculo de *F. verticillioides* foi preparado em água destilada contendo 0,1% de Tween 80, ambos estéreis, empregando cultivo ativado em ágar batata dextrose incubado por 14 dias a 25°C. A seguir procedeu-se à contagem em

câmara de Newbauer de  $2,33 \times 10^7$  conídios/mL de suspensão ( $4,64 \times 10^4$  esporos/g de milho), sendo esta inoculada em uma quantidade pré-determinada de solo previamente esterilizado com granulometria de 20  $\mu\text{m}$ , conforme Palácios-Cabrera *et al.* (2001).

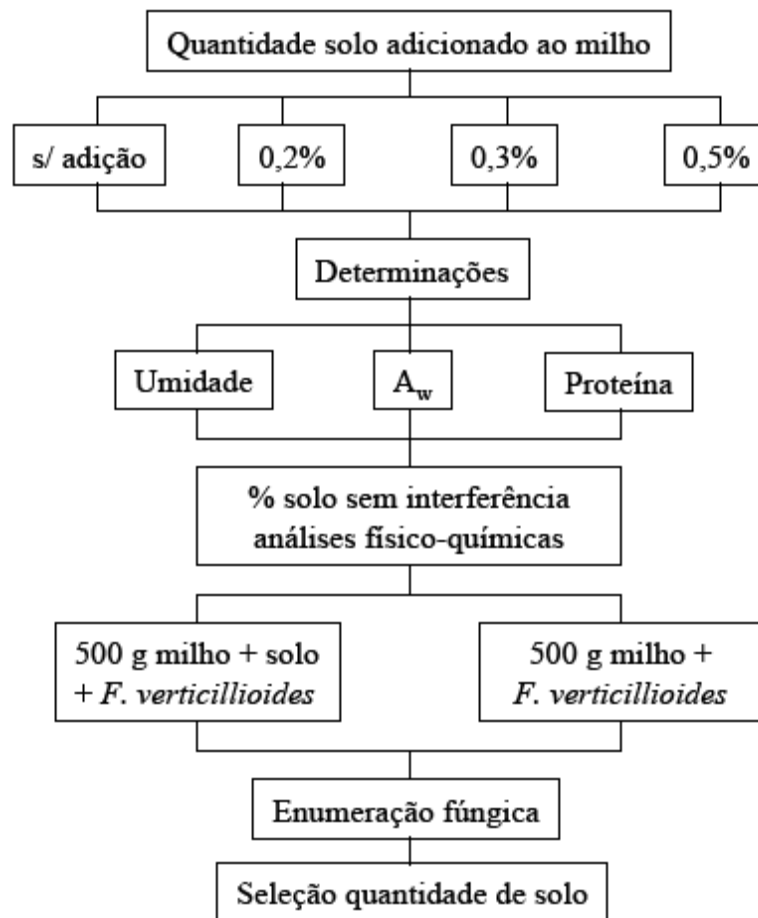
#### **4.2.3 Padronização da Quantidade de Solo**

##### **4.2.3.1 Quantidade de solo para análises físico-químicas**

Em estudo realizado por Basso (2003), foi observada uma interferência do solo utilizado como meio para a inoculação de esporos fúngicos em análises físico-químicas. Com a finalidade de eliminar esta interferência, foram adicionados 0; 0,2; 0,3; 0,5% de solo no milho, concentrações estas menores do que às utilizadas pelo autor. Após um período de 7 dias, procedeu-se à determinação do teor de umidade, atividade de água e proteína, verificando-se qual tratamento não se diferenciou do controle (ausência de solo), conforme demonstrado na figura 3.

##### **4.2.3.2 Quantidade de solo para análise microbiológica**

Selecionada a melhor proporção de solo:milho, i.e., a não interferência nas análises físico-químicas, procedeu-se com a confirmação de que esta quantidade não influenciaria no crescimento fúngico. Foi realizada uma inoculação de  $4,64 \times 10^4$  esporos/g de milho ( $2,33 \times 10^7$  conídios/mL de suspensão) acrescido ou não de solo estéril e após 7 dias, foi avaliada a contagem fúngica, conforme demonstrado na figura 3.



**Figura 3** – Procedimento Operacional para padronização da quantidade de solo

#### 4.2.4 Planejamento Experimental

Com a finalidade de interpretar a dinâmica da perda de qualidade e construir modelos matemáticos preditivos para o crescimento fúngico e produção de fumonisinas no milho, procedeu-se a um delineamento do tipo fatorial, inteiramente casualizado, onde o resíduo é a interação tripla dos fatores umidade, temperatura e amostras inoculadas com esporos de *F. verticillioides* x amostras sem esporos. Os níveis e fatores do planejamento fatorial estão expressos na tabela 2, enquanto que na tabela 3 constam os ensaios experimentais.

A aplicabilidade real dos modelos para contaminação fúngica e produção de fumonisinas foi avaliada introduzindo dados reais obtidos no rastreamento da cadeia produtiva do milho: estágio de entrada da moega, pertencente à safra 2004 (Projeto FINEP – Cadeia Produtiva de Milho).

**Tabela 2** – Níveis e fatores do planejamento experimental

Fatores	Mínimo (-1)	Intermediário (0)	Máximo (+1)
Umidade	15%	20%	25%
Temperatura	20°C	25°C	30°C
Inóculo <i>F. verticillioides</i>	ausente	-	presente

**Tabela 3** – Planejamento fatorial codificado e não codificado e as respectivas amostras

Variáveis codificadas			Variáveis originais			Codificação amostras	
Z	X1	X2	Inoculo	Umidade	Temperatura	Milho não esterilizado	Milho esterilizado
						492	382
1	-1	-1	c	15	20	187	742
1	0	-1	c	20	20	429	226
1	1	-1	c	25	20	324	522
-1	-1	-1	s	15	20	831	397
-1	0	-1	s	20	20	765	478
-1	1	-1	s	25	20	542	874
						213	534
1	-1	0	c	15	25	312	442
1	0	0	c	20	25	137	988
1	0	0	c	20	25	444	222
1	0	0	c	20	25	873	513
1	1	0	c	25	25	152	536
-1	-1	0	s	15	25	294	893
-1	0	0	s	20	25	111	976
-1	0	0	s	20	25	733	333
-1	0	0	s	20	25	975	232
-1	1	0	s	25	25	644	919
						567	651
1	-1	1	c	15	30	949	345
1	0	1	c	20	30	224	367
1	1	1	c	25	30	781	882
-1	-1	1	s	15	30	635	882
-1	0	1	s	20	30	518	926
-1	1	1	s	25	30	826	881

## **4.2.5 Avaliação Fisiológica de Milho**

### **4.2.5.1 Teste de germinação**

Para o teste de germinação foram utilizadas quatro repetições de 50 grãos de milho cada, de acordo com as recomendações contidas nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992). Foram analisados os grãos da condição inicial (tempo zero) e aqueles estocados sob as condições do planejamento experimental, com exceção dos submetidos ao tratamento térmico (121°C/ 15 min), uma vez que este tratamento impossibilita o crescimento das plântulas.

Foi utilizado como substrato rolo de papel-toalha tipo “germitest”, umedecido com água na proporção de 3:1 (peso da água: peso do papel seco). As sementes foram mantidas em germinador à temperatura constante de 25°C. Foram efetuadas contagens do número de plântulas normais, anormais e mortas, sendo estas contagens realizadas no quarto e sétimo dias após a semeadura e os resultados foram expressos em porcentagem média de plântulas normais.

### **4.2.5.2 Teste de vigor (primeira contagem do teste de germinação)**

Conduzido juntamente com o teste-padrão de germinação, o teste de vigor consistiu no registro da porcentagem de plântulas normais constatada na data estabelecida para a primeira contagem de germinação, ou seja, no quarto dia após a montagem do teste de germinação; os resultados foram expressos em porcentagem média de plântulas normais.

#### **4.2.6 Análises Físico-químicas**

A determinação do teor de umidade foi realizada procedendo-se à secagem em estufa a 105°C até obtenção de peso constante, de acordo com o método gravimétrico do Instituto Adolfo Lutz (1985); e a medida da atividade de água das amostras foi realizada no higrômetro AQUA-LAB, digital, modelo CX-2, fabricado pela Decagon Devices Inc, EUA. Conforme descrito na AOAC (1995), o teor de proteína bruta foi determinado pelo método de Kjeldahl, convertendo-se o teor total de N em proteína pelo uso do fator 6,25; e o teor de extrato etéreo, mediante extração com éter de petróleo, através do método de Soxhlet.

#### **4.2.7 Análise Microbiológica**

##### **4.2.7.1 Contagem total de bolores e leveduras**

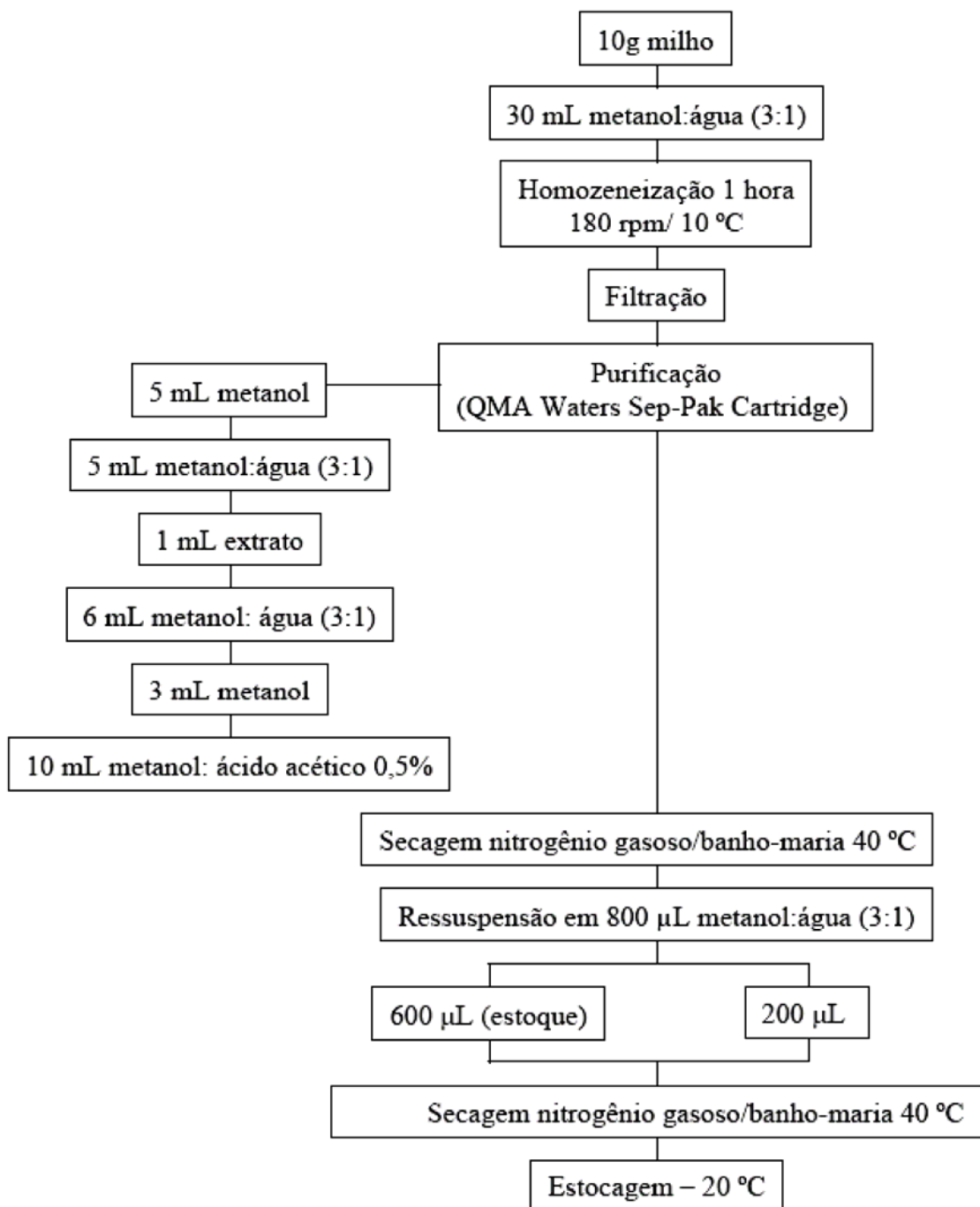
Antes da incubação e após decorridos os 20 dias de armazenagem do milho nas temperaturas e umidades testadas, foi realizada a contagem de bolores e leveduras segundo metodologia de plaqueamento em superfície (SILVA *et al.*, 2001), após decorridos 4 dias de incubação a 25°C . Utilizou-se como meio Ágar Batata Dextrose e a identificação dos gêneros fúngicos foi mediante reconhecimento preliminar dos esporos em microscópio.

## 4.2.8 Análise de Micotoxinas

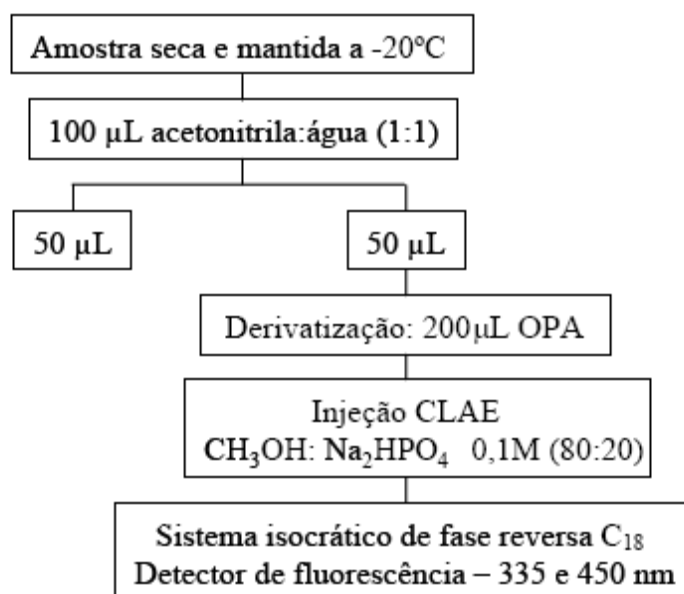
### 4.2.8.1 Extração/ quantificação de fumonisinas

A extração e determinação de fumonisinas foram realizadas segundo metodologia descrita por SHEPHARD *et al.*, 1990, modificada por UENO *et al.*, 1993.

Os grãos de milho foram triturados até atingir granulometria de 50 mesh e acondicionados em sacos plásticos impermeáveis à água e mantidos a  $-18^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise. Alíquotas de 10 g do material triturado adicionado de 30 mL de metanol:água (3:1, v/v) foram homogeneizadas a 180 rpm por 1 hora a  $10^{\circ}\text{C}$  em incubadora refrigerada (Shaker), marca Marconi®, seguido de filtração em papel filtro Whatman nº IV. O filtrado foi submetido à purificação empregando-se mini-colunas de troca aniônica Sep-Pak accell plus QMA (Waters Co., Ltda), sendo estas acondicionadas com 5 mL de metanol, seguido de 5 mL de metanol:água (3:1). Após aplicação de 1 mL de amostra, a coluna foi lavada com 6 mL metanol:água (3:1), seguida de 3 mL de metanol; sendo as fumonisinas eluídas com 10 mL de solução de ácido acético a 0,5% em metanol, conforme demonstrado na figura 4. O eluato foi seco sob fluxo de nitrogênio gasoso a  $40^{\circ}\text{C}$  e o resíduo solubilizado em acetonitrila:água (1:1, v/v), derivatizado com o-ftaldialdeído (OPA) e analisado em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) sistema isocrático de fase reversa, empregando-se coluna  $\text{C}_{18}$  (80 x 15 mm, com 1,5 g de sulfato de sódio anidro e 3,5 g de sílica gel 60G, 70-230 mesh, MERCK). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 nm e 450 nm, respectivamente. A fase móvel consistiu de metanol: fosfato de sódio 0,1M (80:20, v/v) pH 3,3 (ácido ortofosfórico); ajustado para o fluxo de 1,0 mL/min. Os limites de detecção para  $\text{FB}_1$  e  $\text{FB}_2$  foram de 50 ng/g e 80 ng/g, respectivamente. O procedimento de quantificação de fumonisinas é apresentado na figura 5.



**Figura 4** – Extração/purificação fumonisina



**Figura 5** – Quantificação de fumonisina por CLAE

#### 4.2.9 Métodos matemáticos e estatísticos

A padronização da quantidade de solo a ser utilizado como veículo para o inóculo de *F. verticillioides* em milho baseou-se na eliminação da interferência de solo na análise bromatológica e contagem fúngica em relação ao controle (ausência de solo). Os dados obtidos foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), para posterior aplicação do teste de Tukey, utilizando-se o programa “software Estatística, versão 6.0”.

A distribuição normal dos dados, por meio do Teste de Shapiro-Wilk’s W. e, a homogeneidade das variâncias, mediante aplicação do teste de Levene, foram utilizadas para averiguar a aplicabilidade da análise de variância (ANOVA). Segundo estes parâmetros, quando não há diferença estatisticamente significativa entre os dados experimentais e os testes, indica que os dados seguem uma distribuição normal e que há homogeneidade das variâncias, respectivamente.

Os coeficientes dos modelos e suas significâncias associadas aos fatores foram determinados mediante ajuste dos modelos ao conjunto de dados, usando análise de variância. Para verificar que não houve falta de ajuste dos dados

ao modelo construído, testou-se a média quadrática devida ao erro puro, utilizando o programa “software Estatística, versão 6.0”.

As variáveis estudadas no milho, consistindo de umidade ( $X_1$ ), inóculo ( $X_2$ ) e temperatura ( $X_3$ ) foram aplicadas no modelo sob a forma codificada, conforme equação (2).

$$\text{Variável codificada} = \frac{(\text{Variável descodificada}) - (\text{Ponto central})}{\text{Metade da faixa}} \quad (2)$$

#### 4.2.9.1 Validação dos modelos matemáticos

A validação matemática, estatística e gráfica consistem de ferramentas úteis para mostrar a capacidade de interpolação dos modelos, representando sub- ou super- ajuste de dados experimentais aos modelos desenvolvidos (GEERAERD *et al.*, 1998, 2004).

##### 4.2.9.1.1 Validação matemática/estatística

Os seguintes índices estatísticos e matemáticos foram calculados para avaliar a performance dos modelos preditivos de crescimento fúngico e produção de fumonisina: coeficiente de determinação ( $R^2$ ), erro médio quadrático (EMQ), fator de viés e fator de exatidão (ROSS, 1996; SAMAPUNDO *et al.*, 2005; GARCÍA-GIMENO *et al.*, 2005).

O melhor ajuste do modelo às respostas observadas ocorre quando o valor de  $R^2$  for mais próximo de 1, enquanto que o EMQ for mais próximo de zero (SUTHERLAND *et al.*, 1994), calculados pelas fórmulas (3) e (4), respectivamente.

$$\text{EMQ} = \text{SQR} / n \quad (3),$$

onde SQR são as somas quadráticas residuais e n é o número de graus de liberdade.

$$R^2 = SQR / SQT \quad (4),$$

onde SQR são as somas quadráticas residuais e SQT são as somas quadráticas totais.

O fator de viés (“bias”) responde a questão se, na média, os valores observados estão acima ou abaixo da linha de equivalência, i.e. se o modelo super- ou subestima a resposta predita, sendo estimado pela diferença média entre os valores observados e preditos. Quando não há desvio estrutural e o fator viés = 1, o modelo é exato (ROSS, 1996). O modelo é considerado seguro se o viés calculado for < 1, indicando super-estimação, i.e. a resposta predita pelo modelo é maior do que a resposta observada experimentalmente. Em contraste, um fator de viés > 1 indica modelo relativamente perigoso, já que as respostas observadas excedem as preditas (sub-estimação) (TE GIFFEL e ZWIETERING, 1999). O fator de viés é calculado pela fórmula (5).

$$\text{Fator de viés} = 10^{[S \log (\text{observado} / \text{predito}) / n]} \quad (5)$$

O fator de exatidão é a diferença média absoluta entre os valores preditos e observados, indicando a média da distância entre cada ponto e a linha de equivalência, ou seja, quanto uma predição difere da resposta observada. Sendo assim, este fator é uma medida do desvio médio e é usado como uma medida simples do nível de confiança do modelo matemático (ROSS, 1996). Este fator é calculado pela fórmula (6).

$$\text{Fator de exatidão} = 10^{[S \log |\text{predito} / \text{observado}| / n]} \quad (6)$$

#### **4.2.9.1.2 Validação gráfica**

A confiabilidade geral dos modelos também foi analisada mediante visualização de propriedades gerais dos modelos matemáticos desenvolvidos (validação gráfica), procedendo a plotagem das respostas observadas em função das preditas, bem como através do gráfico da distribuição normal de resíduos. Para avaliação da performance dos mesmos foram utilizadas as superfícies tridimensionais (superfícies de resposta) e as linhas de contorno dos modelos em função das variáveis investigadas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 SELEÇÃO DA QUANTIDADE DE SOLO

A quantidade de solo a ser utilizada como veículo destinado à inoculação de esporos de *F. verticillioides* foi selecionada avaliando-se diferentes proporções de solo:milho, tendo como base os dados preliminares obtidos por BASSO (2003). Considerando que a proporção de 2% de solo utilizado por este autor interferiu na determinação de parâmetros físico-químicos, em nosso trabalho testou-se inicialmente a redução da quantidade de solo adicionado para 0,5 - 0,1%, visando evitar interferência nas determinações (tabela 4).

A distribuição normal dos dados e a homogeneidade das variâncias foram analisadas aplicando os testes de Shapiro-Wilk's *W*. e Levene, respectivamente (ensaio 1, tabela 4). Os valores de "p" demonstraram a aplicabilidade da análise de variância, uma vez que os dados apresentaram uma distribuição normal, exceto os da atividade de água ( $p < 0,05$ ). Aliado ao fato, o teste de Levene indicou a homogeneidade de variâncias, já que não houve diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ).

Para avaliar se havia diferença entre pelo menos dois tratamentos, aplicouse a análise de variância (ANOVA) aos dados experimentais (anexo A, tabela 19), para prosseguir com teste de Tukey. Os resultados deste teste demonstraram que todos os tratamentos (0,2 - 0,5% de solo estéril) diferiram, ao nível de 95% de confiança, dos dados sem adição de solo nas análises físico-químicas (umidade, atividade de água e proteína) - ensaio 1, tabela 4. Aliado ao fato, observou-se influência significativa da adição de 0,5% de solo na contagem fúngica, desencadeando a multiplicação celular, favorecida pela provável presença de nutrientes no solo.

**Tabela 4** – Avaliação de parâmetros físico-químicos e contagem fúngica para otimização de quantidade de solo adicionado como veículo do inóculo de *F. verticillioides* em milho (sem adição – 0,5% solo).

Solo (%)	Parâmetros determinados*			
	Umidade (%)	Atividade de água	Proteína (%)	Média (faixa) UFC/g
<b>Ensaio 1</b>				
Sem adição de solo	9,45 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,99 ± 0,09 <sup>a</sup>	5x10 <sup>4</sup> <sup>a</sup> (4,8x10 <sup>4</sup> – 5,1x10 <sup>4</sup> )
0,2	10,75 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,62 ± 0,00 <sup>b</sup>	6,40 ± 0,24 <sup>b</sup>	NR
0,3	11,2 ± 0,14 <sup>b,c</sup>	0,67 ± 0,00 <sup>c</sup>	6,56 ± 0,07 <sup>a,b</sup>	NR
0,5	11,55 ± 0,07 <sup>c</sup>	0,67 ± 0,00 <sup>c</sup>	5,71 ± 0,00 <sup>c</sup>	3,9x10 <sup>5</sup> <sup>b</sup> (2,7 x10 <sup>5</sup> – 5,1x10 <sup>5</sup> )
Parâmetros p/ ANOVA**				
Shapiro-Wilk's W.	0,1513	0,0271***	0,3513	0,1285
Levene	0,0874	0,4993	0,2226	0,0829
<b>Ensaio 2</b>				
Sem adição de solo	8,65±0,21 <sup>a,b,c</sup>	0,58±0,01 <sup>a</sup>	5,08±0,27 <sup>a</sup>	7,4x10 <sup>5</sup> <sup>a</sup> (3,1x10 <sup>5</sup> – 11,7x10 <sup>5</sup> )
0,1	8,35±0,07 <sup>a,b</sup>	0,56±0,00 <sup>a</sup>	4,68±0,59 <sup>a</sup>	NR
0,15	8,70±0,00 <sup>a,b,c</sup>	0,55±0,00 <sup>a</sup>	5,11±0,26 <sup>a</sup>	7,6x10 <sup>5</sup> <sup>a</sup> (4 x10 <sup>5</sup> – 11,2x10 <sup>5</sup> )
0,25	9,25±0,21 <sup>a,c</sup>	0,56±0,00 <sup>a</sup>	4,86±0,07 <sup>a</sup>	NR
Parâmetros p/ ANOVA**				
Shapiro-Wilk's W.	0,6137	0,0389***	0,1967	0,1497
Levene	0,1719	0,1719	0,5102	0,8476

\* Média ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

\*\* Parâmetros de normalidade e homogeneidade utilizados para análise da aplicabilidade de ANOVA. Valores de “p” determinados pelos testes de Shapiro-Wilk's W. e Levene.

\*\*\* Significativo (p<0,05)

NR = não realizado

Considerando a contínua interferência de solo nas análises (ensaio 1, tabela 4), prosseguiu-se a repetição dos testes utilizando a metade das proporções de solo empregado no primeiro ensaio (0; 0,1; 0,15 e 0,25% solo), sendo os efeitos analisados inicialmente sobre as determinações físico-químicas, seguida de análise microbiológica. Os valores de “p” para o teste de Shapiro Wilk's W. e Levene, utilizados para análise de distribuição normal destes dados e homogeneidade das variâncias, constam no ensaio 2 da tabela 4. Os resultados indicaram a possibilidade do uso da Análise de Variância (anexo A, tabela 20) para avaliar a diferença estatística entre os tratamentos (p<0,05).

A análise pelo teste de Tukey (ensaio 2, tabela 4) indicou que a utilização de solo como veículo seco nas proporções de 0,1; 0,15 e 0,25% não interferiram significativamente na determinação do teor de atividade de água e de proteína (p>0,05). Somente o teor de umidade apresentou diferença no tratamento

com 0,1 e 0,25% de solo. Sendo assim, optou-se pela utilização de solo na proporção de 0,15%, para prosseguir com o ensaio quanto à interferência de veículo no crescimento fúngico.

Conforme indicado na tabela 4 (ensaio 2), não houve diferença significativa entre a quantidade de unidades formadoras de colônia fúngica ao nível de 95% de confiança entre controle e adição de 0,15% solo no milho. Em face disto, a quantidade de solo a ser utilizada no experimento foi fixada em 0,75g de solo/500g de milho, correspondente a 0,15% de veículo destinado à inoculação de esporos de *F. verticillioides*.

## **5.2 PERFIL MICROBIOLÓGICO, FISIOLÓGICO E FÍSICO-QUÍMICO DE MILHO HÍBRIDO TORK SAFRA MARÇO/2005 UTILIZADO NO ENSAIO**

A tabela 5 apresenta a característica inicial (tempo zero) de milho híbrido Tork destinado ao presente estudo, comparando os perfis de grão submetido ou não ao tratamento térmico (121°C/ 15 min). Os parâmetros avaliados consistiram de micoflora contaminante, concentração de fumonisinas e perfil físico-químico e fisiológico original inerente dos grãos.

**Tabela 5** – Perfil microbiológico, fisiológico e físico-químico de milho híbrido Tork safra março/2005 utilizado no ensaio (t<sub>0</sub>).

Parâmetros	Milho com tratamento térmico	Milho sem tratamento térmico	Valores de “p”
<i>Fusarium</i> spp. (UFC/g)	ND <sup>a</sup>	2,7 x 10 <sup>5</sup> ±2,0 x 10 <sup>5</sup> b	0,000
<i>Aspergillus</i> spp. (UFC/g)	ND <sup>a</sup>	3,3 x 10 <sup>3</sup> ±5,7 x 10 <sup>3</sup> b	0,000
<i>Penicillium</i> spp. (UFC/g)	ND <sup>a</sup>	4,3 x 10 <sup>4</sup> ±7,7 x 10 <sup>3</sup> b	0,000
Leveduras (UFC/g)	ND <sup>a</sup>	8,1 x 10 <sup>3</sup> ±1,4 x 10 <sup>4</sup> b	0,000
Total Bolores e leveduras (UFC/g)	ND <sup>a</sup>	2,3 x 10 <sup>5</sup> ±1,6 x 10 <sup>5</sup> b	0,000
Germinação (%)	(-) <sup>a</sup>	93,1±2,5 b	0,000
Vigor (%)	(-) <sup>a</sup>	86,8±7,1 b	0,000
Umidade (%)	13,1±0,48 <sup>a</sup>	13,2±0,3 <sup>a</sup>	0,831
Proteína (%)*	11,0±0,14 <sup>a</sup>	10,7±0,3 <sup>a</sup>	0,260
Extrato etéreo (%)*	10,1±1,37 <sup>a</sup>	8,2±0,5 <sup>a</sup>	0,095
Atividade de água	0,7895±0,0036 <sup>a</sup>	0,7390±0,0013 <sup>b</sup>	0,000
Fumonisinias (µg/g) FB <sub>1</sub>	3,67±2,60 <sup>a</sup>	3,78±1,25 <sup>a</sup>	0,950
FB <sub>2</sub>	0,99±0,38 <sup>a</sup>	0,91±0,34 <sup>a</sup>	0,577

\* Base seca; ND = não detectável (< 100 UFC/g)

\*\* Média ± desvio padrão seguida pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Conforme a tabela 5, o tratamento térmico não afetou as características físico-químicas de milho, referente aos teores de umidade (p = 0,831), proteína (p = 0,260) e extrato etéreo (p = 0,095), comprovando que o substrato tratado termicamente manteve composição físico-química semelhante ao material original sem tratamento. Salienta-se que cuidados foram tomados no momento do tratamento térmico, como o fechamento dos erlenmeyers contendo os grãos com papel filme e papel alumínio; a fim de evitar variações na umidade das amostras. Todavia, a atividade de água do grão pós-tratamento térmico apresentou aumento significativo (p = 0,00002), comportamento considerado esperado, já que se procedeu o tratamento térmico com calor úmido. Este dado contrastante entre atividade de água e o teor de umidade poderia indicar provável modificação nas propriedades reológicas da matéria prima, resultante do processamento térmico.

O tratamento térmico de 121°C/ 15 min não afetou a concentração de fumonisinias, já que o milho tratado apresentou 3,67 e 0,99 µg/g para FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>,

respectivamente, em relação a 3,78 e 0,91  $\mu\text{g/g}$  para as mesmas toxinas em milho não tratado termicamente ( $p > 0,05$ ). O fato indica a estabilidade térmica desta toxina, com possibilidade de permanência inalterada em processos normalmente empregados para obtenção de produtos derivados.

A contagem de *Aspergillus* spp., leveduras e total de bolores/leveduras (tabela 5, grãos não tratados termicamente) mostrou-se similar aos dados obtidos no milho híbrido Tork safra 2003 oriundo da região Norte do Paraná (Basso, 2003). A contagem de *Fusarium* spp. ( $2,7 \times 10^5$  UFC/g) e *Penicillium* spp. ( $4,3 \times 10^4$ ) apresentaram-se superiores na safra de 2005 (tabela 5), em relação à safra 2003 (Basso, 2003). Basso (2003) obteve contagem de *Fusarium* spp. de  $8,5 \times 10^3$  UFC/g, *Aspergillus* spp. de  $2,5 \times 10^3$  UFC/g, *Penicillium* spp. de  $7,9 \times 10^3$  UFC/g, leveduras de  $3,0 \times 10^4$  UFC/g e bolores/leveduras totais de  $2,6 \times 10^4$  UFC/g, em grãos de milho que apresentaram vigor 10% superior à safra 2004, i.e., 96%, e composição centesimal de 9,14% (proteína) e 10,91% (lipídeos).

O milho utilizado no presente estudo (tabela 5) apresentou perfil de contaminação natural semelhante aos estudos prévios realizados em 37 amostras de milho recém-colhido do Norte do Paraná (ONO *et al.*, 1999). Neste estudo, a contagem total de bolores e leveduras variou de  $1,9 \times 10^4$  a  $3,5 \times 10^6$  UFC/g, *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. variaram de  $1,0 \times 10^3$  a  $2,2 \times 10^6$  UFC/g e  $5,5 \times 10^3$  a  $2,8 \times 10^6$  UFC/g, respectivamente. As fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> foram detectadas em todas as amostras, com níveis variando de 0,37 a 13,46  $\mu\text{g/g}$  (média de  $4,56 \pm 2,97$   $\mu\text{g/g}$ ) e de 0,20 a 6,92  $\mu\text{g/g}$  (média de  $2,20 \pm 1,45$   $\mu\text{g/g}$ ), respectivamente. Da mesma forma que o lote de milho utilizado no ensaio (tabela 5), estes resultados relatados mostram a dificuldade em obter milho isento de fumonisina na região.

A predominância de *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. no híbrido Tork (tabela 5), corrobora com outros estudos brasileiros. Ono *et al.* (2004) detectaram *Fusarium* spp. em 98,7-100% das amostras e *Penicillium* spp. em 93-100% no Estado do Paraná. Almeida *et al.* (2002) analisaram a microflora de milho em duas regiões do Estado de São Paulo (Capão Bonito e Ribeirão Preto) e *F. verticillioides* prevaleceu em 35% e 49% e *Penicillium* spp. em 27% e 21% das amostras provenientes de Capão Bonito e Ribeirão Preto, respectivamente. Westhuizen *et al.* (2003) isolaram o gênero *Fusarium* em 93% das amostras de milho no Estado de Santa Catarina. Os dados também apresentam concordância em relação aos resultados obtidos pelo projeto FINEP (2003), apresentando maior ocorrência dos

gêneros *Fusarium* spp. (100%), *Penicillium* spp. (94,28%), leveduras (91,42%) e menor ocorrência dos gêneros *Aspergillus* spp. (11,43%) em grãos de milho safra 2004 do norte do Paraná.

Em relação ao nível de fumonisinas, o lote do híbrido Tork (tabela 5) apresentou níveis de fumonisina dentro do limite máximo de 5, 10, 50 e 50 µg/g recomendado para eqüinos, suínos, bovinos e aves, respectivamente, pelo "Mycotoxin Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians" (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997). Não obstante, considerando que o nível de 2,0 µg/g seja o limite máximo recomendado pelo "United States Food and Drug Administration" para milho e derivados de milho destinados ao consumo humano (AVANTAGGIATO *et al.*, 2002), elevada percentagem de amostras brasileiras analisadas por diferentes autores no decorrer de uma década apresentaram teores superiores ao valor (SYDENHAM *et al.* 1992a; HIROOKA *et al.*, 1996; ONO *et al.*, 1999; MACHINSKI & SOARES, 2000). Camargos *et al.* (2000) analisaram 23 amostras do Estado de São Paulo da safra de 97/98 e observaram contaminação de fumonisinas de 5,61 µg/g FB<sub>1</sub> e de 1,86 µg/g FB<sub>2</sub>. Em Santa Catarina, a safra 2000 apresentou níveis de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> de 3,2 µg/g e 3,4 µg/g, respectivamente (WESTHUIZEN *et al.*, 2003).

No entanto, a variabilidade de nível de contaminação de fumonisinas varia de acordo com a safra, uma vez que as diferenças nas precipitações pluviométricas entre elas são grandes.

### 5.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Para a confecção dos modelos matemáticos e análise dos efeitos de cada variável sobre as respostas obtidas procedeu-se a um planejamento fatorial completo com duas variáveis em três níveis (umidade e temperatura) e uma variável em dois níveis (inoculo de *F. verticillioides*), por 20 dias de incubação. Conseqüentemente, o planejamento foi composto por 22 experimentos aleatorizados, sendo três repetições no ponto central, para testar a hipótese de que a variabilidade no ponto central não difere da variabilidade na região experimental. Os dados obtidos de cada resposta do planejamento experimental ( $t_{20}$ ) estão

expressos na tabela 6, sendo que estes foram subtraídos dos valores da condição inicial dos grãos de milho ( $t_0$ , tabela 5). O mesmo procedimento também foi utilizado para avaliar a perda de qualidade (proteína, extrato etéreo, porcentagem de germinação e vigor).

Os valores referentes à contagem de bolores e leveduras foram convertidos em escala logarítmica, enquanto que para outras respostas (perfil físico-químico e fisiológico de milho e fumonisina produzida) empregaram-se os dados sem transformação, para prosseguir com a análise estatística.

Conforme tabela 5, o substrato milho original continha elevada carga de *Fusarium* spp. e, com destaque especial também para *Penicillium* spp., indicando que se tratava de matéria exposta à condição climática com chuva e temperatura relativamente baixa nas proximidades da colheita (safra 2005, regiões de Londrina e Santa Helena). O tratamento térmico resultou na eliminação aparente desta microbiota, uma vez que no decorrer de 20 dias de ensaio (tabela 6), o perfil microbiológico (cultivo no meio BDA) de substrato milho tratado termicamente manteve a contagem fúngica praticamente não detectável quanto a *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. e leveduras, não ocorrendo o mesmo com a contagem de *Penicillium* spp. Isto pode ser justificado pela recuperação de propágulos injuriados, anteriormente incapazes de se desenvolverem no meio BDA ( $t_0$ ). Soma-se ainda, a distribuição/penetração não uniforme de calor na massa de substrato, i.e. em toda a porção de 500g dos grãos submetido ao tratamento térmico. No entanto, o crescimento de outros gêneros fúngicos simularia a condição real, onde a competição microbiana torna-se um fato inevitável na natureza, conforme mostrado na tabela 16.

**Tabela 6** – Resultados do planejamento experimental para milho submetido ao tratamento térmico (*Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., leveduras, bolores/leveduras totais, umidade, proteína, extrato etéreo, atividade de água e fumonisinas FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>); e para milho não tratado termicamente (germinação e vigor).

U	I	T	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	Leveduras	Bolores/ leveduras Totais	U (%)	Proteína (%)	Extrato etéreo (%)	A <sub>w</sub>	FB <sub>1</sub> (µg/g)	FB <sub>2</sub> (µg/g)	Germinaç. (%)	Vigor (%)
-1	+1	-1	ND	ND	ND	ND	ND	13,6	11,0	11,6	0,805	1,76	0,97	68,0	52,5
0	+1	-1	4,4x10 <sup>5</sup>	ND	2,8X10 <sup>5</sup>	ND	6,9X10 <sup>5</sup>	19,4	12,6	12,6	0,909	28,46	6,66	45,2	43,0
+1	+1	-1	6,6x10 <sup>7</sup>	ND	3,4X10 <sup>7</sup>	ND	1,0 X10 <sup>7</sup>	29,6	12,7	6,0	0,955	20,17	9,05	55,2	50,5
-1	-1	-1	ND	ND	ND	ND	ND	13,2	11,0	9,5	0,794	1,29	0,25	65,5	51,5
0	-1	-1	ND	ND	1,1X10 <sup>7</sup>	ND	1,1 X10 <sup>7</sup>	20,4	13,2	14,3	0,91	4,77	2,85	44,0	37,3
+1	-1	-1	ND	ND	1,1X10 <sup>8</sup>	ND	1,3 X10 <sup>7</sup>	28,4	13,1	10,7	0,952	15,65	5,33	69,5	56,5
-1	+1	0	1,9X10 <sup>3</sup>	ND	7,9X10 <sup>2</sup>	ND	1,6 X10 <sup>3</sup>	13,5	11,3	11,3	0,785	5,87	0,76	93,0	80,0
0	+1	0	8,9X10 <sup>6</sup>	ND	3,9X10 <sup>6</sup>	ND	1,5 X10 <sup>7</sup>	20,2	13,0	12,5	0,911	2,31	0,89	52,0	47,5
0	+1	0	4,8X10 <sup>7</sup>	ND	1X10 <sup>7</sup>	ND	5,3 X10 <sup>7</sup>	21,0	12,8	12,4	0,92	10,25	2,76	39,3	48,0
0	+1	0	3,8X10 <sup>7</sup>	ND	ND	ND	3,8 X10 <sup>7</sup>	21,4	13,6	14,1	0,927	5,25	2,13	37,0	46,2
+1	+1	0	3,6X10 <sup>8</sup>	ND	2,8X10 <sup>8</sup>	1,9X10 <sup>7</sup>	6,6 X10 <sup>8</sup>	33,2	13,0	7,1	0,96	8,78	2,28	39,0	38,5
-1	-1	0	ND	ND	4,8X10 <sup>2</sup>	ND	4,8 X10 <sup>2</sup>	13,4	11,5	11,7	0,772	5,33	2,1	93,0	84,5
0	-1	0	ND	ND	1,8X10 <sup>8</sup>	ND	1,8 X10 <sup>8</sup>	22,5	13,8	13,2	0,902	1,19	1,11	49,0	48,0
0	-1	0	ND	ND	1,0X10 <sup>8</sup>	ND	1,0 X10 <sup>8</sup>	21,0	13,0	13,8	0,902	2,58	0,98	39,0	47,0
0	-1	0	1,9X10 <sup>1</sup>	2,4X10 <sup>6</sup>	4,6X10 <sup>7</sup>	ND	4,7 X10 <sup>7</sup>	21,6	13,4	15,0	0,902	9,33	2,03	38,0	47,5
+1	-1	0	ND	ND	3,6X10 <sup>8</sup>	ND	3,6 X10 <sup>8</sup>	34,0	13,2	6,8	0,949	8,44	2,46	46,5	46,5
-1	+1	+1	ND	ND	ND	ND	ND	12,7	11,3	10,4	0,752	3,34	1,46	93,5	86,5
0	+1	+1	1,4X10 <sup>7</sup>	6,9X10 <sup>3</sup>	1,8X10 <sup>6</sup>	ND	2,0 X10 <sup>7</sup>	19,0	13,2	13,4	0,913	2,95	1,21	49,5	47,5
+1	+1	+1	1,9X10 <sup>7</sup>	ND	2,0X10 <sup>8</sup>	ND	3,5 X10 <sup>8</sup>	33,4	13,4	8,4	0,977	4,82	1,38	41,5	35,5
-1	-1	+1	ND	ND	ND	ND	ND	12,0	11,0	11,1	0,74	1,91	0,28	93,0	84,5
0	-1	+1	ND	ND	1,5X10 <sup>7</sup>	ND	1,5 X10 <sup>7</sup>	19,6	13,6	14,9	0,904	2,8	2,05	39,5	34,0
+1	-1	+1	ND	1,3X10 <sup>7</sup>	1,4X10 <sup>8</sup>	ND	1,4 X10 <sup>8</sup>	28,8	12,3	7,6	0,961	8,21	2,67	34,5	30,0

\* I (inóculo de *F. verticillioides*): (-1) = sem inoculação de esporos de *F. verticillioides*; (+1) com inoculação de esporos de *F. verticillioides*;

U (Umidade): (-1) 15%; (0) 20%; (+1) 25%

T (Temperatura): (-1) 20 °C; (0) 25 °C; (+1) 30 °C

\*\* ND = não detectável (< 100 UFC/g)

### 5.3.1 Planejamento Experimental para Milho Tratado Termicamente

A distribuição normal dos dados e a homogeneidade das variâncias foram analisadas aplicando os testes de Shapiro-Wilk's W. e Levene, respectivamente (tabela 7). Em relação à análise de normalidade, os valores de "p" demonstraram que somente as respostas da determinação de extrato etéreo seguiram uma distribuição normal, i.e. não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre estes dados e os de Shapiro Wilk's W. Não obstante, a análise dos mesmos dados pelo teste de Levene demonstrou que as variâncias de todas as respostas obtidas apresentam homogeneidade. Portanto, a análise de variância pode ser aplicada para avaliação individual de cada parâmetro, apesar de não apresentarem distribuição normal. Para as respostas "leveduras" e "umidade" não foi possível proceder à análise da homogeneidade das variâncias, uma vez que as médias quadráticas foram nulas.

**Tabela 7** – Valores de "p" pelo teste de Shapiro Wilk's e Levene para avaliar aplicabilidade\* da análise variância (ANOVA).

Parâmetro	Shapiro Wilk's W.	Levene
Valor de "p"		
<i>Fusarium</i> spp.	0,0004	0,4186 ***
<i>Aspergillus</i> spp.	0,0000	0,3424 ***
<i>Penicillium</i> spp.	0,0002	0,3651 ***
Leveduras	0,0000	-
Total Bolores/leveduras	0,0001	0,8136 ***
Umidade	0,0350	-
Proteína	0,0120	0,8015 ***
Extrato etéreo	0,4094 **	0,5758 ***
Atividade de água	0,0025	0,8462 ***
Fumonisinias FB <sub>1</sub>	0,0000	0,5471 ***
FB <sub>2</sub>	0,0000	0,6937 ***

\*22 tratamentos executados para efeito combinado de temperatura e umidade na contagem fúngica, produção de fumonisinina e perda de qualidade em milho.

\*\*Dados seguem uma distribuição normal.

\*\*\*Dados apresentam homogeneidade de variâncias.

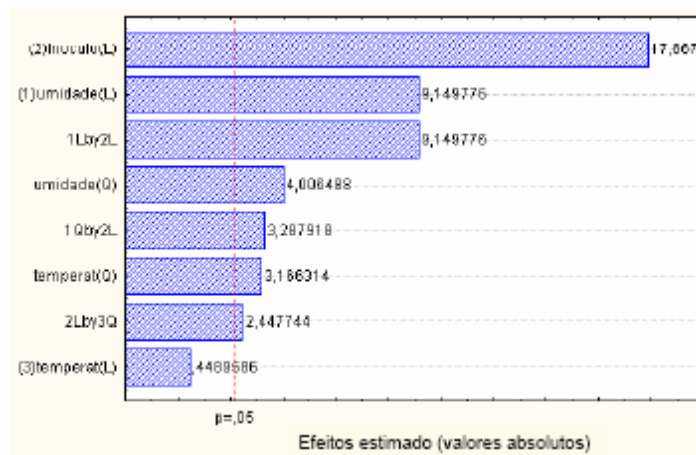
### 5.3.1.1 Análise de planejamento fatorial para respostas microbiológicas

#### 5.3.1.1.1 Efeito de umidade e temperatura na contagem de *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp. (milho com ou sem inóculo de *F. verticillioides*)

**Tabela 8** – Efeitos e análise de variância para a contagem de *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp. no milho submetido ao tratamento térmico ( $t_{20}$ -  $t_0$ ).

Tratamentos	Parâmetros			
	<i>Fusarium</i> spp.		<i>Aspergillus</i> spp.	
	Efeito	p	Efeito	p
(1)Umidade (L)*	3,3966	<b>0,0000</b>	1,1883	0,4573
(1)Umidade (Q)**	1,9500	<b>0,0051</b>	0,4008	0,7502
(2)Inóculo (L)*	5,1228	<b>0,0000</b>	-0,8750	0,4778
(3)Temperat. (L)*	0,1666	0,6817	1,8283	0,2639
(3)Temperat. (Q)**	0,9550	<b>0,0158</b>	-0,5591	0,6579
1L* x 2L*	3,3966	<b>0,0000</b>	-1,1883	0,4573
1Q** x 2L*	0,9392	<b>0,0143</b>	0,4698	0,6987
1L* x 3L*	-0,1300	0,7933	1,7825	0,3668
1L* x 3Q**	-0,5750	0,2038	-0,8912	0,5959
1Q** x 3L*	0,4450	0,3154	0,0687	0,9670
1Q** x 3Q**	-0,1800	0,5675	0,4981	0,6821
2L* x 3L*	0,1666	0,6817	-0,5483	0,7279
2L* x 3Q**	0,6992	<b>0,0489</b>	-0,4901	0,6865

\*L = termo linear; \*\*Q = termo quadrático  
(1) = umidade; (2) = inóculo; (3) = temperatura



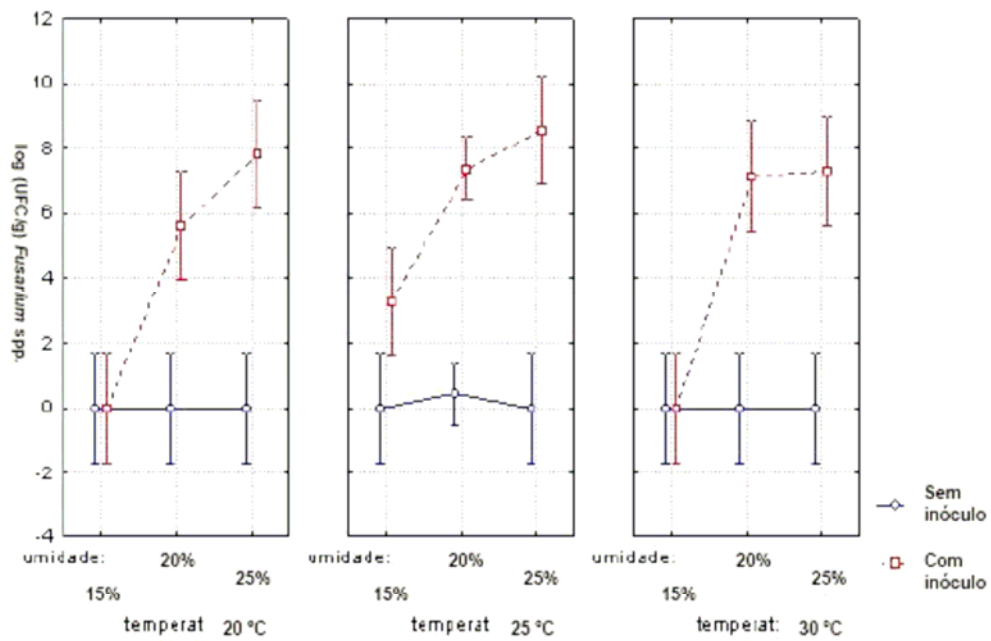
L = termo linear; Q = termo quadrático

(1)= umidade, (2) = inóculo, (3) = temperatura

**Figura 6** – Efeito das variáveis independentes pelo método de “Pareto Chart” no crescimento de *Fusarium* spp.

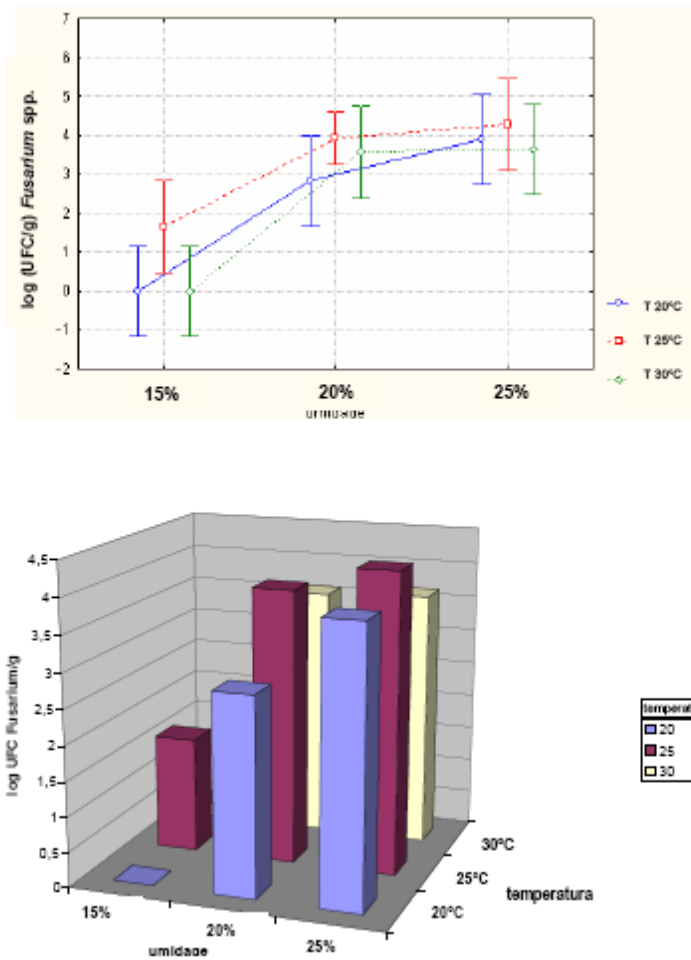
A influência combinada da umidade, temperatura e inóculo no crescimento de *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp. pode ser observada analisando o efeito de cada variável independente nas respostas, bem como interações entre si. Na tabela 8 observa-se que não houve nenhum efeito significativo ( $p < 0,05$ ) das variáveis em estudo (umidade, temperatura e inóculo de *F. verticillioides*) e interações na resposta referente à contagem de *Aspergillus* spp.

Por outro lado, em relação ao crescimento de *Fusarium* spp., a tabela 8 e a figura 6 demonstram um efeito positivo significativo das variáveis umidade (termo linear e quadrático), inóculo e temperatura (termo quadrático). As interações entre o inóculo e a umidade (linear e quadrática) e o inóculo e a temperatura (quadrática) também demonstraram ser estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). A figura 7 expressa o comportamento do crescimento deste gênero fúngico em relação às três variáveis estudadas.



**Figura 7** – Multiplicação de *Fusarium* spp. em relação às três variáveis estudadas

Uma vez que a variável inóculo exerceu o maior efeito significativo na contagem de *Fusarium* spp., (figura 6, método de pareto), prosseguiu-se à análise do seu comportamento em relação à umidade e temperatura, mantendo o inóculo no nível +1 (presença), conforme mostra a figura 8. A curva tendeu a uma maior contagem de *Fusarium* spp. quando os grãos foram mantidos à 25°C sob umidade de 25%, corroborando com os dados obtidos por Alberts *et al.* (1990) e Velluti *et al.* (2000), onde *F. verticillioides* teve maior crescimento à 25°C quando comparado à 20°C e 15°C, ocorrendo uma diminuição no crescimento a 30°C.



**Figura 8** – Crescimento de *Fusarium* spp. em relação à umidade e temperatura

**5.3.1.1.2 Efeito de umidade e temperatura na contagem de *Penicillium* spp., leveduras e total de bolores/leveduras (milho com ou sem inóculo de *F. verticillioides*)**

**Tabela 9** – Efeitos e análise de variância para a contagem de *Penicillium* spp., leveduras e total de bolores/leveduras no milho submetido ao tratamento térmico ( $t_{20}$ -  $t_0$ ).

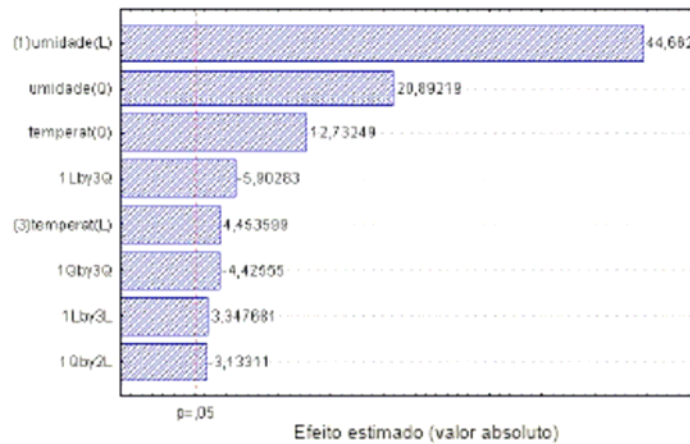
Tratamentos	Parâmetros					
	<i>Penicillium</i> sp.		Leveduras		Total de bolores e leveduras	
	Efeito	p	Efeito	p	Efeito	p
(1)Umidade (L)*	7,2483	<b>0,0002</b>	2,4233	0,0903	7,0533	<b>0,0000</b>
(1) Umidade (Q)**	1,8586	0,0821	-1,2116	0,2628	2,6372	<b>0,0000</b>
(2)Inóculo (L)*	-0,8012	0,4012	-0,2487	0,8044	-0,0705	0,5835
(3)Temperat. (L)*	0,3016	0,8031	-1,2066	0,3658	0,7033	<b>0,0022</b>
(3) Temperat. (Q)**	1,0186	0,3079	0,6133	0,5590	1,6072	<b>0,0000</b>
1L* x 2L*	-0,1116	0,9263	0,010	0,9938	0,0000	1,0000
1Q** x 2L*	-1,1393	0,2414	-0,3881	0,6990	-0,3707	<b>0,0167</b>
1L* x 3L*	0,2150	0,8844	-1,8100	0,2741	0,6475	<b>0,0107</b>
1L* x 3Q**	-1,1500	0,3813	0,9200	0,5102	-0,9887	<b>0,0003</b>
1Q** x 3L*	0,1300	0,9191	0,9050	0,5169	0,0837	0,6346
1Q** x 3Q**	-0,9395	0,3279	-0,4600	0,6479	-0,5385	<b>0,0023</b>
2L* x 3L*	0,2216	0,8545	1,2066	0,3658	0,3033	0,0943
2L* x 3Q**	-0,4793	0,6090	1,4368	0,1762	0,0992	0,4433

\*L = termo linear; \*\*Q = termo quadrático  
(1)= umidade, (2) = inóculo, (3) = temperatura

A tabela 9 apresenta a influência de umidade, temperatura e inóculo de *F. verticillioides* no crescimento de *Penicillium* spp., leveduras e contagem total de bolores/ leveduras, analisando o efeito de cada variável nas respostas, bem como de suas interações. A umidade linear foi a única variável que apresentou efeito positivo significativo no crescimento de *Penicillium* spp.; por outro lado, para o crescimento de leveduras, nenhuma delas teve efeito significativo, indicando maior termosensibilidade por parte das leveduras e que a contaminação destas não ocorre via aérea.

Em relação à contagem total de bolores/ levedura, foram observados efeitos significativos da variável umidade (linear e quadrática), temperatura (linear e quadrática) e algumas interações entre elas, o que também pode ser observado na

figura 9, a qual demonstra efeitos significativos de todas as variáveis na contagem total de bolores/leveduras ( $p < 0,05$ ).

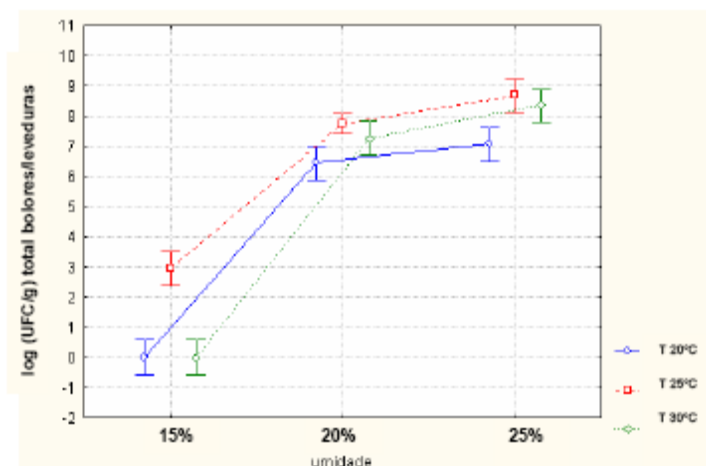


L = termo linear; Q = termo quadrático  
(1)= umidade, (2) = inóculo, (3) = temperatura

**Figura 9** – Efeito das variáveis independentes pelo método de “Pareto Chart” na contagem total de bolores/leveduras

Uma vez que o inóculo de *F. verticillioides* não exerceu efeito significativo sobre a contagem total de bolores/leveduras ( $p=0,5835$ ), analisou-se somente a influência da umidade e da temperatura, conforme figura 10, onde se observa maior contagem total de bolores/leveduras obtida no planejamento fatorial quando a umidade foi de 25% e temperatura de 25°C, comportamento este semelhante ao verificado no crescimento de *Fusarium* spp.; indicando este gênero fúngico como predominante na biota em estudo.

As figuras 8 e 10 mostram que a faixa de umidade crítica para crescimento de *Fusarium* spp. e contagem total de bolores/leveduras é entre 15 e 20%. No entanto, a 20% de umidade o crescimento de *Fusarium* spp. foi menor do que contagem total de bolores/leveduras, indicando a participação dinâmica de outros grupos microbianos que interferiram no crescimento de *Fusarium* spp. e a conseqüente consideração destes gêneros na contagem final.



**Figura 10** – Contagem total de bolores/leveduras em relação à umidade e temperatura

### 5.3.1.2 Modelagem matemática para os gêneros fúngicos

Os coeficientes dos modelos matemáticos e respectivas equações desenvolvidas para a contagem total de bolores/leveduras, *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp., baseados na obtenção do maior valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), menor erro médio quadrático (EMQ) e falta de ajuste não significativa ( $p > 0,05$ ), estão expressos na tabela 10. Para a predição do crescimento de *Aspergillus* spp. e leveduras não foram construídos modelos matemáticos, uma vez que nenhuma das variáveis estudadas teve efeito significativo sobre estas respostas (tabelas 8 e 9). Para *Penicillium* spp. confeccionou-se um modelo uma vez que, embora somente umidade (termo linear) exercesse efeito significativo, observou-se crescimento considerável deste gênero fúngico (tabela 6), resultante de freqüente ocorrência no meio.

As equações descritas na tabela 10 permitiriam uma análise preditiva, em relação à contagem total de bolores e leveduras, *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. no período de 20 dias ( $t_{20}$ ), para uma amostra de milho com temperatura na faixa de 20 a 30°C, umidade de 15 a 25% e contendo 104 UFC/g de *F. verticillioides*. As equações dos modelos matemáticos desenvolvidos podem ser melhor observadas na tabela 11.

Os modelos matemáticos ainda apresentam fator limitante quanto à contagem inicial de *F. verticillioides* e ao tempo de permanência do produto em condições determinadas de umidade e temperatura, por fixar o inóculo em 104 UFC/g e o tempo em 20 dias. Todavia, baseada na funcionalidade da equação, esta poderia ser melhorada introduzindo os fatores inóculo e tempo como variáveis independentes no planejamento experimental.

**Tabela 10** – Modelos matemáticos para crescimento total de bolores/leveduras, *Fusarium* spp. E *Penicillium* spp.

<b>Bolores Totais/ Leveduras</b>		
Constante	7,7416 ± 0,1438	***
Termos lineares (X)		
X <sub>1</sub>	2,8675 ± 0,1761	***
X <sub>3</sub>	0,3516 ± 0,1017	***
Termos quadráticos (X <sup>2</sup> )		
X <sub>1</sub>	-1,9191 ± 0,2274	***
X <sub>3</sub>	-0,8891 ± 0,2274	***
Produto de termos (X . X)		
X <sub>1</sub> <sup>2</sup> . X <sub>2</sub>	0,0883 ± 0,1017	**
X <sub>1</sub> . X <sub>3</sub>	0,3237 ± 0,1245	**
X <sub>1</sub> . X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0,9887 ± 0,2157	***
X <sub>1</sub> <sup>2</sup> . X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	-1,0770 ± 0,3134	***
<b><i>Fusarium</i> spp.</b>		
Constante	3,9957 ± 0,2332	***
Termos lineares (X)		
X <sub>1</sub>	1,6983 ± 0,1856	***
X <sub>2</sub>	3,6563 ± 0,2332	***
X <sub>3</sub>	0,0833 ± 0,1856	---
Termos quadráticos (X <sup>2</sup> )		
X <sub>1</sub>	-1,1444 ± 0,2856	**
X <sub>3</sub>	-0,9044 ± 0,2856	**
Produto de termos (X . X)		
X <sub>1</sub> . X <sub>2</sub>	1,6983 ± 0,1856	***
X <sub>1</sub> <sup>2</sup> . X <sub>2</sub>	-0,9392 ± 0,2856	**
X <sub>2</sub> . X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	-0,6992 ± 0,2856	*
<b><i>Penicillium</i> spp.</b>		
Constante	6,3520 ± 0,5490	***
Termos lineares (X)		
X <sub>1</sub>	3,6241 ± 0,5012	***
X <sub>2</sub>	-0,5968 ± 0,3702	---
Termos quadráticos (X <sup>2</sup> )		
X <sub>1</sub>	-1,7961 ± 0,7434	*

\*p < 0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*p<0,001; --- não significativo

X1 = umidade; X2 = inóculo (baseado na contagem inicial de *Fusarium* spp. no milho a ser estudado); X3 = temperatura

**Tabela 11** – Equações dos modelos matemáticos para crescimento total de bolores/leveduras, *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp.

Total de bolores/leveduras
$Y = 7,74 + 2,86 X_1 + 0,35 X_3 - 1,91 X_1^2 - 0,88 X_3^2 + 0,08 X_1^2 \cdot X_2 + 0,32 X_1 \cdot X_3 + 0,98 X_1 \cdot X_3^2 - 1,07 X_1^2 \cdot X_3^2$
<i>Fusarium</i> spp.
$Y = 3,99 + 1,69 X_1 + 3,65 X_2 + 0,08 X_3 - 1,14 X_1^2 - 0,9 X_3^2 + 1,69 X_1 \cdot X_2 - 0,93 X_1^2 \cdot X_2 - 0,69 X_2 \cdot X_3^2$
<i>Penicillium</i> spp.
$Y = 6,35 + 3,62 X_1 - 0,59 X_2 - 1,79 X_1^2$

X1 = umidade, X2 = inóculo, X3 = temperatura

### 5.3.1.2.1 Validação matemática/ estatística dos modelos matemáticos para crescimento fúngico

Os resultados das análises matemáticas/ estatísticas usadas para avaliar o desempenho dos modelos matemáticos para a microbiota dos grãos de milho são demonstrados na tabela 12. É possível observar que nos três modelos, a variabilidade dos dados em torno do ponto central não diferiu da variabilidade na região experimental, i.e., falta de ajuste não significativa ( $p > 0,05$ ). Todos os modelos apresentaram bom coeficiente de determinação ( $R^2 > 73\%$ ), sendo que o melhor modelo foi o que prediz a contagem total por bolores/leveduras, tendo capacidade de explicar 98,7% dos dados, apresentando também uma menor média residual; seguido do modelo adotado para a predição do crescimento de *Fusarium* spp.

Os valores dos fatores de viés dos três modelos matemáticos foram próximos a 1, corroborando a boa capacidade de predição da contagem fúngica real. Os modelos para crescimento de *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp., por apresentarem valores superiores a 1 (1,19 e 1,23, respectivamente), possuem a característica de sub-estimação, ou seja, o valor da contagem destes fungos predita pelos modelos é inferior à observada experimentalmente. Pela maior proximidade a 1 do fator de exatidão (1,03), o modelo matemático para predição da contagem total de

bolores/leveduras é o mais exato. Além disso, pelo fato deste ter a característica de super-estimação (valor < 1), é mais seguro do que os demais.

Os fatores de exatidão indicaram que as predições diferiram em 24%, 26% e 3% dos observados para *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e total de bolores/leveduras, respectivamente.

Estes fatores de viés e exatidão são comparáveis àqueles determinados por outros autores; Valík & Pieckova (2001) modelaram o efeito da atividade de água na taxa de crescimento de três isolados fúngicos resistentes ao calor a 25 °C e encontraram fatores de viés na faixa de 1,007 a 1,014 e fatores de exatidão de 1,070 a 1,106. Samapundo *et al.* (2005), analisando a influência da atividade de água e temperatura na taxa de crescimento de *F. verticillioides*, obtiveram no modelo proposto, fator de viés e de exatidão de 0,978 e 1,098, respectivamente.

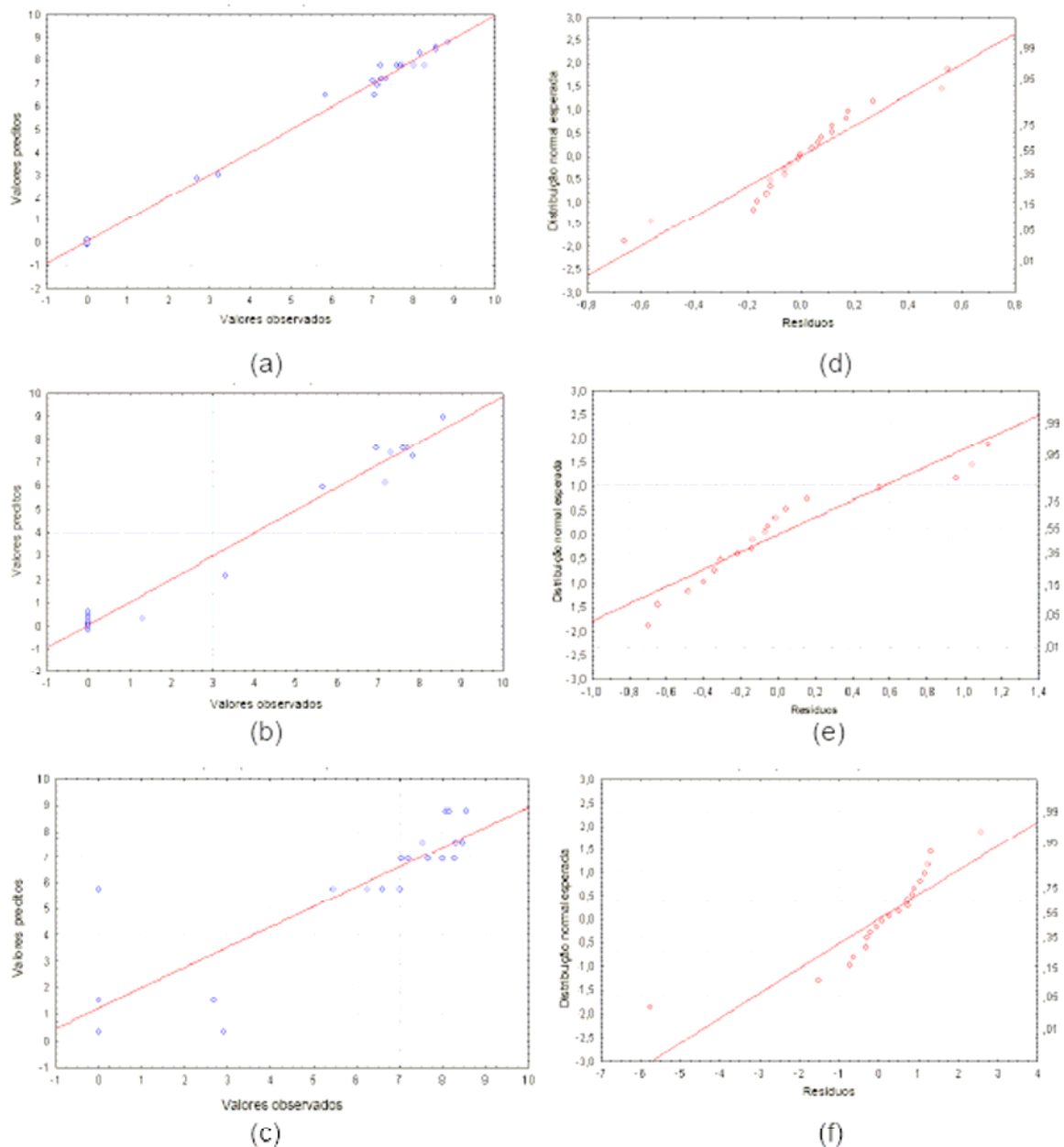
**Tabela 12** – Avaliação da performance dos modelos matemáticos por meio de índices de validação.

Resposta (Y)	EMQ*	FA** ("p")	R <sup>2</sup> (%)	Fator de viés	Fator de exatidão
Bolores/leveduras totais	0,121	0,337	98,7	0,99	1,03
<i>Fusarium</i> spp.	0,4134	0,460	96,7	1,19	1,24
<i>Penicillium</i> spp.	3,0150	0,9869	73,3	1,23	1,26

\*EMQ = erro médio quadrático; \*\*FA = falta de ajuste

### 5.3.1.2.2 Validação gráfica dos modelos matemáticos para crescimento fúngico

A figura 11 mostra a plotagem de respostas observadas da contagem total de bolores/leveduras, *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. em função das preditas pelos modelos desenvolvidos (tabela 11). Paralelamente, na mesma figura são plotadas as distribuições normais de resíduos obtidos em relação às mesmas equações.



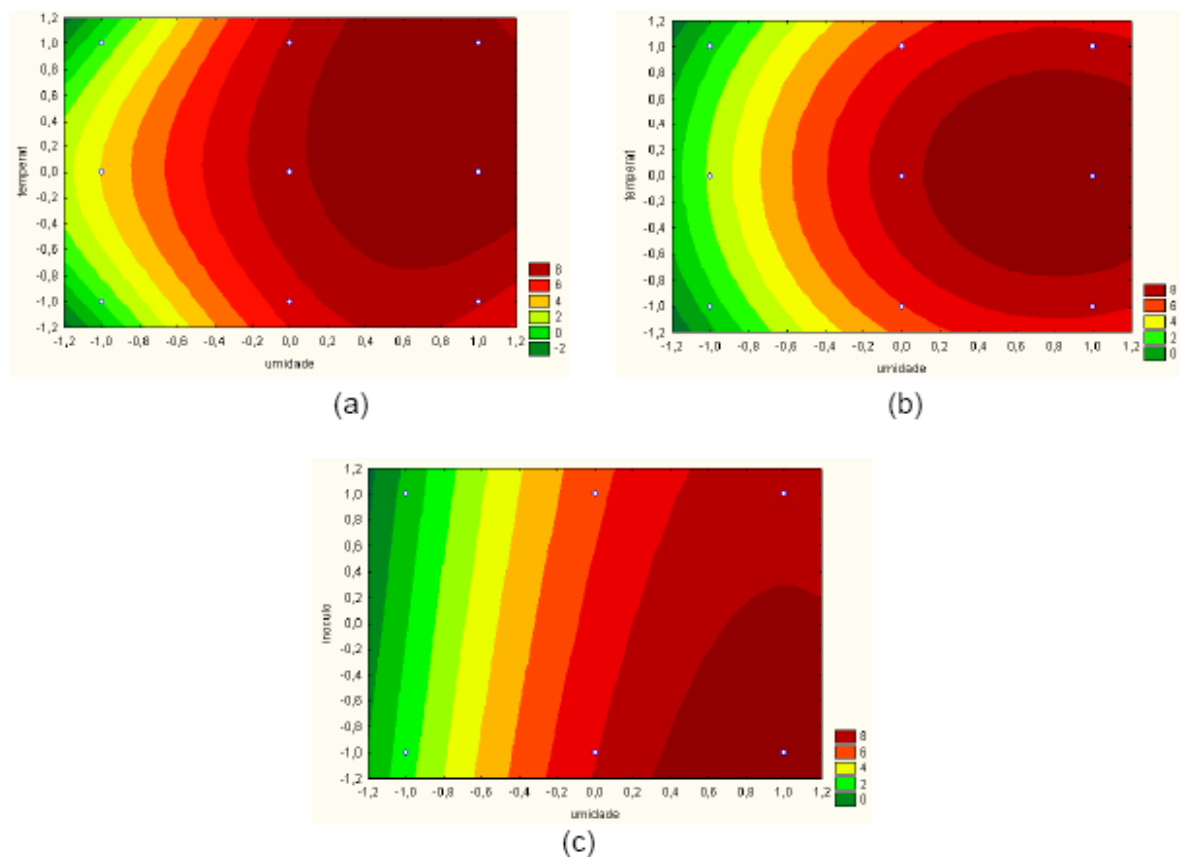
**Figura 11** – Respostas observadas da contagem de bolores totais/leveduras (a), *Fusarium* spp. (b) e *Penicillium* spp. (c) em função das preditas pelo modelo; plotagem dos resíduos do modelo de crescimento de bolores totais/leveduras (d), *Fusarium* spp. (e) e *Penicillium* spp. (f).

Pode ser notado nesta figura que a plotagem do crescimento observado de *Penicillium* spp. versus predito pelo modelo (figura 11c) é mais afastado da linha de equivalência do que a dos demais modelos fúngicos (figura 11a e 11b). O fato corroborou com o fator de exatidão mais distante do valor 1, i.e. 1,26 (tabela 12) calculado para este modelo matemático. Comportamento semelhante é observado para a distribuição normal dos resíduos, onde no modelo de crescimento total de bolores/leveduras há uma menor quantidade de resíduos deixado pelo

ajuste dos dados experimentais, visto pela proximidade destes à linha de equivalência (figura 11d).

A figura 12 expressa as representações visuais dos modelos como linhas de contorno, sendo que as variáveis independentes apresentam-se na forma codificada dos níveis do planejamento fatorial (+1, 0, -1), onde confirma que dentro da região experimental, o crescimento fúngico aumentou com o aumento da umidade. A inclinação das linhas de contorno (tendência na direção vertical) das figuras 12a e 12b, indicaram a maior influência da umidade, em relação à temperatura. Samapundo *et al.* (2005) e Sautour *et al.* (2002) estudando o efeito de variáveis (temperatura e atividade de água) no crescimento fúngico, também obtiveram comportamento semelhante.

A figura 12c mostra que a ausência de inóculo de *F. verticillioides* favoreceu o crescimento de *Penicillium spp.*, evidenciando a competição entre os dois gêneros.



**Figura 12** – Linhas de contorno para o efeito da umidade e temperatura no crescimento de bolores totais/leveduras (a) e *Fusarium spp.* (b). Linhas

de contorno para o efeito da umidade e inóculo no crescimento de *Penicillium* spp.(c).

### **5.3.1.3 Análise de planejamento fatorial para produção de fumonisinas**

Os coeficientes dos modelos matemáticos desenvolvidos para fumonisina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e fumonisina total, baseados na obtenção do maior valor do coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>), menor erro médio quadrático (EMQ) e falta de ajuste não significativa (p>0,05), estão expressos na tabela 13, sendo as equações destes modelos matemáticos desenvolvidos melhor observadas na tabela 14.

**Tabela 13** – Modelos matemáticos para a produção de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> e fumonisina total.

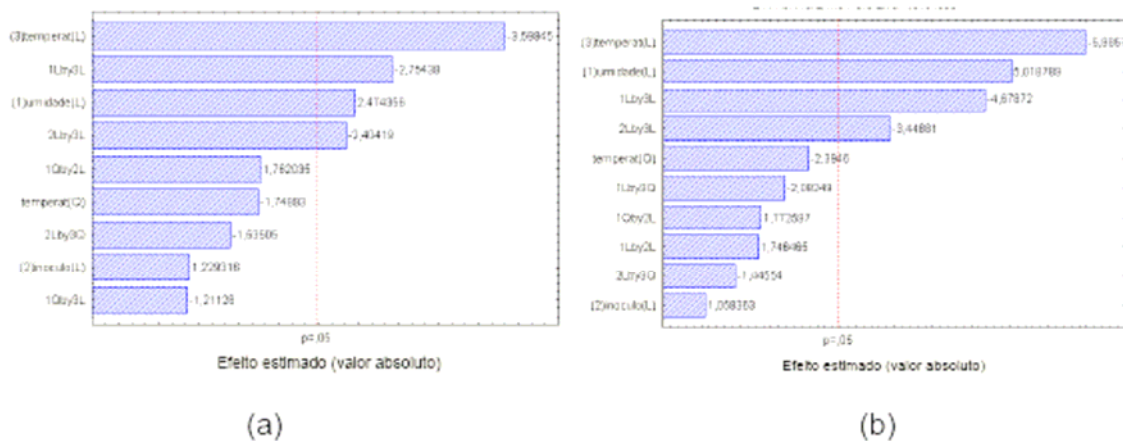
FB <sub>1</sub>		
Constante	3,233 ± 1,223	*
Termos lineares (X)		
X <sub>1</sub>	2,762 ± 1,116	*
X <sub>2</sub>	1,320 ± 1,402	---
X <sub>3</sub>	-5,930 ± 1,933	**
Termos quadráticos (X <sup>2</sup> )		
X <sub>3</sub>	2,896 ± 1,655	---
Produto de termos (X . X)		
X <sub>1</sub> <sup>2</sup> . X <sub>2</sub>	-3,027 ± 1,718	---
X <sub>1</sub> . X <sub>3</sub>	-3,766 ± 1,367	*
X <sub>1</sub> <sup>2</sup> . X <sub>3</sub>	2,868 ± 2,638	---
X <sub>2</sub> . X <sub>3</sub>	-2,684 ± 1,116	*
X <sub>2</sub> . X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	2,637 ± 1,718	---
FB <sub>2</sub>		
Constante	1,240 ± 0,257	***
Termos lineares (X)		
X <sub>1</sub>	0,470 ± 0,406	---
X <sub>2</sub>	0,261 ± 0,294	---
X <sub>3</sub>	-1,356 ± 0,234	***
Termos quadráticos (X <sup>2</sup> )		
X <sub>3</sub>	0,805 ± 0,348	*
Produto de termos (X . X)		
X <sub>1</sub> . X <sub>2</sub>	0,395 ± 0,234	---
X <sub>1</sub> <sup>2</sup> . X <sub>2</sub>	-0,618 ± 0,361	---
X <sub>1</sub> . X <sub>3</sub>	-1,298 ± 0,287	***
X <sub>1</sub> . X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1,001 ± 0,497	---
X <sub>2</sub> . X <sub>3</sub>	-0,781 ± 0,234	**
X <sub>2</sub> . X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0,504 ± 0,361	---
FB <sub>total</sub>		
Constante	4,473 ± 1,435	**
Termos lineares (X)		
X <sub>1</sub>	3,900 ± 1,310	*
X <sub>2</sub>	1,581 ± 1,647	---
X <sub>3</sub>	-5,374 ± 1,310	**
Termos quadráticos (X <sup>2</sup> )		
X <sub>3</sub>	3,701 ± 1,944	---
Produto de termos (X . X)		
X <sub>1</sub> <sup>2</sup> . X <sub>2</sub>	-3,645 ± 2,017	---
X <sub>1</sub> . X <sub>3</sub>	-5,065 ± 1,605	**
X <sub>2</sub> . X <sub>3</sub>	-3,465 ± 1,310	*
X <sub>2</sub> . X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	3,141 ± 2,017	---

\*p < 0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*p<0,001; --- não significativo  
X1 = umidade, X2 = inóculo, X3 = temperatura

**Tabela 14** – Equações dos modelos matemáticos para produção de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> e fumonisina total.

FB <sub>1</sub>
$Y = 3,23 + 2,76 X_1 + 1,32 X_2 - 5,93 X_3 + 2,89 X_3^2 - 3,02 X_1^2 \cdot X_2 - 3,76 X_1 \cdot X_3 + 2,86 X_1^2 \cdot X_3 - 2,68 X_2 \cdot X_3 + 2,63 X_2 \cdot X_3^2$
FB <sub>2</sub>
$Y = 1,24 + 0,47 X_1 + 0,26 X_2 - 1,35 X_3 + 0,80 X_3^2 + 0,39 X_1 \cdot X_2 - 0,61 X_1^2 \cdot X_2 - 1,29 X_1 \cdot X_3 + 1,00 X_1 \cdot X_3^2 - 0,78 X_2 \cdot X_3 + 0,50 X_2 \cdot X_3^2$
FB <sub>total</sub>
$Y = 4,47 + 3,9 X_1 + 1,58 X_2 - 5,37 X_3 + 3,70 X_3^2 - 3,64 X_1^2 \cdot X_2 - 5,06 X_1 \cdot X_3 - 3,46 X_2 \cdot X_3 + 3,14 X_2 \cdot X_3^2$

X1 = umidade, X2 = inóculo, X3 = temperatura



L = termo linear; Q = termo quadrático  
(1)= umidade, (2) = inóculo, (3) = temperatura

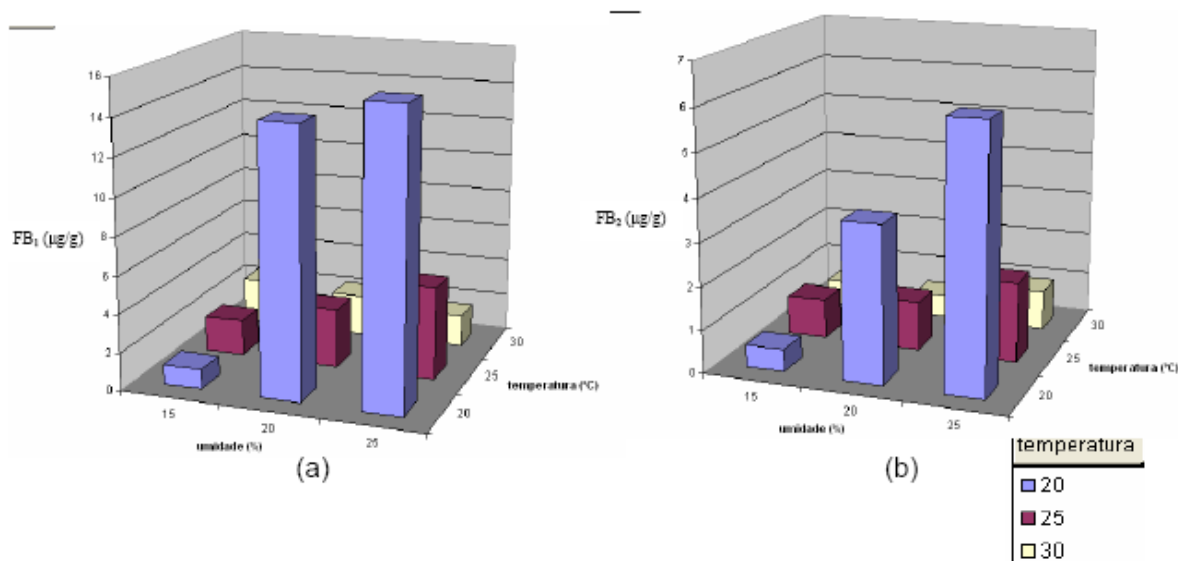
**Figura 13** – Efeito das variáveis independentes pelo método de “Pareto Chart” na produção de FB<sub>1</sub> (a) e FB<sub>2</sub> (b).

A temperatura exerceu efeito mais significativo na produção de fumonisinas quando comparado com a umidade, conforme observado através das significâncias dos coeficientes dos modelos desenvolvidos (tabela 13 e figura 13), diferindo do efeito destes mesmos parâmetros exercidos no crescimento de *Fusarium* spp, onde maior interferência ocorreu pela variável umidade (tabela 8 e figura 6).

Estes resultados indicaram a necessidade de cuidado na interpretação de dados resultantes de crescimento celular (metabolismo primário) e

produção de micotoxinas (metabolismo secundário), devido ao comportamento bastante diferenciado destes dois processos. Assim sendo, conforme mostram os dados encontrados no presente estudo (figuras 6 e 9), a variável umidade influenciou diretamente o crescimento fúngico, considerando que a água livre (atividade de água) presente no substrato, atuaria diretamente na hidrólise de macromoléculas essenciais como nutrientes (proteína, carboidrato e lipídio). Assim, quanto maior umidade, maior a cinética de hidrólise e, conseqüentemente, maior a liberação dos resíduos de aminoácidos, monossacarídeos e ácidos graxos para serem incorporados na estrutura celular. Em contraste, o metabolismo secundário inicia-se na fase estacionária do crescimento microbiano, i.e., a contagem microbiana tende a manter-se constante, portanto fatores integrantes diretos como substrato na reação bioquímica (ex: água) não teriam efeito substancial na biossíntese da toxina. Por outro lado, fatores físicos, como condições climáticas, transporte e processos empregados na secagem poderiam causar uma mudança drástica na condição do grão exposto no campo (choque térmico, corte no fornecimento de nutrientes pela colheita), interrompendo mecanismos naturais de defesa e processos fisiológicos da planta e desencadeando a indução de enzimas envolvidas no metabolismo secundário.

Ao analisar a figura 14, observa-se que a maior produção de fumonisinas, seja B<sub>1</sub> ou B<sub>2</sub>, ocorreu em grãos estocados a 20°C sob umidade de 25%, seguida da umidade de 20%. As baixas concentrações de toxinas produzidas a 30°C provavelmente estiveram relacionadas ao menor crescimento *F. verticillioides*.



**Figura 14** – Produção de fumonisina B<sub>1</sub> (a) e B<sub>2</sub> (b) em função da umidade e temperatura.

O resultado é similar ao encontrado por Scott (1993), cuja temperatura onde ocorreu maior produção de fumonisinas foi a 20°C. Esta temperatura também foi a ideal para produção destas toxinas quando Hinojo *et al.* (2006) utilizaram a cultura do arroz como substrato. Dilkin *et al.* (2002) obtiveram aumento proporcional entre rendimento de toxina com a umidade de 20% e sob 25°C de temperatura; sendo nesta última, relatadas as maiores concentrações de fumonisinas. No entanto, a contradição com nosso trabalho provavelmente decorreu devido à diferença na linhagem de *F. verticillioides* utilizada, uma vez que estes autores empregaram as cepas 113F, LAMIC 2999/96 e NRRL 13616, enquanto que se empregou a cepa 103F com temperatura ótima de 20°C para a produção de fumonisina em nossa modelagem. Salienta-se que a cepa pertence à cultura mantida em nosso laboratório desde 1991, portanto com a característica genética estabilizada.

A maior produção de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> a 20°C coincidiu com o menor crescimento observado seja de *F. verticillioides* ou bolores totais/leveduras (figuras 8 e 10), indicando condição não-ideal para a multiplicação celular, favorecendo a expressão de genes envolvidos no metabolismo secundário. O fato corrobora com pesquisas que demonstraram haver um aumento nos níveis de fumonisinas em regiões temperadas (HIROOKA *et al.*, 1996; SCUDAMORE & PATEL, 2000).

Considerando esta tendência de crescimento versus produção, um melhor rendimento para produção de fumonisina poderia ser atingido, se a temperatura inicial de incubação fosse de 25°C, condição ótima para propiciar maior multiplicação celular, seguido de diminuição na temperatura, para induzir a expressão de genes envolvidos na biossíntese desta micotoxina.

### 5.3.1.3.1 Validação matemática/estatística dos modelos matemáticos para produção de fumonisinas

Os resultados das análises matemáticas/estatísticas usadas para avaliar a performance de modelos matemáticos para a produção de fumonisina  $B_1$ ,  $B_2$  e total ( $FB_1 + FB_2$ ) nos grãos de milho são demonstrados na tabela 15. A variabilidade dos dados em torno do ponto central não diferiu da variabilidade na região experimental nos três modelos, uma vez que a falta de ajuste não foi significativa ( $p > 0,05$ ).

O modelo desenvolvido para a produção de  $FB_2$  apresentou maior capacidade para predição (mais exato), explicando 82% dos dados experimentais ( $R_2 = 0,82$ ), aliado a menor média residual (0,661) e um fator de viés de 0,94, indicando ser um modelo que super-estima os dados preditos. No entanto, este modelo apresentou alta porcentagem de predições que diferiram dos dados observados (fator de exatidão = 2,02). Os modelos para a produção de  $FB_1$  e  $FB_{total}$ , apesar de também não apresentarem falta de ajuste significativo ( $p > 0,05$ ), explicou apenas 61,8 e 67,9% dos dados, sendo que as predições diferiram em 74 e 99% dos dados observados, respectivamente.

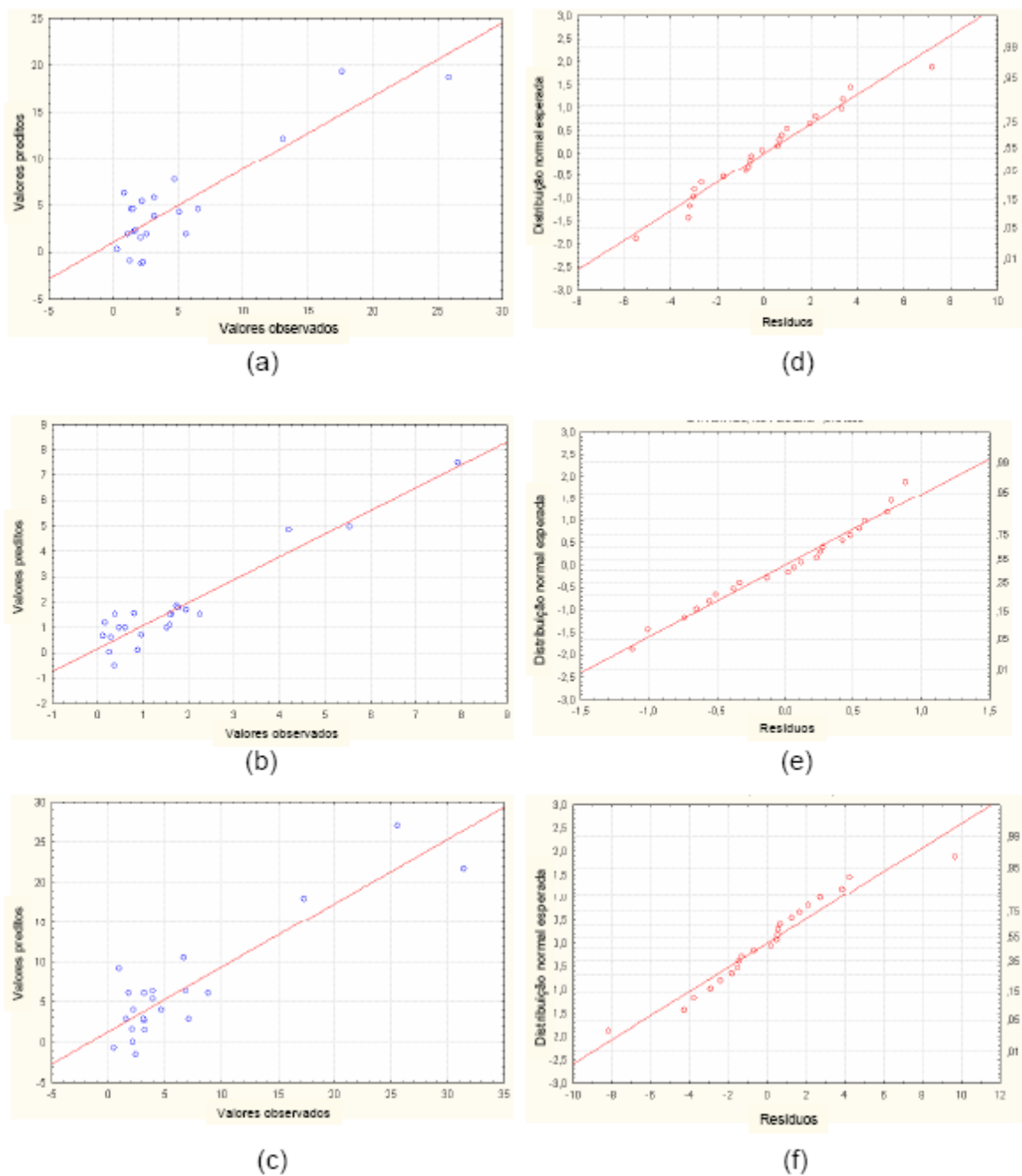
**Tabela 15** – Índices de validação para a performance dos modelos matemáticos.

Y	EMQ*	FA** ("p")	R <sup>2</sup> (%)	Fator de viés	Fator de exatidão
FB <sub>1</sub>	14,957	0,1729	61,8	0,75	1,74
FB <sub>2</sub>	0,661	0,4866	82,0	0,94	2,02
FB <sub>total</sub>	20,618	0,2238	67,9	1,02	1,99

\*EMQ = erro médio quadrático; \*\*FA = falta de ajuste

### 5.3.1.3.2 Validação gráfica dos modelos matemáticos para produção de fumonisinas

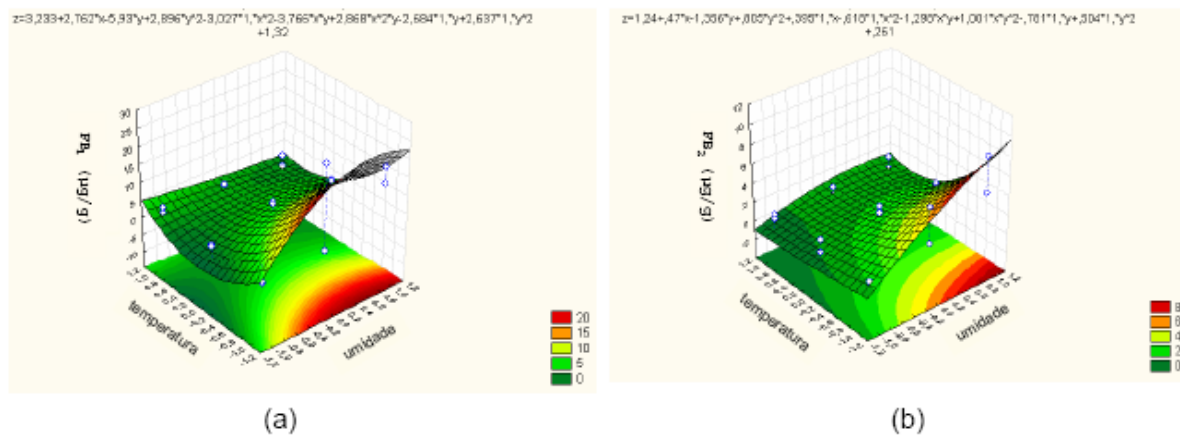
As plotagens das respostas observadas na produção de  $FB_1$ ,  $FB_2$  e  $FB_{total}$ , em função das previstas pelos modelos (tabela 14) e os gráficos da distribuição normal dos resíduos, são mostrados na figura 15.



**Figura 15** – Respostas observadas de produção de  $FB_1$  (a),  $FB_2$  (b) e  $FB_{total}$  (c) em função das previstas pelo modelo; distribuição normal dos resíduos do modelo de produção de  $FB_1$  (d),  $FB_2$  (e) e  $FB_{total}$  (f).

Conforme a figura 15, os dados apresentaram um ajuste adequado em relação à distribuição normal dos resíduos nos três modelos preditivos, estando estes próximos à linha de equivalência. O modelo para produção de  $FB_2$  apresentou melhor predição (figura 15b), devido a maior proximidade à linha de tendência pela plotagem dos dados experimentais versus preditos, se comparados aos modelos de  $FB_1$  e  $FB_{total}$  (figura 15<sup>a</sup> e 15c).

A superfície de resposta (figura 16) demonstra a tendência de aumento na produção de fumonisinas com a redução da temperatura (20°C) e aumento da umidade (25%) em milho inoculado com *F. verticillioides*.



**Figura 16** – Superfícies de resposta da produção de fumonisina  $B_1$  (a) e  $B_2$  (b) versus umidade e temperatura, mantido a presença de inóculo.

### 5.3.1.3.3 Cromatogramas de quantificação de $FB_1$ e $FB_2$ no milho

A figura 17 apresenta o perfil cromatográfico de substrato milho antes de iniciar o ensaio com inóculo de *F. verticillioides* 103F ( $t_0$ ), tanto pré (figura 17a) quanto pós (figura 17b) tratamento térmico. Denota-se que o substrato original já continha fumonisina, sendo que o tratamento térmico utilizado não causou redução relativa no teor, considerando 4,69  $\mu g/g$  de  $FB_{total}$  no substrato original, em relação a 4,66  $\mu g/g$  de  $FB_{total}$  no substrato tratado termicamente, com picos nítidos de  $FB_1$  (6,7-6,9 min) e  $FB_2$  (12,1-12,3 min).

Para obtenção de extrato límpido a partir de substrato milho para análise por CLAE, empregou-se minicoluna de troca aniônica Sep-Pak accell plus

QMA, sendo as fumonisinas eluídas com ácido acético a 0,5% em metanol. Conseqüentemente presume-se que os picos cromatográficos adicionais sejam decorrentes da presença de compostos de caráter catiônico, eluídos por solvente ácido, além de interferentes fluorescentes, oriundos de derivatização com ortoftaldialdeído – OPA.

As figuras 19 e 20 apresentam os cromatogramas, respectivamente do extrato de milho submetido e não ao tratamento térmico, ambos inoculados com *F. verticillioides* 103F, referente à identificação/quantificação de fumonisinas por CLAE. A figura 18 apresenta a mesma análise cromatográfica em extrato resultante de milho submetido ao tratamento térmico, mas sem o inóculo de *F. verticillioides* 103F. Estes perfis cromatográficos corresponderam à análise de extrato resultante de substrato milho no decorrer de 20 dias de incubação a 20-30°C e 15-25% de umidade, conforme protocolo apresentado na tabela 3. Os cromatogramas foram obtidos procedendo à análise de extrato pós-coluna de limpeza diluído a 1:2, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 e 1:500, para obter pico com área que permita melhor análise quantitativa de fumonisina, i.e., concentrações dentro do intervalo da curva padrão.

Em suma, considerando que o tempo de retenção aproximado de FB<sub>1</sub> seja de 6 min e FB<sub>2</sub> de 10-12 min, os cromatogramas obtidos indicaram a produção desta micotoxina em toda faixa de umidade e temperatura testada (figuras 18, 19 e 20). No prospecto geral, observou-se redução no nível de fumonisinas produzidos com o aumento de temperatura e redução de umidade, sendo estes já analisados e demonstrados anteriormente na figura 14. Todavia, uma conotação interessante é sobre a diversidade nos perfis de picos cromatográficos apresentados sob diferentes condições de cultivo, resultantes de diferença na condição de incubação (temperatura e umidade), assim como se o substrato foi submetido ou não ao tratamento térmico para redução da carga microbiana (figuras 17 a 20).

A diversidade nos picos exibidos com tempos de retenção diferentes das fumonisinas, principalmente referente aos com tempos de retenção em 13-18 min, sugeriu presença de outros compostos oriundos de intensa atividade metabólica principalmente de *F. verticillioides* 103F, uma vez que, conforme demonstrado na figura 18, estes picos não foram detectados no substrato não inoculado com esporos do fungo (inóculo = -1). Comparando as figuras 19 e 20, ambas inoculadas com *F. verticillioides* 103F e submetida e não ao tratamento térmico, respectivamente, o crescimento de outros gêneros fúngicos tendeu à redução da produção de composto

correspondente a estes picos, o que aconteceu também com a produção de fumonisinas.

Todavia, o mesmo pico de interferente não foi observado no ensaio conduzido no substrato inoculado com *F. verticillioides* 103F com 25% de umidade a 20°C, onde ocorreu maior produção de fumonisinas (figura 19). Portanto, este composto poderia estar relacionado com a biossíntese de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>, porém numa relação inversa; ou ainda ser um dos 28 análogos de fumonisina caracterizados até o momento (MUSSER & PLATTNER, 1997; RHEEDER *et al.*, 2002), porém com característica menos polar do que FB, como, por exemplo, aqueles que não apresentam o grupamento TCA (ácido tricarbóxico) na estrutura da molécula, citando-se a AP<sub>1</sub>.

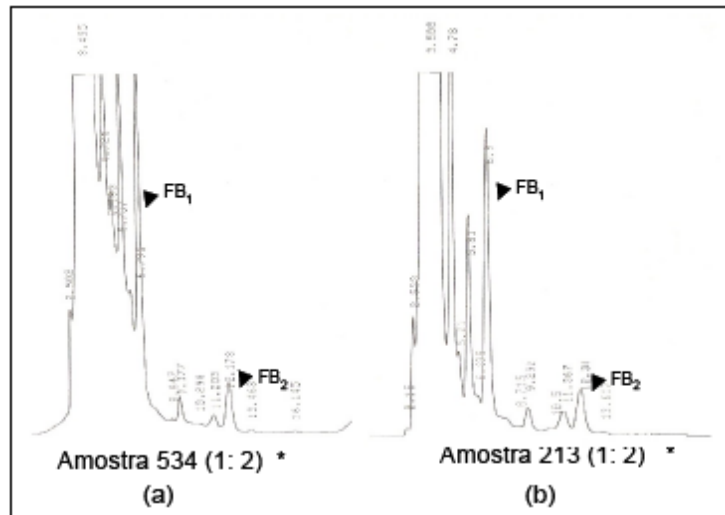
Sendo assim, a 20°C e 25% de umidade, como a via biossintética não acumula este composto, maior seria a concentração destas duas fumonisinas quantificadas e, conseqüentemente, menor concentração de interferentes, o que seria válido caso o interesse fosse cultivo destinado para purificação de fumonisina.

Salienta-se que estes compostos correspondentes aos picos com tempos de retenção em 13-18 min também não foram observados nos substratos com contaminação natural ( $t_0$ ; figura 17); podendo indicar a produção pelo *F. verticillioides* ao longo do tempo de incubação (20 dias).

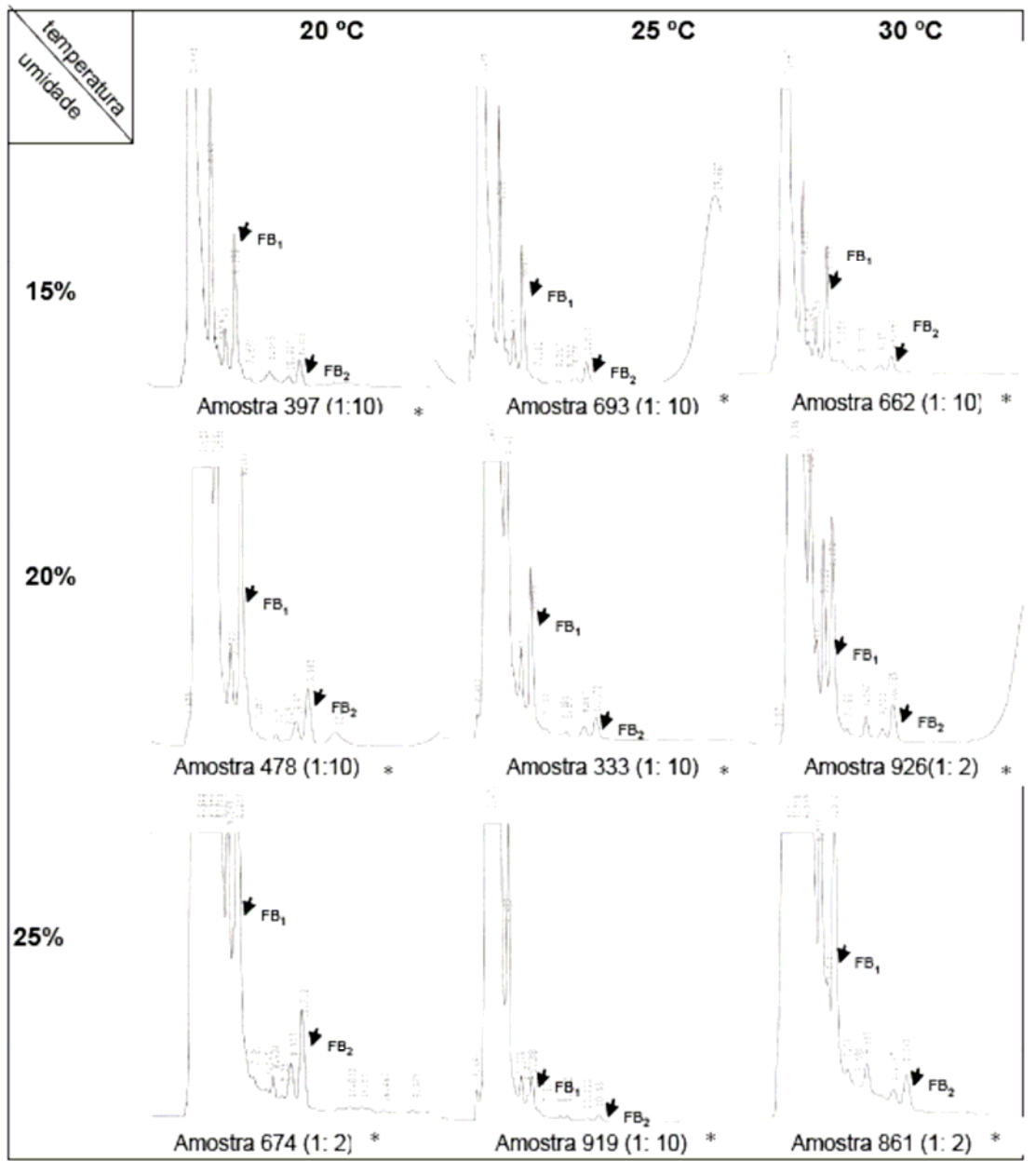
Comparando os cromatogramas apresentados nas figuras 19 e 20, observase maior número de picos interferentes, como um todo, no substrato milho sem tratamento térmico (figura 20), oriundos provavelmente de metabolismo da microbiota natural de milho. Outrossim, estes perfis evidenciaram a vantagem do uso de milho esterilizado na produção de fumonisinas, devido à maior concentração obtida (diluição 1:500, cultivo a 20°C e 25% umidade), aliada à clareza de cromatogramas obtidos, i.e., número inferior de interferentes se comparados ao milho não tratado termicamente (figura 19).

A menor concentração de fumonisina obtida no substrato milho sem tratamento térmico (figura 20), em relação ao milho tratado (figura 19), foi significativa principalmente no ensaio nas proximidades de umidade ótima para o crescimento de *F. verticillioides* (25% de umidade) aliado à melhor temperatura determinada para produção de fumonisina (20°C). Isto é demonstrado uma vez que nestas condições de incubação, o extrato destinado para análise por CLAE requereu diluição de 1:20 (correspondente a 3,45 µg/g de FB<sub>total</sub>, milho sem tratamento

térmico inoculado com *F. verticillioides* 103F), em relação a 1:500 (correspondente a 276,3 µg/g de FBtotal, milho com tratamento térmico inoculado com *F. verticillioides* 103F).



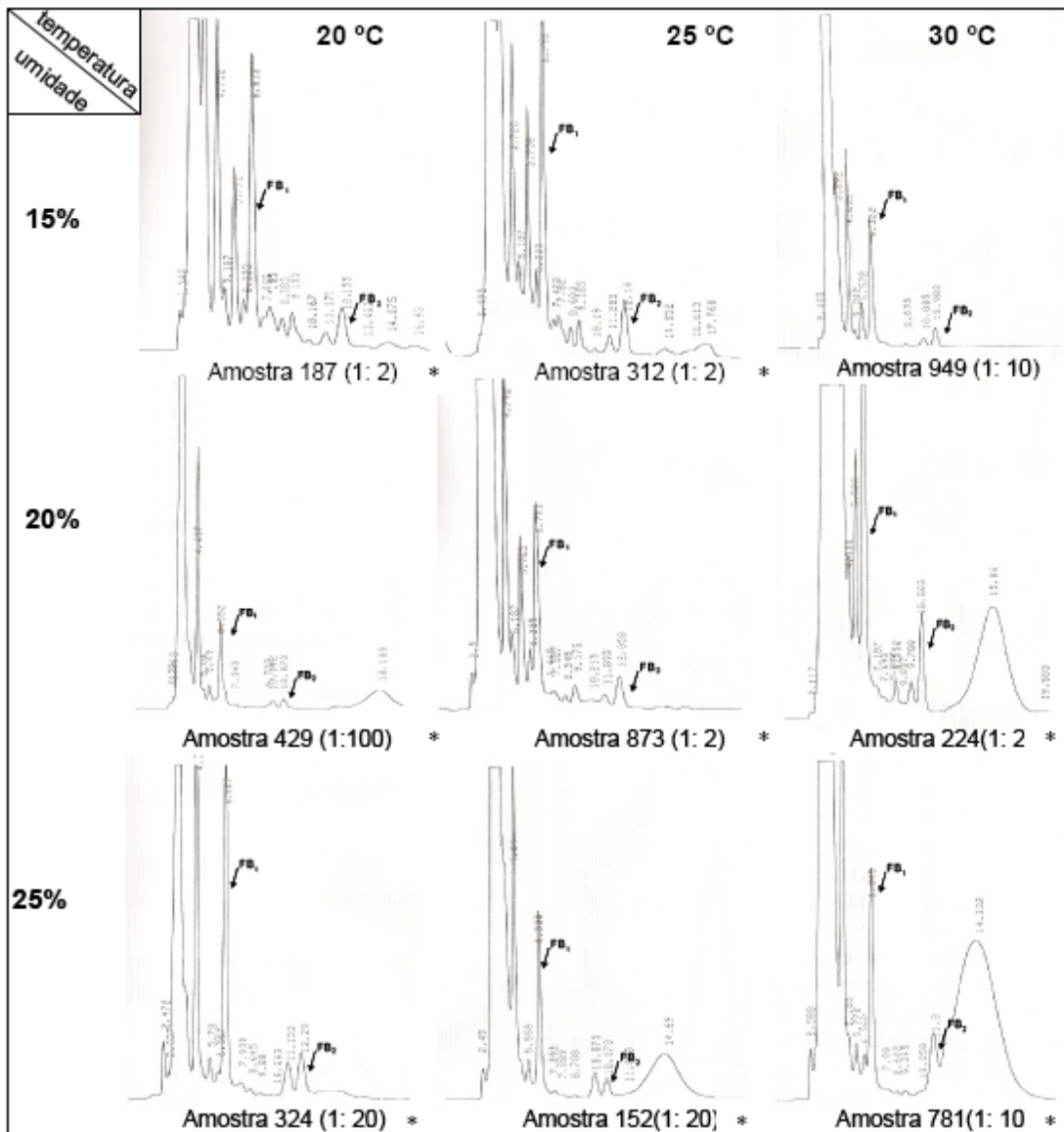
**Figura 17** – Cromatogramas de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> em milho no tempo zero (t<sub>0</sub>): (a) submetido ao tratamento térmico; (b) não submetido ao tratamento térmico.



\* codificação da amostra seguida da correspondente diluição

**Figura 18** – Cromatogramas de FB1e FB2 no substrato milho com tratamento térmico sem *F. verticillioides* (t20)





\* codificação da amostra seguida da correspondente diluição

**Figura 20** – Cromatogramas de FB1 e FB2 no substrato milho sem tratamento térmico e com *F. verticillioides* (t<sub>20</sub>).

#### 5.3.1.4 Aplicação de dados reais aos modelos matemáticos

Mediante utilização de modelos matemáticos desenvolvidos neste estudo, é possível obter a tendência atingida no 20º dia (tempo de manutenção fixado em  $t_{20}$ ), quanto à contaminação fúngica, *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. em milho (tabela 11), assim como nos níveis de fumonisina (tabela 14). Salienta-se que o modelo é válido, desde que as condições instaladas no  $t_0$  permaneçam constantes,

i.e., mantidas inalteradas até o  $t_{20}$ , assim como condiciona a validade aplicada em grãos de milho mantidos dentro das faixas de umidade e temperatura utilizadas no desenvolvimento da equação (15%=umidade=25%; 20°C=temperatura=30°C).

Ciente das restrições, para simular o perfil de contaminação fúngica e de fumonisinas em  $t_{20}$ , os modelos desenvolvidos (tabelas 11 e 14) foram aplicados empregando dados reais obtidos na análise de milho safra 2004, pertencentes ao Projeto FINEP – Cadeia Produtiva de Milho (tabelas 16 e 17). Para efetivar a equação, codificaram-se as variáveis originais de umidade, temperatura e inóculo de *F. verticillioides* mediante aplicação da fórmula (2). A seguir, os valores de variáveis codificadas obtidos foram introduzidos nos modelos matemáticos desenvolvidos, para a predição no tempo  $t_{20}$  da contagem de *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., bolores totais e leveduras, aliado a níveis de  $FB_1$ ,  $FB_2$  e  $F_{total}$  (tabelas 16 e 17).

A seleção de 17 amostras de milho para o estudo (dados reais, pertencentes ao Projeto FINEP) baseou-se nas condições propostas na modelagem para variáveis originais. Portanto, apresentavam umidade entre 16,5 a 22,6%, temperatura entre 25 a 30°C e a contagem de *Fusarium* spp. entre  $1,2 \times 10^4$  a  $9,0 \times 10^4$  UFC/g (considerando que o inóculo de *F. verticillioides* 103F aplicado no milho tratado foi de  $10^4$  UFC/g), sendo todas pertencentes à amostragem realizada na entrada da moega. A temperatura mínima considerada no estudo foi de 25°C (tabelas 16 e 17), sendo o fato justificado, uma vez que nos dados reais fornecidos pelo Projeto FINEP não constavam amostras com temperaturas inferiores a este valor.

Conforme tabela 17, os níveis de fumonisinas obtidos, tanto nos dados reais ( $t_0$ ) quanto nas respostas preditas pelos modelos matemáticos ( $t_{20}$ ), variaram de 0,07 a 6,05 µg/g. Consequentemente, a fumonisina total nos dados reais, variando de 0,07 a 3,55 µg/g ( $t_0$ ) atingiu nível predito de 2,46 a 6,05 µg/g ( $t_{20}$ ). Considerando que o limite recomendado para eqüídeos (um dos animais mais sensíveis) seja de 5 µg/g segundo o “Mycotoxin Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians”, a concentração de fumonisina situou-se em valores inferiores em todas as amostras no  $t_0$ , mas no  $t_{20}$ , 3 amostras que continham entre 5,12 a 6,05 µg/g de fumonisina ultrapassaram este valor.

Outrossim, estes níveis de fumonisina têm sido detectados em casos reais de intoxicação animal na região, assim como em contaminação natural de milho. No primeiro trabalho publicado sobre intoxicação por fumonisina no Brasil, os

níveis de fumonisina variaram de 0,2-38,5  $\mu\text{g/g}$   $\text{FB}_1$  e 0,1-12,0  $\mu\text{g/g}$   $\text{FB}_2$  (SYDENHAM *et al.*, 1992a), assim como de 2,89 a 14,54  $\mu\text{g/g}$   $\text{FB}_{\text{total}}$  no monitoramento das safras 1991-1997 do Estado do Paraná, realizado por Ono *et al.* (2004). Por outro lado, no Estado de São Paulo, um estudo realizado por Camargos *et al.* (2000) quantificou níveis da toxina ( $\text{FB}_{\text{total}}$ ) variando de 1,63 a 25,69  $\mu\text{g/g}$  na safra 97/98. Abbas *et al.* (2006) analisando a contaminação de fumonisina em híbridos de milho no Arkansas observaram níveis de 8,0 a 83,6  $\mu\text{g/g}$  na safra de 2001. Procedendo à analogia entre estes dados de contaminação natural relatados com os nossos dados experimentais (tabela 17), pode-se inferir que as condições que mantêm o metabolismo microbiano em atividade devem ser cessadas, de preferência, nas imediações da colheita.

Em relação às duas toxinas isoladamente, o somatório de  $\text{FB}_1$  e  $\text{FB}_2$  preditas pelos respectivos modelos foi, no contexto geral, inferior ao valor de  $\text{FB}_{\text{total}}$  obtido aplicandose diretamente o modelo (tabela 17). Provavelmente decorreu devido aos baixos coeficientes de correlação obtidos para os modelos de  $\text{FB}_1$  e  $\text{FB}_{\text{total}}$  (61,8 e 67,9%, respectivamente, tabela 15), demonstrando a necessidade de cautela na utilização destas equações de modelagem.

Os níveis de  $\text{FB}_1$  e  $\text{FB}_2$  tanto dos dados reais, que variaram de 0,07 - 2,55  $\mu\text{g/g}$  ( $\text{FB}_1$ ) e não detectado - 1,09  $\mu\text{g/g}$  ( $\text{FB}_2$ ), quanto dos preditos pelos modelos, variação de 1,06- 4,55  $\mu\text{g/g}$  ( $\text{FB}_1$ ) e 0,11 – 1,50  $\mu\text{g/g}$  ( $\text{FB}_2$ ), foram inferiores ao encontrado no interior de São Paulo, Brasil, cujos níveis médios foram de 5,61  $\mu\text{g/g}$  para  $\text{FB}_1$  e 1,86  $\mu\text{g/g}$  para  $\text{FB}_2$  (CAMARGOS *et al.*, 2000).

Tendo em vista que a temperatura ótima determinada para a produção de fumonisinas no ensaio experimental inoculado com *F. verticillioides* 103F em milho termicamente tratado situou-se a 20°C e que, em valores superiores observou-se uma drástica redução na concentração da toxina (figura 14), a faixa de 25 a 30°C, simulada na tabela 17, estaria enfocando condição externa não ideal para desencadear a expressão gênica para biossíntese desta micotoxina, o que justificaria os baixos níveis encontrados da mesma.

Por outro lado, a figura 14 mostra que os grãos tratados termicamente, inoculados com *F. verticillioides* 103F e mantidos sob umidade de 15%, apresentaram queda drástica na produção de fumonisina mesmo sob incubação a 20°C, ou seja, decréscimo de 29,2  $\mu\text{g/g}$  (25% umidade, 20°C) para 2,73  $\mu\text{g/g}$  (15% de umidade, 20°C). Os níveis de fumonisina também se mantiveram em

níveis mínimos a 30°C, mas independente de umidade, i.e. 4,8 µg/g (15% umidade); 4,16 µg/g (20% umidade) e 6,2 µg/g (25% umidade).

Em suma, os dados experimentais indicaram que a 20°C, a redução no nível de fumonisina foi relativamente influenciada pela redução de umidade, e que baixas temperaturas poderiam induzir a expressão de determinados genes envolvidos na produção de toxinas por *F. verticillioides* (tabela 6, figura 14). De fato, leucoencefalomalácia eqüina tem sido relatada após choque térmico causado pelas geadas (ONO, 2004).

No entanto, as elevadas temperaturas na moega durante a safra de verão (janeiro/abril, Projeto FINEP), provavelmente não induziriam a expressão das toxinas de *Fusarium* spp. Não obstante, o mesmo comportamento não deve ser inferido para os fungos micotoxígenos tropicais pertencentes ao grupo de *Aspergillus* spp.: a manutenção prolongada de milho nas proximidades de 30°C favoreceria o desenvolvimento/recuperação de *Aspergillus flavus*, outro grupo toxígeno de ocorrência freqüente no milho da região (ONO, 1999). Situação esta observada por Pardo *et al.* (2004) quando estes observaram maior crescimento de *A. ochraceus* e maior produção de ocratoxina A em grãos de cevada a 30°C; e por Molina & Giannuzzi (2002), onde a temperatura de 27°C foi a ideal para produção de aflatoxinas por *A. parasiticus*.

Considerando a presença destes dois grandes grupos de fungos toxígenos (*Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp.) numa região subtropical com alta produtividade de milho, aliado a dados obtidos, o procedimento recomendado para a pré-estocagem de milho seria a secagem imediata a teores de umidade inferior a 15%, mesmo mantendo temperatura de 20°C (figura 14), o que também conduziria à redução na multiplicação de *Fusarium* spp. E bolores/leveduras totais (figuras 8 e 10). Dados estes que confirmam o valor máximo permitido pela Legislação Federal de 14% de umidade para conservação de sementes de milho (BRASIL, 1989). Outrossim, o resfriamento de grãos também seria crucial, ao se considerar a inibição de crescimento fúngico, i.e. restringir condição para evitar o desenvolvimento de *Aspergillus* spp.

Quanto a dados microbiológicos, houve aumento gradativo no decorrer da manutenção, i.e., comparação da contagem dos dados reais (to) e dos dados preditos (t20). Sendo que estas amostras apresentavam contagem inicial de *Fusarium* spp, *Penicillium* spp. E bolores e leveduras totais de  $1,2 \times 10^4$  –  $9 \times 10^4$ ,

ND –  $1 \times 10^4$  e  $2,5 \times 10^4 - 5,7 \times 10^5$  UFC/g, respectivamente, e após 20 dias mantidas nas condições iniciais, a predição segundo os modelos atingiu uma contagem na faixa de  $1,8 \times 10^4 - 1,4 \times 10^8$  UFC/g para *Fusarium* spp.,  $2,2 \times 10^2 - 1,4 \times 10^7$  para *Penicillium* spp. e  $4,6 \times 10^6 - 6,6 \times 10^8$  para bolores e leveduras totais.

Salienta-se que todas as amostras do projeto FINEP - Cadeia Produtiva de Milho selecionadas para o estudo pertenciam àquelas coletadas na entrada da moega, sendo que, embora não tenha sido estatisticamente significativo, houve uma tendência no aumento de fumonisinas na saída de moega em relação às amostras coletadas na sua entrada. No entanto, os dois locais de amostragem apresentaram perfis semelhantes quanto à contagem fúngica e gêneros envolvidos como componentes da microbiota de milho, o que, aliado à contagem elevada (no contexto geral) das amostras, indica o alcance do patamar de crescimento microbiano (fase estacionária).

Sendo assim, as informações obtidas podem ser usadas para tomar decisões de controle em relação à colheita, plantio ou armazenamento, a fim de evitar deterioração de grãos com perda de qualidade e produção de fumonisinas acima do limite permitido pela legislação vigente (Food and Drug Administration; Mycotoxin Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians).

Em suma, o modelo matemático desenvolvido ainda apresentou-se bastante rígido e estático, mas com perspectivas promissoras de aperfeiçoamento, a nível capaz de permitir flexibilidade suficiente em relação às variáveis tempo e inóculo de *F. verticillioides*. Aliado a isso, devem ser inseridos fatores ou variáveis oriundos de alterações físico-químicas inerentes no substrato milho, interferência de microbiota natural de milho no crescimento e produção de micotoxina pelo fungo patógeno alvo de estudo, *F. verticillioides*.

**Tabela 16** – Aplicação de dados reais (Projeto FINEP - Cadeia Produtiva de Milho) aos modelos matemáticos desenvolvidos para micobiota.

Variáveis originais			Variáveis codificadas			Respostas reais (t <sub>0</sub> )			Respostas preditas (t <sub>20</sub> )		
U* (%)	T* (°C)	I* (UFC/g)	U*	T*	I*	<i>Fusarium</i> spp. (UFC/g)	<i>Penicill.</i> spp. (UFC/g)	Bol. Tot. e Leved. (UFC/g)	<i>Fusarium</i> spp. (UFC/g)	<i>Penicill.</i> spp. (UFC/g)	Bol. tot. e Leved. (UFC/g)
19,1	30	1,6x10 <sup>4</sup>	-0,18	1	1	1,6x10 <sup>4</sup>	1,0 x10 <sup>3</sup>	3,6 x10 <sup>4</sup>	2,8 x10 <sup>5</sup>	1,1 x10 <sup>5</sup>	2,3 x10 <sup>9</sup>
19,5	27,1	1,7x10 <sup>4</sup>	-0,1	0,42	1	1,7 x10 <sup>4</sup>	2,0 x10 <sup>3</sup>	6,9 x10 <sup>4</sup>	1,0 x10 <sup>7</sup>	2,3 x10 <sup>5</sup>	2,4 x10 <sup>7</sup>
18,9	28,3	1,2x10 <sup>4</sup>	-0,22	0,66	1	1,2 x10 <sup>4</sup>	1,5 x10 <sup>3</sup>	2,8 x10 <sup>4</sup>	1,4 x10 <sup>6</sup>	7,5 x10 <sup>4</sup>	5,1 x10 <sup>6</sup>
17,8	29,6	1,3x10 <sup>4</sup>	-0,44	0,92	1	1,3 x10 <sup>4</sup>	5,5 x10 <sup>3</sup>	3,3 x10 <sup>4</sup>	3,0 x10 <sup>4</sup>	6,6 x10 <sup>3</sup>	1,1 x10 <sup>5</sup>
19,3	28,5	4,0x10 <sup>4</sup>	-0,14	0,7	1	4,0 x10 <sup>4</sup>	5,0 x10 <sup>3</sup>	6,5 x10 <sup>4</sup>	2,5 x10 <sup>6</sup>	1,6 x10 <sup>5</sup>	1,0 x10 <sup>7</sup>
17,6	29,3	6,5x10 <sup>4</sup>	-0,48	0,86	1	6,5 x10 <sup>4</sup>	1,0 x10 <sup>4</sup>	1,7 x10 <sup>5</sup>	2,7 x10 <sup>4</sup>	4,0 x10 <sup>3</sup>	9,0 x10 <sup>4</sup>
22,6	28,4	8,5x10 <sup>4</sup>	0,52	0,68	1	8,5 x10 <sup>4</sup>	2,0 x10 <sup>4</sup>	3,3 x10 <sup>5</sup>	1,4x10 <sup>8</sup>	1,4 x10 <sup>7</sup>	6,6 x10 <sup>8</sup>
20,5	28	9,0x10 <sup>4</sup>	0,1	0,6	1	9,0 x10 <sup>4</sup>	5,0 x10 <sup>3</sup>	1,0 x10 <sup>5</sup>	2,7 x10 <sup>7</sup>	1,2 x10 <sup>6</sup>	8,9 x10 <sup>7</sup>
19,5	30	1,9x10 <sup>4</sup>	-0,1	1	1	1,9 x10 <sup>4</sup>	3,5 x10 <sup>3</sup>	4,9 x10 <sup>4</sup>	5,9 x10 <sup>5</sup>	2,3 x10 <sup>5</sup>	5,8 x10 <sup>6</sup>
20	30	3,2x10 <sup>4</sup>	0	1	1	3,2 x10 <sup>4</sup>	8,5 x10 <sup>3</sup>	5,4 x10 <sup>4</sup>	1,3 x10 <sup>6</sup>	5,7 x10 <sup>5</sup>	1,6 x10 <sup>7</sup>
20	25	1,9x10 <sup>4</sup>	0	0	1	1,9 x10 <sup>4</sup>	2,5 x10 <sup>3</sup>	2,8 x10 <sup>4</sup>	4,3 x10 <sup>7</sup>	5,7 x10 <sup>5</sup>	5,4 x10 <sup>7</sup>
20	25	8,0x10 <sup>4</sup>	0	0	1	8,0 x10 <sup>4</sup>	4,0 x10 <sup>3</sup>	5,7 x10 <sup>5</sup>	4,3 x10 <sup>7</sup>	5,7 x10 <sup>5</sup>	5,4 x10 <sup>7</sup>
19	25	2,1x10 <sup>4</sup>	-0,2	0	1	2,1 x10 <sup>4</sup>	1,5 x10 <sup>3</sup>	2,5 x10 <sup>4</sup>	7,6 x10 <sup>6</sup>	9,2 x10 <sup>4</sup>	1,2 x10 <sup>7</sup>
18	30	1,6x10 <sup>4</sup>	-0,4	1	1	1,6 x10 <sup>4</sup>	ND**	3,0 x10 <sup>4</sup>	2,7 x10 <sup>4</sup>	1,0 x10 <sup>4</sup>	1,2 x10 <sup>5</sup>
17	30	2,4x10 <sup>4</sup>	-0,6	1	1	2,4 x10 <sup>4</sup>	1,5 x10 <sup>3</sup>	3,3 x10 <sup>4</sup>	2,2 x10 <sup>3</sup>	8,7 x10 <sup>2</sup>	4,6 x10 <sup>3</sup>
16,5	25	1,6x10 <sup>4</sup>	-0,7	0	1	1,6 x10 <sup>4</sup>	5,0 x10 <sup>2</sup>	2,8 x10 <sup>4</sup>	1,8 x10 <sup>4</sup>	2,2 x10 <sup>2</sup>	6,9 x10 <sup>4</sup>
18	30	1,4x10 <sup>4</sup>	-0,4	1	1	1,4 x10 <sup>4</sup>	9,5 x10 <sup>3</sup>	3,4 x10 <sup>4</sup>	2,7 x10 <sup>4</sup>	1,0 x10 <sup>4</sup>	1,2 x10 <sup>5</sup>

\* U = umidade; T = temperatura; I = *Fusarium* spp. (considerando que o inóculo de *F. verticillioides* 103F aplicado no milho tratado foi de 104 UFC/g)

\*\* ND = não detectado (< 100 UFC/g)

**Tabela 17** – Aplicação de dados reais (Projeto FINEP - Cadeia Produtiva de Milho) aos modelos matemáticos desenvolvidos para  $FB_1$ ,  $FB_2$  e  $FB_{total}$ .

Variáveis originais			Variáveis codificadas			Respostas reais ( $t_0$ )			Respostas previstas ( $t_{20}$ )		
U* (%)	T* (°C)	I* (UFC/g)	U*	T*	I*	$FB_1$ ( $\mu\text{g/g}$ )	$FB_2$ ( $\mu\text{g/g}$ )	$FB_{total}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	$FB_1$ ( $\mu\text{g/g}$ )	$FB_2$ ( $\mu\text{g/g}$ )	$FB_{total}$ ( $\mu\text{g/g}$ )
19,1	30	$1,6 \times 10^4$	-0,18	1	1	0,13	ND	0,13	1,63	0,55	4,15
19,5	27,1	$1,7 \times 10^4$	-0,1	0,42	1	1,14	0,35	1,49	1,77	0,78	3,33
18,9	28,3	$1,2 \times 10^4$	-0,22	0,66	1	2,55	1,00	3,55	1,16	0,53	2,90
17,8	29,6	$1,3 \times 10^4$	-0,44	0,92	1	1,82	0,41	2,23	1,53	0,29	3,34
19,3	28,5	$4,0 \times 10^4$	-0,14	0,7	1	0,91	0,19	1,1	1,19	0,57	3,10
17,6	29,3	$6,5 \times 10^4$	-0,48	0,86	1	1,61	0,21	1,82	1,33	0,25	2,89
22,6	28,4	$8,5 \times 10^4$	0,52	0,68	1	1,98	0,55	2,53	1,06	0,72	2,46
20,5	28	$9,0 \times 10^4$	0,1	0,6	1	0,87	ND	0,87	1,41	0,73	3,26
19,5	30	$1,9 \times 10^4$	-0,1	1	1	0,72	ND	0,72	1,56	0,61	4,14
20	30	$3,2 \times 10^4$	0	1	1	0,07	ND	0,07	1,46	0,67	4,06
20	25	$1,9 \times 10^4$	0	0	1	0,52	0,05	0,57	4,55	1,50	6,05
20	25	$8,0 \times 10^4$	0	0	1	0,19	0,09	0,28	4,55	1,50	6,05
19	25	$2,1 \times 10^4$	-0,2	0	1	0,55	ND	0,55	3,88	1,30	5,12
18	30	$1,6 \times 10^4$	-0,4	1	1	0,15	ND	0,15	1,83	0,34	3,94
17	30	$2,4 \times 10^4$	-0,6	1	1	1,95	1,09	3,04	2,00	0,11	3,45
16,5	25	$1,6 \times 10^4$	-0,7	0	1	0,2	ND	0,2	1,14	0,60	1,54
18	30	$1,4 \times 10^4$	-0,4	1	1	0,19	ND	0,19	1,83	0,34	3,94

\* U = umidade; T = temperatura; I = *Fusarium* spp. (considerando que o inóculo de *F. verticillioides* 103F aplicado no milho tratado foi de 104 UFC/g)

\*\* ND = não detectado (< 100 UFC/g)

### 5.3.1.5 Análise de planejamento fatorial para respostas físico-químicas

As respostas físico-químicas no  $t_0$  (condição inicial) não apresentaram diferença significativa entre milho termicamente tratado ou não, exceto atividade de água (tabela 5). Todavia, os dados obtidos de milho submetido ao tratamento apresentaram melhor ajuste ao modelo matemático, apresentando coeficientes de determinação mais elevados, sendo então os grãos submetidos a este processo selecionados para a análise do efeito das variáveis (umidade, temperatura e inóculo) nas respostas físico-químicas.

#### 5.3.1.5.1 Efeito de umidade e temperatura no teor de proteína e extrato etéreo (milho com ou sem inóculo de *F. verticillioides*)

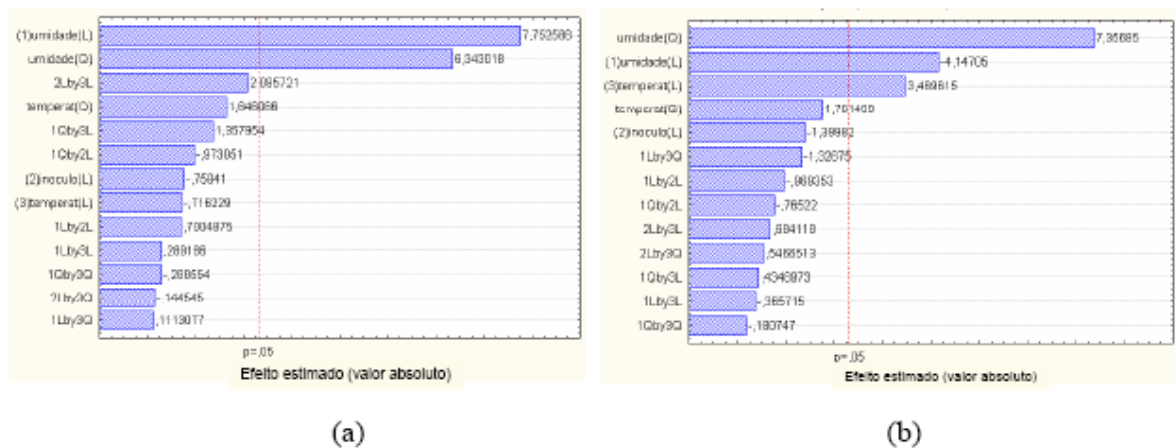
**Tabela 18** – Efeito e análise de variância para o teor de proteína e extrato etéreo no milho submetido ao tratamento térmico ( $t_{20}$ -  $t_0$ ).

Tratamentos	Parâmetros			
	Proteína		Extrato etéreo	
	Efeito	p	Efeito	p
(1) Umidade (L)*	1,6416	0,0000	-3,1016	0,0032
Umidade (Q)**	1,0736	0,0002	4,3980	0,0000
(2)Inóculo (L)*	-0,1240	0,4699	-0,8086	0,1991
(3)Temperat. (L)*	-0,1516	0,4942	2,5950	0,0084
Temperat. (Q)**	0,2786	0,1383	1,0530	0,1161
1L* x 2L*	0,1483	0,5034	-0,7250	0,3607
1Q** x 2L*	-0,1585	0,3590	-0,4403	0,4661
1L* x 3L*	0,0750	0,7797	-0,3350	0,7240
1L* x 3Q**	0,0250	0,9141	-1,0525	0,2212
1Q** x 3L*	0,3050	0,2115	0,3450	0,6751
1Q** x 3Q**	-0,0470	0,7802	-0,1014	0,8610
2L* x 3L*	0,4416	0,0704	0,5116	0,5132
2L* x 3Q**	-0,0235	0,8886	0,3146	0,5995

\*L = termo linear; \*\*Q = termo quadrático

(1) = umidade, (2) = inóculo, (3) = temperatura

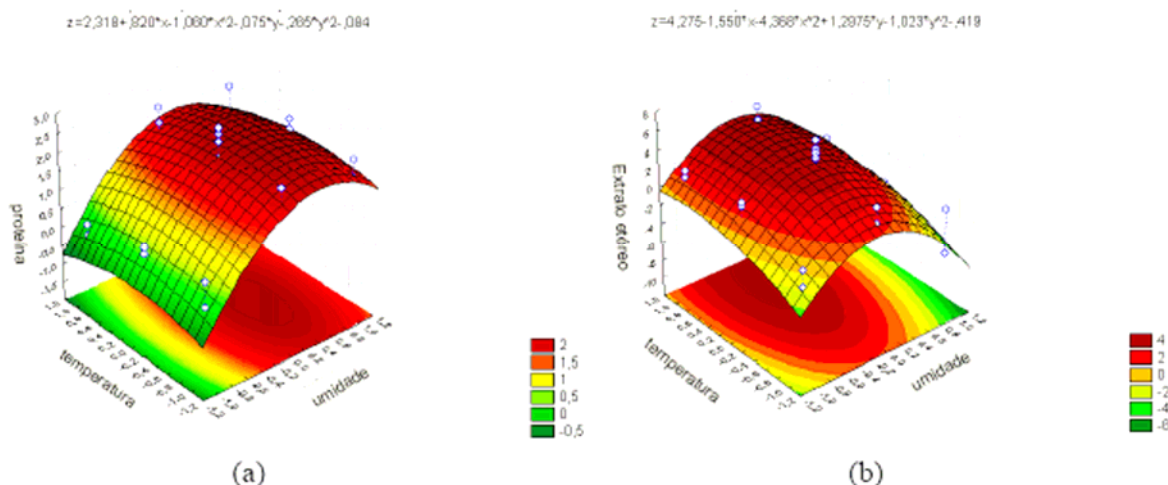
Conforme a tabela 18, somente a umidade teve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) sobre o parâmetro proteína. Esta mesma variável teve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) também sobre o teor de extrato etéreo nos grãos de milho, juntamente com a temperatura linear. O que pode ser melhor observado na figura 21, onde são demonstradas as variáveis que apresentam maior efeito sobre as respostas físico químicas.



L = termo linear; Q = termo quadrático  
(1)= umidade, (2) = inóculo, (3) = temperatura

**Figura 21** – Efeito das variáveis independentes pelo método de “Pareto Chart” no teor de proteína (a) e no teor de extrato etéreo (b).

Conforme o gráfico de “Pareto Chart”, a variável inóculo não foi significativa para o teor de proteína e extrato etéreo (figura 21), sendo assim, a superfície de resposta foi realizada somente em função da umidade e temperatura (figura 22), fixando o inóculo de *F. verticillioides* (+1, presença de inóculo). A plotagem demonstrou efeito insignificante da temperatura sobre o teor proteína, mas mostrou aumento deste parâmetro com o aumento da umidade (figura 22a). O fato pode ser entendido como aumento adicional no teor protéico dos grãos de milho devido à biomassa fúngica, em resposta à multiplicação microbiológica. A figura 22b mostra a tendência no aumento do teor de extrato etéreo na região de umidade intermediária (20%) e temperatura na extremidade superior do gráfico (30°C).



**Figura 22** – Superfície de resposta para o teor de proteína (a) e extrato etéreo (b) na presença de inóculo de *F. verticillioides*.

Assim, a modelagem demonstrou que 25°C foi a temperatura ótima para crescimento de *Fusarium* spp. e total de bolores/leveduras (figuras 8 e 10), o que provavelmente tenha favorecido a cinética de reação envolvida nos mecanismos bioquímicos de crescimento. Em condição aeróbia e sob temperatura ótima para processos enzimáticos, ocorre aceleração da via glicolítica, aliado ao ciclo de Krebs, onde ocorre produção de ATP resultante de fosfoliração oxidativa (respiração). No entanto, sob uma temperatura superior, a exemplo de 30°C, onde foi observado declínio da taxa de crescimento fúngico (figuras 8 e 10), poderia estar iniciando o processo de oxidação com formação de radicais livres em grupos fúngicos adaptados à temperaturas de 15 - 25°C, iniciando a desnaturação protéica e conseqüente mudança na conformação tridimensional no centro ativo enzimático. Isto ocorre porque as reações ezimáticas, como na maioria das reações químicas, têm sua velocidade aumentada pelo aumento da temperatura somente dentro da faixa em que a enzima é estável e mantém sua atividade integral (FURLONG, 2000). Sendo assim, o fluxo de formação de ATP seria desacelerado, bem como os processos biossintéticos endotérmicos, reduzindo a velocidade de multiplicação celular. A redução no fluxo de acetil-CoA no ciclo de Krebs deveria ser compensada desviando a via para a biossintese de ácidos graxos. Este desvio eliminaria o acetil-CoA para desintoxicar a célula e, explicaria a tendência no aumento do teor de extrato etéreo no cultivo a 30°C (figura 22b). Salienta-se que produtos solúveis em extrato etéreo (lipídeos) têm os ácidos graxos como substrato inicial.

Destaca-se que *Fusarium* spp. em geral são fungos adaptados à condição climática de região temperada a sub-tropical, uma vez que pesquisas revelaram predominância deste gênero nestas regiões (HIROOKA *et al.*, 1996; VELLUTI *et al.*, 2000; SCUDAMORE & PATEL, 2000).

### 5.3.1.5.2 Efeito de umidade e temperatura no teor de umidade e atividade de água (milho com ou sem inóculo de *F. verticillioides*)

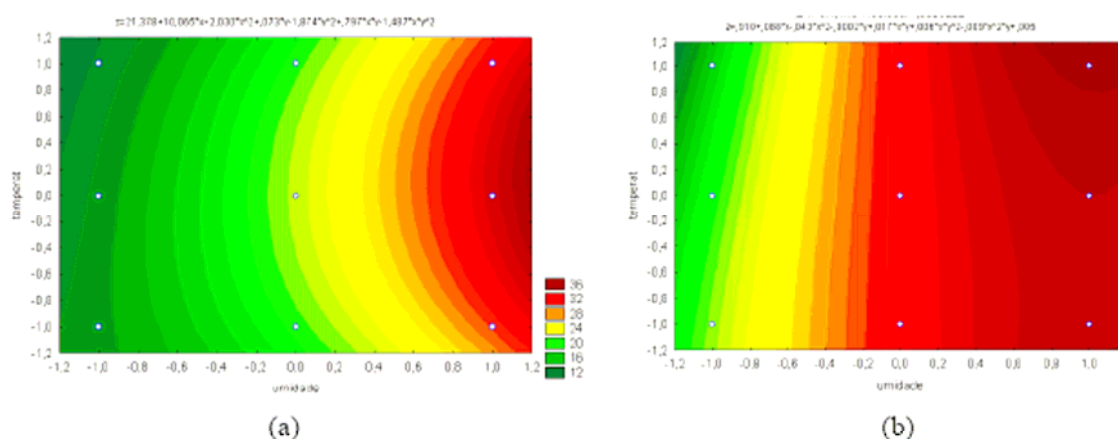
A tabela 19 mostra o efeito de variáveis analisadas e suas interações para as respostas físico-químicas de umidade e atividade de água.

**Tabela 19** – Efeito e análise de variância para a umidade e atividade de água no milho submetido ao tratamento térmico

Tratamentos	Parâmetros			
	Umidade		Atividade de água	
	Efeito	p	Efeito	p
(1)Umidade (L)*	18,1466	<b>0,0000</b>	0,184417	<b>0,000000</b>
Umidade (Q)**	-1,9816	<b>0,0014</b>	0,042931	<b>0,000000</b>
(2)Inóculo (L)*	0,5317	0,2230	0,010684	<b>0,001187</b>
(3)Temperat. (L)*	0,1466	0,7855	-0,012750	<b>0,001949</b>
Temperat. (Q)**	1,9233	<b>0,0017</b>	0,000181	0,938135
1L* x 2L*	0,6633	0,2388	-0,000917	0,753519
1Q** x 2L*	-0,7573	0,0956	-0,000599	0,789658
1L* x 3L*	1,5950	<b>0,0370</b>	0,034625	<b>0,000008</b>
1L* x 3Q**	1,4875	<b>0,0274</b>	-0,006312	0,067867
1Q** x 3L*	-0,5450	0,3531	0,009187	<b>0,015323</b>
1Q** x 3Q**	-0,1750	0,6745	0,001115	0,621922
2L* x 3L*	0,6866	0,2241	0,004083	0,185723
2L* x 3Q**	-0,5773	0,1879	0,003401	0,155710

\*L = termo linear; \*\*Q = termo quadrático  
(1) = umidade, (2) = inóculo, (3) = temperatura

Conforme o esperado, a umidade e a atividade de água responderam positivamente às variáveis umidade e temperatura ( $p < 0,05$ ). A figura 23 evidencia o maior efeito exercido pela temperatura na atividade de água em relação à resposta umidade, sendo estas, diretamente proporcionais entre si. Isto pode ser entendido como pela maior energização das moléculas com o aumento da temperatura e, conseqüentemente, maior liberação de água livre.



**Figura 23** – Linhas de contorno para a umidade (a) e atividade de água (b) na presença de inóculo de *F. verticillioides*.

### 5.3.2 Planejamento Experimental para Grãos de Milho Não Tratados Termicamente

A distribuição normal dos dados e a homogeneidade das variâncias foram analisadas aplicando os testes de Shapiro-Wilk's  $W$ . e Levene, respectivamente (tabela 20). Na análise de normalidade, os valores de "p" demonstraram que os dados da germinação e vigor não seguiram uma distribuição normal, i.e., houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre estes dados e de Shapiro Wilk's  $W$ . No entanto, a análise dos mesmos dados pelo teste de Levene demonstrou que as variâncias das respostas obtidas apresentam homogeneidade. Portanto, a análise de variância pode ser aplicada para avaliação individual de cada parâmetro, apesar de não apresentarem distribuição normal.

**Tabela 20** – Valores de “p” pelo teste de Shapiro Wilk’s e Levene para avaliar aplicabilidade\* da análise variância (ANOVA).

Parâmetro	Shapiro Wilk’s W.	Levene
Valor de “p”		
Germinação	0,0011**	0,4741 ***
Vigor	0,0103**	0,7539***

\* 22 tratamentos executados para efeito combinado de temperatura e umidade na porcentagem de germinação e vigor em milho.

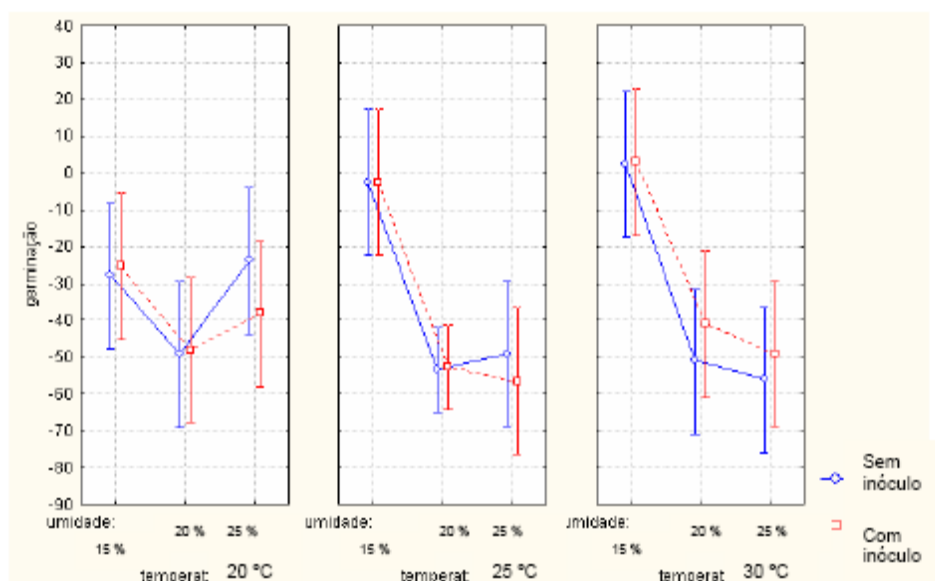
\*\* dados não apresentam distribuição normal ( $p < 0.05$ )

\*\*\* dados apresentam homogeneidade de variâncias ( $p > 0.05$ ).

### 5.3.2.1 Análise de planejamento fatorial para respostas fisiológicas

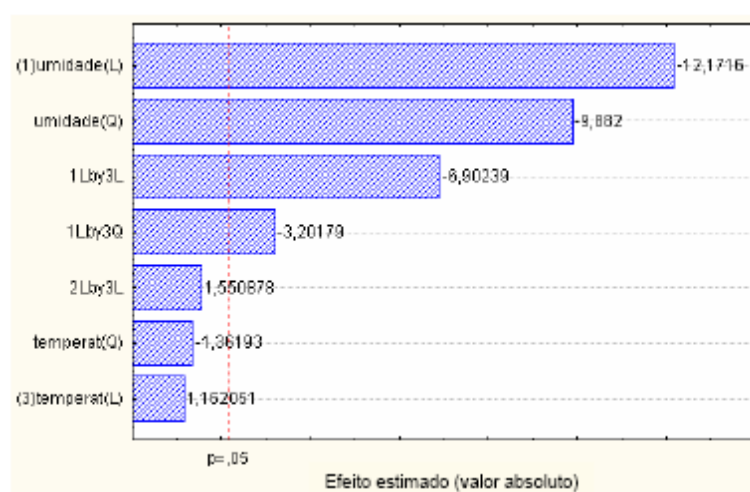
As sementes sofreram reduções no poder germinativo e vigor, com reflexos negativos na sua potencialidade e na performance das sementes e das plantas no campo, após 20 dias de armazenagem nas condições do planejamento experimental. Isto significa que a contaminação de grãos de milho por *F. verticillioides*, além de possibilitar a produção de fumonisinas, acarretaria diminuição na produção agrícola, caso este grão fosse utilizado como semente.

Conforme a figura 24, as menores porcentagens de germinação ocorreram em milho inoculado com *F. verticillioides* e estocado a 25% de umidade a 25°C. Esta condição coincidiu exatamente com a que favoreceu o maior crescimento de *Fusarium* spp. e bolores/ leveduras totais (figuras 8 e 10), o que evidencia a deterioração dos grãos pelos gêneros fúngicos.



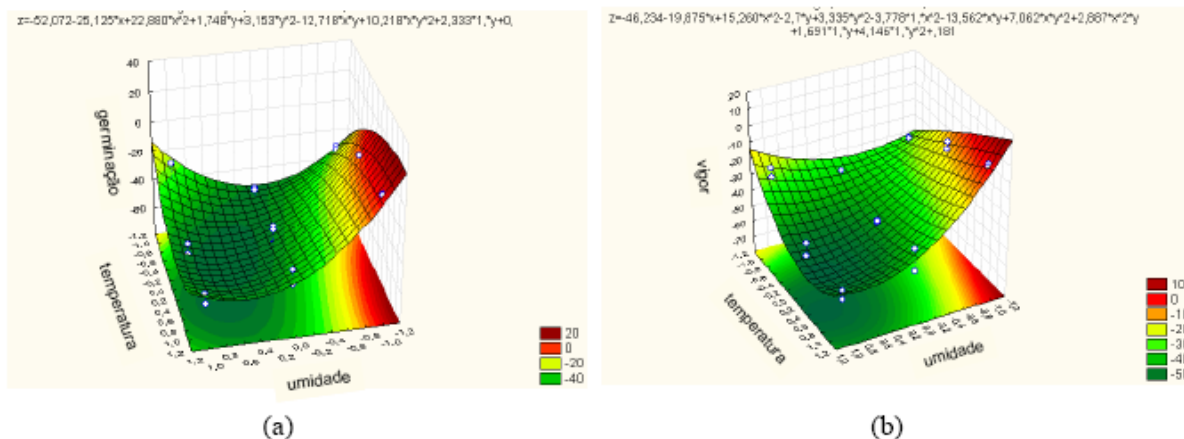
**Figura 24** – Poder germinativo dos grãos de milho em relação à umidade, temperatura e inóculo

Conforme figura 25, a variável que mais influenciou na perda do poder germinativo dos grãos foi a umidade, seja no seu termo linear ou quadrático; fato também observado nas figuras 26a e 26b, que além disso, salientam que a porcentagem de germinação e vigor dos grãos tenderam a diminuir com o aumento na umidade e temperatura.



L = termo linear; Q = termo quadrático  
 (1)= umidade, (2) = inóculo, (3) = temperatura

**Figura 25** – Efeito das variáveis independentes pelo método de “Pareto Chart” no poder germinativo.



**Figura 26** – Superfície de resposta para o poder germinativo (a) e vigor (b) na presença de inóculo de *F. verticillioides*

A presença ou ausência de *F. verticillioides* não influenciou na perda do poder germinativo e no vigor dos grãos de milho, o que demonstra a contaminação das amostras por outros gêneros fúngicos, como *Penicillium* spp., que também exerceram efeito negativo na germinação e vigor dos grãos.

## 6 CONCLUSÃO

Recomenda-se a proporção solo:milho de 0,75g solo/500g milho (0,15% de solo) como veículo ideal para inocular *F. verticillioides* nos grãos. Nesta proporção, o solo não interferiu nas análises físico-químicas e microbiológicas do substrato milho, i.e., manteve Aw original e não inibiu o crescimento de *F. verticillioides*.

O milho in natura (safra 2005) apresentou composição centesimal de 10,8% de proteína; 9,1% de extrato etéreo e 13,1% de umidade, 93,1% de viabilidade e 86,8% de vigor, tendo *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. como gêneros fúngicos predominantes, seguido de *Aspergillus* spp. e fumonisinas pré-existentes (3,72 e 0,95 µg/g de B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, respectivamente), preenchendo características condizentes com a contaminação natural da região e conseqüentemente, adequadas para prosseguir com o estudo de modelagem.

A melhor condição para o crescimento de *Fusarium* spp. (umidade de 25% a 25°C) diferiu de parâmetros que proporcionaram a produção de níveis mais elevados de fumonisinas (20°C sob umidade de 25%), sendo estas relacionadas como a redução no poder germinativo e vigor (mais acentuadas em 25% de umidade a 25°C). O aumento no teor de proteína e atividade de água com a umidade poderia estar relacionado à multiplicação da micobiota.

Os modelos desenvolvidos permitiram a predição da contagem de *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e total de bolores e leveduras dentro dos limites utilizados no estudo, visto que os dados contemplaram adequadamente os índices estatísticos e matemáticos e da validação gráfica. O mesmo também foi observado nos modelos preditivos desenvolvidos para a produção de fumonisinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e total (B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub>), mas com cautela por pertencerem ao metabolismo secundário, e porque os modelos apresentaram-se menos exatos. Sendo assim, foi possível a introdução de dados reais aos modelos desenvolvidos para a predição de micobiota e níveis de fumonisinas no 20º dia subsequente.

É importante salientar, que outros parâmetros, a exemplo da atmosfera de estocagem, oscilações de temperatura, presença de competidores, híbrido de milho, práticas agrônômicas, agentes anti-fúngicos, entre outros, também influenciariam nas respostas em nível de campo, inclusive no armazenamento. A

modelagem em estudo deve ser continuada, aumentando o número de variáveis e/ou ampliando os níveis utilizados. O fato permitiria flexibilidade na aplicação destes modelos no controle de condições para a preservação de milho, retardando o crescimento de *F. verticillioides* e conseqüente produção de fumonisinas.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, H.T., OCAMB, C.M. First report of fumonisin B<sub>1</sub> *Fusarium polyphialidicum* collected from seeds of *Pinus strobes*. **Plant Disease**, v.79, p.642-645, 1995.

ABBAS, H.K.; CARTWRIGHT, R.D.; XIE, W.; SHIER, T. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. **Crop Protection**, v. 25, p. 1-9, 2006.

ADAIR, C.; KILSBY, D.C.; WHITTALL, P.T. Comparison of the Schoolfield (non-linear Arrhenius) model and the Square Root model for predicting bacterial growth in foods. **Food Microbiology**, v. 6, p. 7-18, 1989.

AH SEO, J., WON LEE, Y. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Applied Environmental Microbiology**, v.65, p.1331-1334, 1999.

ALBERTS, J. F.; GELDERBLOM, W. C. A.; THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O.; VAN SCHALKWYK, D. J.; BEHREND, Y. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B<sub>1</sub> by *Fusarium moniliforme*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1729-1733, 1990.

ALMEIDA, A. P.; FONSECA, H.; FANCELLI, A. L.; DIREITO, G. M.; ORTEGA, E. M.; CORRÊA, B. Mycoflora and fumonisin contamination in brazilian corn from sowing to harvest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3877-3882, 2002.

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH AB. **Reverse Phase Cromatography: Principles and Methods**, Sweden, 1999.

ANDRADE, R. V.; AUZZA, S. A. Z.; ANDREOLI, C.; NETTO, D. A. M.; OLIVEIRA, A. C. Qualidade fisiológica das sementes do milho híbrido simples HS 200 em relação ao tamanho. **Ciência Agrotec**. V. 25, n. 3, p. 576-582, maio/jun., 2001.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. AOAC. **Official methods of analysis**. 16 ed. Washington, D. C., v. 2, 1995.

AVANTAGGIATO, G. et al. Fumonisin contamination of maize hybrids visibly damaged by *Sesamia*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 13-18, 2002.

AZCONA-OLIVEIRA, J.L.; ABOUZIED, M.M.; PLATTNER, R.D.; NORRED, W.P.; PESTKA, J.J. Generation of antibodies reactive with fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> by using cholera toxin as the carrier-adjuvant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 169-173, 1992a.

AZCONA-OLIVEIRA, J.L.; ABOUZIED, M.M.; PLATTNER, R.D.; PESTKA, J.J. Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub>. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 40, p. 531-534, 1992b.

BACON, C.W.; WILLIAMSON, J.W. Interactions of *Fusarium moniliforme*, its metabolites and bacteria with corn. **Mycopathologia**, v. 117, p. 65-71, 1992.

BACON, C.W.; NELSON, P.E. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 6, p. 514-521, 1994.

BASSO, F. M. **Umidade e Temperatura de Pós-colheita na Qualidade de Milho Contaminado com *Fusarium verticillioides***. Trabalho de Conclusão de Curso de Agronomia. Universidade Estadual de Londrina; Londrina – PR. 2003.

BETIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1991.

BEZUIDENHOUT, S. C., GELDERBLOM, W. C. A., GORST-ALLMAN, C. P., HORAK, R. M., MARASAS, W. F. O., SPITELLER, G., et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society – Chemical Communications**, 19, 743–745, 1988.

BOLGER, M., COKER, R.D., DINOVI, M., GAYLOR, D., GELDERBLOM, W., & OLSEN, M., et al. In **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**, pp. 103–280. Edited by the Fiftysixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). FAO, Rome, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Comissão Nacional de Sementes e Mudanças**. Brasília, 318p., 1989.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 365p., 1992.

BUCCI, T. J., HANSEN, D. K., LABORDE, J. B. Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin fumonisin B<sub>1</sub>. **Natural Toxins**, 4, 51–52, 1996.

CAHAGNIER, B.; MELCION, D.; RICHARD-MOLARD, D. Growth of *Fusarium moniliforme* and biosynthesis of fumonisin B<sub>1</sub> on maize grain as a function of different water activities. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 217-251, 1995.

CAMARGOS, S. M.; SOARES, L. M. V.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J. L.; BORTOLLETO, N. Fumonisin in corn cultivars in the state of São Paulo. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 226-229, 2000.

CASTELO, M. M., SUMNER, S. S., BULLERMAN, L. B. Stability of fumonisins in thermally processed corn products. **Journal of Food Protection**, 61, 1030–1033, 1998.

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

CHU, F.S.; LI, G.Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B<sub>1</sub> and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 847-852, 1994.

CHELACK, W.S.; BORSA, J.; MARQUARDT, R.; FROHLICH, A.A. Role of competitive microbial flora in the radiation-induced enhancement of ochratoxin production by *Aspergillus alutaceus* var *alutaceus* NRRL 3174. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2492-2496, 1991.

CIOLA, R. **Fundamentos de cromatografia a líquido de alto desempenho**. Ed. Edgard Blücher Ltda, 1998.

DANTIGNY, P.; GUILMART, A.; BENSOUSSAN, M. Basis of predictive mycology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, p. 187-196, 2005.

DAVIS, R.M.; KEGEL, F.R.; SILLS, W.M.; FARRAR, J.J. *Fusarium* ear rot of corn. **California Agriculture**, v.43, p. 4-5, 1989.

DESJARDINS, A.E.; MANANDHAR, G; PLATTNER, R.D; MARAGOS, C.M.; SHRESTHA, K.; McCORMICK, S.P. Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in Nepalese maize and wheat and the effect of traditional processing methods on mycotoxin levels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1377-1383, 2000.

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

DILKIN, P.; ZORZETE, P.; MALLMANN, C. A.; GOMES, J.D.F.; UTIYAMA, C.E.; OETTING, L.L.; CORRÊA, B. Toxicological effects of chronic low doses of aflatoxin B1 and fumonisin B1 – containing *Fusarium moniliforme* culture material in weaned piglets. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 1345-1353, 2003.

DOKO, M. B.; CANET, C.; BROWN, N.; SYDENHAM, E. W.; MPUCHANE, S.; SIAME, B. A. Natural co-occurrence of fumonisins and zearalenone in cereals and cereal based food from eastern and southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 3240-3243, 1996.

DURÃES, F. M.; CHAMMA, H. M. C. P.; COSTA, J. D.; MAGALHÃES, D.C.; BORBA, C. S. Índices de vigor de sementes de milho (*Zea mays* L.) associados com emergência no campo e rendimento de grãos. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL**, 4, Fortaleza, 1993. Resumos. Fortaleza, SBFV; UFCE, 1993. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, v. 5, n. 1, p. 90, 1993.

DURÃES, F. M.; CHAMMA, H. M. C. P.; COSTA, J. D.; MAGALHÃES, D.C.; BORBA, C. S. Índices de vigor de sementes de milho (*Zea mays* L.): associação com emergência em campo, crescimento e rendimento de grãos. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.17, n.1, p.13- 18, 1995.

FIGUEIRA, E.L.Z.; BLANCO-LABRA, A.; GERAGE, A.C.; ONO, E.Y.S.; MENDIOLAOLAYA, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. New amylase inhibitor present in corn seeds active in vitro against amylase from *Fusarium verticillioides*. **Plant Disease**, v.87, n.3, p. 233-240, 2003a.

FIGUEIRA, E.L.Z.; HIROOKA, E.Y.; MENDIOLA-OLAYA, E.; BLANCO-LABRA, A. Characterization of a hydrophobic amylase inhibitor from corn (*Zea mays*) seeds with activity against amylase from *Fusarium verticillioides*. **Phytopathology**, v.93, n. 8, p. 917-922, 2003b.

FIGUEIRA, E.L.Z.; BLANCO-LABRA, A.; GERAGE, A.C.; ONO, E.Y.S.; MENDIOLAOLAYA, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Amylase inhibitor in corn seeds active in vitro against amylase from *Fusarium verticillioides*. **Plant disease**, n. 3, v. 87, p. 233-240, 2003c.

FRANCESCHI, S., BIDOLI, E., BARON, A. E., LA VECCHIA, C. Maize and risk of cancers of the oral cavity, pharynx and esophagus in Northeastern Italy. **Journal of National Cancer Institute**, v. 82, p. 1407–1411, 1990.

FRANZIN, S. M.; ROVERSI, T. [www.ufsm.br/sementes/textos/vigor.pdf](http://www.ufsm.br/sementes/textos/vigor.pdf), 2001. Consultado em 02/09/2005.

FUJIKAWA, H.; MOROZUMI, S. Modelling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. **Food Microbiology**, v. 23, p. 260-267, 2006.

FURLONG, E.B. **Bioquímica: um enfoque para alimentos**. 1. ed., Rio Grande: EDGRAF Editora e Gráfica da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 173p, 2000.

GRACÍA-GIMENO, R.M.; HERVÁS-MARTÍNEZ, C.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, R.; ZUZERACOSANO, G. Modelling the growth of *Leuconostoc mesenteroides* by Artificial Neural Networks. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 317-332, 2005.

GEERAERD, A.H., HERREMANS, C.H., CENENS, C., VAN IMPE, J.F. Application of artificial neural networks as a non-linear modular modeling technique to describe bacterial growth in chilled food products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, p. 49–68, 1998.

GEERAERD, A.H., VALDRAMIDIS, V.P., DEVLIEGHERE, F., BERNAERT, H., DEBEVERE, J., VAN IMPE, J.F. Development of a novel approach for secondary modeling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modeling. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p. 229–244, 2004.

GELDERBLOM, W.C.A., SAMPLE, E.; MARASAS, W.F.O. Fumonisin: novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p.1806-1811, 1988.

GELDERBLOM, W.C.A., KRIEK, N. P., MARASAS, W. F., THIEL, P. G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B<sub>1</sub>, in rats. **Carcinogenesis**, 12, 1247–1251, 1991.

GELDERBLOM, W.C.A., JASKIEWICZ, K., MARASAS, W.F.O. The cancer initiating potential of the fumonisins B mycotoxins. **Carcinogenesis**. v.13, p.433 - 437, 1992.

GIBSON, A.M.; BARANYI, J.; PITT, J.I.; EYLES, M.J.; ROBERTS, T.A. Predicting fungal growth: the effects of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 419–431, 1994.

GIBSON, A.M.; HOCKING, A.D. Advances in the predictive modelling of fungal growth in food. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, p. 353– 358, 1997.

GONZÁLEZ, H. H. L.; RESNIK, S. L.; BOCA, R.T.; MARASAS, W.F.O. Mycoflora of Argentinian corn harvested in the main production area in 1990. **Mycopathologia**, v. 130, p. 29- 36, 1995.

GOULD, G. Predictive mathematical modeling of microbial growth and survival in foods. **Food Science Technology Today**, v. 3, p. 80-92, 1989.

GROVES, F. D., ZHANG, L., CHANG, Y. S., ROSS, P. F., CASPER, H., NORRED, W. P., et al. Fusarium mycotoxins in corn and corn products in a high-risk area for gastric cancer in Shandong Province, China. **Journal of AOAC International**, 82, 657–662, 1999.

HARTL, M.; HUMPF, H. U. Simultaneous determination of fumonisin B<sub>1</sub> and hydrolyzed fumonisin B<sub>1</sub> in corn products by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. **Journal Agricultural of Food Chemistry**, v. 47, p. 5078-5083, 1999.

HANAI, T. HPLC: **A practical guide**. UK: Ed. Royal Society of Chemistry, 1999.

HILL, R.A.; WILSON, D.M.; McMILLIAN, W.W. Ecology of the *Aspergillus flavus* group and aflatoxin formation in maize and groundnut. In: LACEY, J. Trichothecenes and other mycotoxins. Chichester, John Wiley Sons, p. 79-95, 1985.

HINOJO, M.J.; MEDINA, A.; VALLE-ALGARRA, F.M.; GIMENO-ADELANTADO, J.V.; JIMÉNEZ, M.; MATEO, R. Fumonisin production in rice cultures of *Fusarium verticillioides* under different incubation conditions using an optimized analytical method. **Food Microbiology**, v. 23, p. 119-127, 2006.

HIROOKA, E. Y.; YAMAGUCHI, M.M.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, n. 2. p. 173-183, 1996.

HIROOKA, E. Y. Micotoxinas Emergentes. In: **Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem de Grãos**. Editado por SCUSSEL, V. M., 382 p., Florianópolis, 2000.

I.A.L. – Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 533p., volume 1, **Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos**, 1985.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento sistemático da produção agrícola.  
<http://www.ibge.gov.br/ibge/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm.2001>

JACKSON, M.A.; BENNET, G.A. Production of fumonisin B<sub>1</sub> by *Fusarium moniliforme* NRRL 13616 in submerged culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2296-2298, 1990.

JULIAN, A.M.; WAREING, P.W.; PHILLIPS, S. I.; MEDLOCK, V.F.P.; MACDONALD, M.V.; RIO, L.E. Fungal contamination and selected mycotoxins in pre- and post-harvest maize in Honduras. **Mycophatologia**, v. 129, p. 5-16, 1995.

JUNEJA, V.K.; WHITING, R.C.; MARKS, H.M.; SNYDER, O.P. Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* at temperatures applicable to cooling of cooked meat. **Food Microbiology**, v. 16, p. 335-349, 1999.

KEDERA, C.J.; PLATTNER, R.D.; DESJARDINS, A.E. Incidence of *Fusarium* spp. and levels of fumonisin B<sub>1</sub> in maize in Western Kenya. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n.1, p. 41-44, 1999.

KELLERMAN, T. S.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; GELDERBLUM, W. C. A.; CAWOOD, M.; COETZER, J. A. W. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B<sub>1</sub>. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.57, p. 269 – 275, 1990.

KPODO, K.; THRANE, U.; HALD, B. Fusaria and fumonisins in maize from Ghana and their cooccurrence with aflatoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, p. 147-157, 2000.

KRUG, C. A. [et.al.]. **Cultura e adubação do milho**. In: Instituto Brasileiro de Potassa (ed.) São Paulo – Brasil. 541p. 1996.

LAZZARI, F. A. Ocorrência de toxinas de *Fusarium* em milho no Paraná. **Anais do I Congresso Latino-Americano de Micotoxologia**. VIII Encontro Nacional de Micotoxinas, Rio de Janeiro, 1994.

LAZZARI, F. A. **Umidade, Fungos e Micotoxinas na Qualidade de Sementes, Grãos e Rações**. 2ª edição, 148 p. Editora do autor. Curitiba, 1997.

LAZZARI, F. A.; LAZARRI, S. M. N. **Microrganismos, Micotoxinas e Protetores Antifúngicos**. In: Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem de Grãos. Editado por SCUSSEL, V. M., 382 p., Florianópolis, 2000.

LAZZARI, F. A.; LAZARRI, S. M. N. **Silagem de Grão Úmido de Milho**. UFPR/FAPEAGRO/ CNPq/ MCT, 60 p., Curitiba, 2001.

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

LI, F. Q., YOSHIZAWA, T., KAWAMURA, O., LUO, X. Y., LI, Y. W. Aflatoxins and fumonisins in corn from the high-incidence area for human hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, p. 4122–4126, 2001.

MACDONALD, M.V.; CHAPMANN, R. The incidence of *Fusarium moniliforme* on maize from Central America, Africa and Asia during 1992-1995. **Plant Pathology**, v.6, p. 112-125, 1997.

MACHINSKI, M. Jr.; SOARES, L.M.V. Fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in Brazilian corn-based products. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, p. 875-879, 2000.

MAHONEY, W.C.; HERMODSON, M.A.; JONES, B.; POWERS, D.D.; CORFMAN, R.S.; REECK, G.R. Amino acid sequence and secondary structural analysis of the corn inhibitor of trypsin and activated Hageman Factor. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 259, p. 8412- 8416, 1984.

MALLMANN, C. A.; **Micotoxinas**. I Congresso Uruguayo de Produccion Porcina, p. 119-125; 1998.

MARASAS, W. F., KELLERMAN, T. S., GELDERBLOM, W. C., COETZER, J. A., THIEL, P. G., VAN DER LUGT, J. J. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B<sub>1</sub> isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 197– 203, 1988.

MARASAS, W.F.O. Fumonisin: History, world-wide occurrence and impact. In: **Fumonisin in Food**, Jackson, L.S.; De Vries J.W. and Bullerman L. B. Eds., Plenum Press. New York, p. 3-18. 1996.

MARASAS, W.F.O. Discovery and occurrence of the fumonisins: A historical perspective. **Environmental Health Perspectives**, v.109, n.2, p.239-243, may 2001.

MARÍN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J.; VINAS, I.; MAGAN, N. Environmental factors, in vitro interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. **Micology**, v. 102, p. 831-837, 1998a.

MARÍN, S.; SANCHIS, V.; TEIXIDO, A.; SAENZ, R.; RAMOS, A.J.; VINAS, I.; MAGAN, N. Colonisation of maize grain by *F. moniliforme* and *F. proliferatum* in the presence of competing fungi and their impact on fumonisin production. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 1489– 1496, 1998b.

MARÍN, S.; HOMEDES, V.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J.; MAGAN, N. Impact of *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* colonisation of maize on calorific losses and fumonisin production under different environmental conditions. **Journal of Stored Products Research**, v. 35, p. 15–26, 1999a.

MARÍN, S.; MAGAN, N.; BELLINI, N.; RAMOS, A.J.; CANELA, R.; SANCHIS, V. Twodimensional profiles of fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in relation to environmental factors and potential for modeling toxin formation in maize grain. **International Journal of Food microbiology**, v. 51, p.159-167, 1999b.

MARSH, S.F.; PAYNE, A. Pre-harvest infection of corn silk and kernels by *Aspergillus flavus*. **Phytopathology**, v. 74, p. 1284-1289, 1984.

MATHRE, D.E.; JOHNSTON, R.H. Combined biological and chemical seed treatments for control of two seedlings diseases of Sh2 sweet corn. **Plant Disease**, v. 79, p. 1145-1148, 1995.

MC MEEKING, T. A.; OLLEY, J. N.; ROSS, T.; RATKOWSKY, D. A. **Predictive Microbiology: Theory and Application**. Wiley, New York, 1993.

MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. Mycotoxins. **Animal Feed Science Technology**, v. 69, p. 155-166, 1997.

MERRIL Jr., A.H.; WANG, E.; GILCHRIST, D.G.; RILEY, R.T. Fumonisin and others inhibitors of sphingolipid biosynthesis. In **Advances in Lipid Research; Sphingolipids and their metabolites**, Bell, R.M.; HANUN, Y.A.; MERRIL Jr., A.H. Edt. Academic Press, san Diego, CA, p. 215-234, 1993.

MILER, J.D. Factors that affect the occurrence of fumonisin. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 2, p. 321-324, 2001.

MINERVINI, F.; FORNELLI, F.; FLYNN, K.M. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxinivalenol and fumonisin B<sub>1</sub> in human erythroleukemia cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 21-28, 2004.

MYHARA, M.; AKIYAMA, H.; TOYODA, M.; SAITO, Y. New procedure for fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn products by ion pair chromatography with o-phthalaldehyde postcolumn derivatization and fluorometric detection. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 842-847, 1996.

MISLIVEC, P. B. Specific requirements and physical factors affecting fungal growth and multiplication. In: RHODES, M. E. ed. **Food Mycology**. Boston, G. K. Hall & Co., p. 20-28, 1979.

MOLINA, M.; GIANNUZZI, L. Modelling of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. **Food Research International**, v. 35, p. 585-594, 2002.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais**.p 25-26. Livraria Varela, São Paulo, 1998.

MUNKVOLD, G.P., DESJARDINS, A.E. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence?. **Plant Disease**, v.81, n.6, p.556-565, 1997.

MUSSER, S. M. Quantitation and identification of fumonisins by liquid chromatography/mass spectrometry. **Advances in Experimental and Medicine Biology**, v. 392, p. 65–74, 1996.

MUSSER, S.M., PLATTNER, R.D. Fumonisin composition in culture of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygamae*. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p. 1169-1173, 1997.

NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. **Fusarium species: an illustrated manual for identification**. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania. 5-18, 47-48, 128-132, 1983.

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

NELSON, P. E.; DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: Biology, chemistry, and significance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 31, p. 233-252, 1993.

NORRED, W. P.; VOSS, K. A. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. **Journal of Food Protection**, v.57, p. 522-527, 1994.

ONO, E.Y.S.; SUGIURA, Y.; HOMECHIN, M.; KAMOGAE, M.; VIZZONI, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**. v. 147, p. 139-148, 1999.

ONO, E.Y.S.; KAWAMURA, O.; ONO, M.A.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. A comparative study of indirect competitive ELISA and HPLC for fumonisin detection in corn of the State of Paraná, Brazil. **Food and Agricultural Immunology**, v. 12, p. 5-14, 2000.

ONO, E. Y.S; SASAKI, E.Y.; HASHIMOTO, E.H.; HARA, L.N.; CORRÊA, B.; ITANO, E.N.; SUGIURA, T.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Post-harvested storage of corn: effect of beginning moisture content on mycoflora and fumonisin contamination. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, n. 11, p. 1081-1090, 2002.

ONO, E.Y.S.; FUNGARO, M.H.P.; SOFIA, S.H.; FIGUEIRA, E.L.Z.; GERAGE, A.C.; ICHINOE, M.; SUGIURA, Y.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Trends of fumonisin contamination and animal intoxication through monitoring 1991 to 1997 corn crop in the State of Paraná , Brazil. **Mycopathologia**, v. 158, p. 451–455, 2004.

ORSI, R.B.; CORRÊA, B.; POSSI, C. R.; SCHAMMASS, E.A.; NOGUEIRA, J. R.; DIAS, S.M.C.; MALOZZI, M.A.B. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research**, v.36, p. 75-87, 2000.

OSWEILER, G. D.; ROSS, P. F.; WILSON, T. M.; NELSON, P. E.; WITTE, S. T.; CARSON, T. L.; RICE, L. G.; NELSON, H. A. Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with fumonisin in corn screenings. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, p. 53 – 59, 1992.

PALACIOS-CABRERA, H.A.; TANIWAKI M.H.; MENEZES, H.C.; VICENTINI, M.C.; IAMANAKA, B.T.; TANIWAKI, N.N. **Optimisation of the inoculation of *Aspergillus ochraceus* in coffee for isothermal studies simulating storage and marine transport of raw coffee**. 19 th ASIC Coffee Conference, Trieste, Italy, 14-18 May, 2001.

PARDO, E.; MARÍN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J. Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* on irradiated barley grain as influenced by temperature and water activity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, p. 79-88, 2004.

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

PITT, R. E. A descriptive model of mold growth and aflatoxin formation as affected by environmental conditions. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 2, p. 139-146, 1993.

PLACINTA, C. M. ; D´MELLO, J. P. F. ; MACDONALD, A. M. C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 78, p. 21-37, 1999.

PLATTNER, R.D.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; VOSS, K.A.; PETERSON, R.; SHACKELFORD, D.D.; WEISLEDER, D. A method for detection for fumonisins in corn samples associated with field cases of equine leukoencephalomalacia. **Mycologia**, v. 82, p. 698- 702, 1990.

POZZI, C. R.; ARCARO, J. R. P.; JÚNIOR, I. A.; FAGUNDES, H.; CORRÊA, B. Aspectos Relacionados à Ocorrência e Mecanismo de Ação de Fumonisin. **Ciência Rural**. v. 32, n. 5, 2002.

PUEYO, J.J.; DELGADO-SALINAS, A. Presence of alpha-amylase inhibitor in some members of the subtribe phaseolinae (phaseoleae: fabaceae). **American Journal of Botany**, v. 84, n. 79, 1997.

RASCH, M. The influence of temperature, salt and pH on the inhibitory effect of reuterin on *Escherichia coli*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 225–231, 2002.

RHEEDER, J. P., MARASAS, W. F. O., THIEL, P. G., SYDENHAM, E. W., SHEPARD, G. S., VAN SCHALKWYK, D. J. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human oesophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, v. 82, p. 353–357, 1992.

RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; VISMER, H.F. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2101-2105, 2002.

RICHARD, J.L; PAYNE, G.A.; DESJARDINS, A.E.; MARAGOS, C.; NORRED, W.P.; PESTKA, J.J.; PHILLIPS, T.D.; VAN EGMOND, H.P.; VARDON, P.J.; WHITAKER, T.B.; WOOD, G. **Mycotoxins: Risk in Plant, Animal, and Human Systems**. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA. 147p, 2003.

RICE, L. G., ROSS, P. F., DEJONG, J., PLATTNER, R. D., , J. R.. Evaluation of a liquid chromatographic method for the determination of fumonisins in corn, poultry feed, and *Fusarium* culture material. **Journal of AOAC International**, v. 78, p. 1002–1009, 1995.

ROBERTS, T.A. Predictive modeling of microbial growth. In A Turner (Ed). **Food Technology International** Europe, Sterling publications International, London, p. 231-235, 1990.

ROSS, P.F., NELSON, P.E., RICHARD, I.D., *et al.* Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolate associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. **Applied Environmental Microbiology**, v.56, p. 3225-3226, 1990.

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

ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 501– 508, 1996.

ROSS, T.; DALGAARD, P.; TIENUNGOON, S. Predictive modeling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 231-245, 2000.

SALTER, M.A.; RATKOWSKY, D.A.; ROSS, T.; McMEEKING, T.A. Modelling the combined temperature and salt (NaCl) limits for growth of a pathogenic *Escherichia coli* strain using nonlinear logistic regression. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 159-167, 2000.

SAMAPUNDO, S.; DEVLIEGHIERE, F.; MEULENAUER, B.; GEERARD, A.; MUTUKUMIRA, A.N.; VAN IMPE, J.; DEBEVERE, J. Modeling the effect of water activity and temperature on growth of *Fusarium moniliforme* and *proliferatum* in corn. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 35-52, 2005.

SAMSON, R.A.; HOESKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C. **Introduction to food-borne fungi**. 4 ed. The Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995.

SANTURIO, J. **Como a biotecnologia pode ajudar no combate às micotoxinas nos alimentos**. In: Conselho de Informações sobre Biotecnologia - entrevista. [www.cib.org.br](http://www.cib.org.br) . Data da consulta: 15/07/04.

SAUNDERS, D.S., MEREDITH, F.I, VOSS, K.A. Control of fumonisin: Effects of processing. **Environmental Health Perspectives**, v.109, n.2, p.333-336, may 2001.

SAUTOUR, M., SOARES MANSUR, C., DIVIES, C., BENSOUSSAN, M., DANTIGNY, P. Comparison of the effects of temperature and water activity on growth rate of food spoilage moulds. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 311 – 316, 2002.

SCOTT, P.M. Trichothecenes in grains. **Cereal Foods World**, v. 35 (7), p. 661-666, 1990.

SCOTT, P.M. Fumonisin. **Institute Journal of Microbiology**, v.18, p.257-270, 1993.

SCOTT, P. M.; LAWRENCE, G. A. Stability and problems in recovery of fumonisins added to corn-based foods. **Journal of AOAC International**, v. 77, p. 541–545, 1994.

SCUDAMORE, K.A.; PATEL, S. Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, p. 407-416, 2000.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em Alimentos**. Florianópolis: Insulas, 144p.,1998.

SCUSSEL, V. M. **Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem de Grãos**. Cap. II – Micotoxinas emergentes, p. 2-24, 2000.

SHEPHARD, G. S., SYDENHAM, E. W.; THIEL, P. G.; GELDERBLOM, W. C. A. Quantitative determination of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, 2077-2087, 1990.

SHEPHARD, G. S. Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins. **Journal of Chromatographic A**, v. 815, p. 31-39, 1998

SHEPHARD, G. S., MARASAS, W. F., LEGGOT, N. L., YAZDANPANAH, H., RAHIMIAN, H., SAFAVI, N. Natural occurrence of fumonisins in corn from Iran. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 48, 1860–1864, 2000.

SIGMA-ALDRICH. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**. 22<sup>nd</sup> Edition by NICHOLSON, D.E., The University of Leeds, England. 2003

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A .; SILVEIRA, N. F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2<sup>o</sup> edição, 317p, 2001.

SILVA, C. R.; JARDIM, I. C. S. F.; AIROLD, C. New generation of sterically protected C18 stationary phases containing embedded urea groups for use in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1, 2002.

SILVA, J.B.; DILKIN, P.; FONSECA, H.; CORRÊA, B. Production of aflatoxins by *Aspergillus flavus* and fumonisins by *Fusarium* species isolated from Brazilian sorghum. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 182-186, 2004.

SORIANO, J.M.; DRAGACCI, S. Occurrence of fumonisins in foods. **Food Research International**, v. 37, p. 985-1000, 2004.

SOTOMAYOR-RIOS; WEIBEL, D.E. **Grain Crops. In: Handbook of Tropical Food Crops (F.W.Martin)** p.7-25. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1987.

SUTHERLAND, J.P.; BAYLISS, A.J.; ROBERTS, T.A. Predictive modelling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. **Institute of Journal of Food Microbiology**, v. 21, p. 217–236, 1994.

SYDENHAM, E. W.; GELDERBLUM, W.C.A.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B<sub>1</sub>, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 38, p. 285-290, 1990a.

SYDENHAM, E. W., THIEL, P. G., MARASAS, W. F. O., SHEPARD, G. S., VAN SCHALKWYK, D. J.; KOCH, K. R. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of Transkei, Southern Africa. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 38, p. 1900–1903, 1990b.

SYDENHAM E. W.; MARASAS, W. F. O.; SHEPARD, G. S.; THIEL, P. G.; HIROOKA, E.Y. Fumonisin concentration in Brazilian feeds associated with field outbreaks of animal mycotoxicosis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 994-997, 1992a.

SYDENHAM E. W., MARASAS, W. F. O., THIEL, P. G. Liquid chromatographic determination of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> in foods and feeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 75, p. 313-318, 1992b.

SYDENHAM, E. W., SHEPARD, G. S., THIEL, P. G., STOCKENSTROM, S., SNIJMAN, P. W., & VAN SCHALKWYK, D. J. Liquid chromatographic determination of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> in corn: AOAC-IUPAC Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 79, p. 688–696, 1996.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 141-158, 1998.

TE GIFFEL, M.C., ZWIETERING, M.H. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, p. 135– 149, 1999.

THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O., SYDENHAM, E.W., SHEPHARD, G.S.; GELDERBLUM, W.C.A.; NIEUWERNHUIS, J.J. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.1089-1093, 1991.

THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O., SYDENHAM, E.W. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn human and animal health. **Mycopathologia**, v.117, p.3-9, 1992.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS C. **Fases estacionárias para cromatografias líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados**. Química Nova, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

TOSELLO, G. A. **Milhos especiais e seu valor nutritivo**. In: CERVELATTI, E. P. Caracterização biológica e genética de fungos presentes em lesões da mancha de *Phaeosphaeria* em milho (*zea mays*). Londrina – PR. 96 p., 1999. Dissertação Mestrado em Genética e Melhoramento. Universidade Estadual de Londrina.

TRUCKSESS, M. W., STACK, M. E., ALLEN, S., & BARRION, N. Immunoaffinity column coupled with liquid chromatography for determination of fumonisin B1 in canned and frozen sweet corn. **Journal of AOAC International**, 78, 705–710, 1995.

UENO, Y.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; WANG, D.S.; HIROOKA, E.Y.; HARA, S.; KARKI, T.; CHEN, G.; YU, S.H. A limited survey of fumonisin in corn and corn-based products in Asian countries. *Mycotoxin Research*, v. 9, p. 27-34, 1993.

VALÍK, L., PIECKOVA, E. Growth modelling of heat resistant fungi: the effect of water activity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 63, p. 11 –17, 2001.

VELLUTI, A.; MARIN, S.; BERRUCI, L.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V. The effect of fungal competition of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium graminearum* on fumonisin B1 and zearalenone formation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, p. 39-66, 2000.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M.; SADER, R. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FINEP, 164 p., 1994.

VISCONTI, A.; BOENKE A. Improvement of the determination of fumonisin (FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub>) in maize and maize-based feeds. **European Commission BCR Information – Chemical Analysis**. Brussels, Belgium. 1995.

VISCONTI, A., SOLFRIZZO, M., & DE GIROLAMO, A. Determination of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn and corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity column cleanup: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 84, p. 1828–1837, 2001.

ZUZERA-COSANO, G.; GARCÍA-GIMENO, R.M.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, R.; HEVÁSMARTÍNEZ, C. Performance of response surface model for prediction of *Leuconostoc mesenteroides* growth parameters under different experimental conditions. **Food Control**, v. 17, p. 429-438, 2006.

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F.M.; VAN'T RIET, K. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, p. 1875-1881, 1990.

ZWIETERING, M. H.; CUPPERS, H.G.S.M.; DE WITT, J.C.; VAN'T RIET, K. Evaluation of data transformations and validation of a model for the effect of temperature on bacterial growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 195-203, 1994. [www.cnpms.embrapa.br](http://www.cnpms.embrapa.br). Data da consulta: 02/09/2005.

WANG, E.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; RILEY, R.T.; MERRILL, A.H. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 14486- 14490, 1991.

WARFIELD, C.Y.; GILCHRIST, D. G. Influence of kernel age on fumonisin B1 production in maize by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2853-2856, 1999.

WATSON, S.A.; RAMSTAD, P.E. **Corn: Chemistry and Technology**. American Association of Cereal Chemist, St. Paul, MN, 1987.

WESTHUIZEN, L. V. D.; SHEPHARD, G. S.; VILDES, M. S.; COSTA, L. L. F.; VISMER, H. F.; RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O. Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5574- 5578, 2003.

WIJZES, T.; McCLURE, P.J.; ZWIETERING, M.H.; ROBERTS, T.A. Modelling bacterial growth of *Listeria monocytogenes* as a function of water activity, pH and temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 18, p. 139-149, 1993.

WILSON, T.M.; ROSS, P.F.; RICE, L.G.; OSWEILLER, G.D.; NELSON, H.A.; OWENS, D.L.; PLATTNER, R.D.; REGGIARDO, C.; NOOM, T.H.; PICKRELL, J.W. Fumonisin B<sub>1</sub> levels associated with a epizootic of equine leukoencephalomalacia. **Journal of Veterinarian Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 213-216, 1990.

**ANEXOS**

## ANEXO A

**Tabela 21** –Análise de variância referente às análises bromatológicas (0; 0,2; 0,3; 0,5% de solo) e contagem fúngica (0,5% solo)

Análises bromatológicas	GL	Quadrado médio	Valor de "F"	Valor de "p"
Umidade	3	1,687	90,02	0,0003*
Aw	3	0,010	138,00	0,0001*
Proteína	3	0,569	31,98	0,0029*
Contagem fúngica	1	0,7921	87,52	0,011233*

\*significativo a 5%

**Tabela 22** – Análise de variância referente às análises bromatológicas (0; 0,1; 0,15 e 0,25% de solo) e contagem fúngica (0,15%)

Análises bromatológicas	GL	Quadrado médio	Valor de "F"	Valor de "p"
Umidade	3	0,2812	11,84	0,01854*
Aw	3	0,0002	2,20	0,23107
Proteína	3	0,0825	0,65	0,62210
Contagem fúngica	1	0,0004	0,007	0,94167

\*significativo a 5%